

183

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1971
tom 17
nr 1

KWARTALNIK

<http://rcin.org.pl>

INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

Forma maszynopisu. Maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok 1 cm po prawej stronie oraz z numeracją stron. Na pierwszej stronie należy zamieścić tylko: imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, ich 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.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 1
tom XVII
zeszyt 1

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. Pawełekiewicz (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 1971

Nakład 2110 (1987+123)	Oddano do składania 28.X.1970 .r
Ark. wyd. 14,25, druk. 12+05	Podpisano do druku w marcu
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono w marcu 1971 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 1792/70 U-102

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

BARBARA CZARTORYSKA *

Metabolizm Glikolipidów

Metabolism of Glycolipids

The pathway of biosynthesis and degradation of glycosphingolipids and glycosylglycerides in mammalian tissue are presented.

W tkankach zwierzęcych występują dwa rodzaje glikolipidów. Najwięcej jest glikosfingolipidów, związków, w których skład wchodzi jedna z zasad zwanych ogólnie sfingozynami (najczęściej jest to sfingenina czyli *D*-erytro-1,3-dwuhydroksy-2-amino-4-*trans*-oktadeken), przyłączony do niej wiązaniem amidowym kwas tłuszczowy oraz, przyłączony do grupy hydroksylowej przy pierwszym węglu wiązaniem O-glikozydowym, mono- lub oligosacharyd, czasem zawierający grupy siarczanowe lub kwas sialowy. Nomenklatura tych związków nie jest jeszcze ustalona i różni autorzy stosują różne nazwy i różne skróty. Nazwy zwyczajowe wywodzą się na ogół bądź to od nazwy tkanki, w której znaleziono po raz pierwszy (cerebrozyd, gangliozyd), bądź to od właściwości fizykochemicznych (globozyd). Stosując symbole i skróty autorzy opierają się bądź to na ruchliwości chromatograficznej, bądź to na składzie chemicznym. Ogólne zestawienie najczęściej stosowanej nomenklatury najważniejszych glikolipidów przedstawia tablica 1.

Drugą grupę stanowią glikozyloglicerydy, w których mono- lub dwusacharyd przyłączony jest wiązaniem O-glikozydowym do pierwszego węgla dwuglicerydu lub 3-alkilo-2-acyloglicerolu. Związki te są stałym składnikiem strukturalnym błony komórkowej. Stosunkowo najwięcej zawiera ich tkanka nerwowa, w której stanowią zasadniczy element struktury mieliny. Ich rola fizjologiczna nie jest dotąd wyjaśniona. Przypuszcza się, iż biorą one udział w aktywnym transporcie przez błony (28, 129). Gangliozydy mózgu uczestniczą, być może, w usuwaniu wirusów oraz toksyn bakteryjnych (91, 148). Wiadomo, że glikolipidy determinują —

* Dr, Zakład Biochemii, Instytut Hematologii, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: Gal — *D*-galaktoza; Glk — *D*-glukoza; GalNAc — *N*-acetylo-*D*-galaktozamina; NANA — kwas *N*-acetylneuraminowy (sialowy); cer — ceramid (*N*-acylo-sfingozyina)

Klasyfikacja

	Schematyczny wzór	
Glikolipidy obojętne: monoheksozyloceramidy (cerebrozydy)	Gal-cer Glk-cer	
dwuheksozyloceramidy (cytozydy)	Gal-Glk-cer Gal-Gal-cer	
trójheksozyloceramidy	Gal-Gal-Glk-cer GalNAc-Gal-Glk-cer	
tetraheksozyloceramidy	Gal-GalNAc-Gal-Glk-cer GalNAc-Gal-Gal-Glk-cer	
fukoglikolipidy (57)-subst. grupowe (61), glikolipidy nowotworowe (57, 59)		
sulfatydy:	SO ₄ -Gal-cer SO ₄ -Gal-Glk-cer	
Gangliozydy: schematyczny wzór	Klenk ¹⁾	Kuhn ¹⁾
Gal-Glk-cer	B ₂	G-lakt
NANA GalNAc-Gal-Glk-cer	A ₁	G _{GNTII}
NANA Gal-GalNAc-Gal-Glk-cer	A ₂	G _{GNTI}
NANA Gal-GalNAc-Gal-Glk-cer	B ₁	G _{GNTII}
NANA NANA Gal-Glu-cer	—	G'lakt
NANA-NANA GalNAc-Gal-Glk-cer	A ₃	—
NANA-NANA Gal-GalNAc-Gal-Glk-cer	C ₁	G _{GNTIII}
NANA-NANA Gal-GalNAc-Gal-Glk-cer	C ₃	G _{GNTIV}
NANA-NANA		

¹⁾ Wg W. Stoffel w *Lipids and Lipidoses*, red. D. Schettler N.Y. 1967, str. 1

wspólnie z białkami, glikoproteidami i wielocukrami — właściwości antygenowe tkanek. Immunogenne są zarówno cerebrozyd (69) i laktoceramid (116), jak i cytolipiny o większej zawartości cukru (58, 89) oraz glikozyloglicerydy (38). Glikolipidy determinują częściowo właściwości serologiczne erytrocytów (61, 88).

Badania nad metabolizmem sfingoglikolipidów prowadzone są od niedawna i uzyskane dotychczas fragmentaryczne dane nie pozwalają jeszcze na odtworzenie pełnego szlaku biosyntezy tych związków. Na ogół doświadczenia przeprowadzono *in vitro* z pełnymi homogenatami, frakcjami

Tablica 1

glikolipidów

Nazwa systematyczna		Stosowane potoczne nazwy zwyczajowe i skróty
galaktoceramid		—
glukoceramid		G-1 —
laktoceramid		G-2 cytolipina H (116)
dwugalaktoceramid		— —
—		G-3 glikolipid Fabry'ego
—		— aminoglikolipid (75)
—		— asialogangliozyd
—		G-4 globozyd (152)
sulfatydylogalaktoceramid		—
sulfatydylolaktoceramid		—
Svennerholm (139)	Burton (29)	Stosowane nazwy potoczne hematozyd (63)
GM ₃	B ₁	
GM ₂	B ₂	gangliozyd Tay-Sachsa
GM ₁	B ₃	monosialogangliozyd
GD _{1a}	B ₄	dwusialogangliozyd
—	C ₁	—
—	C ₂	—
—	C ₃	—
GT ₁	C ₄	trójsialogangliozydy

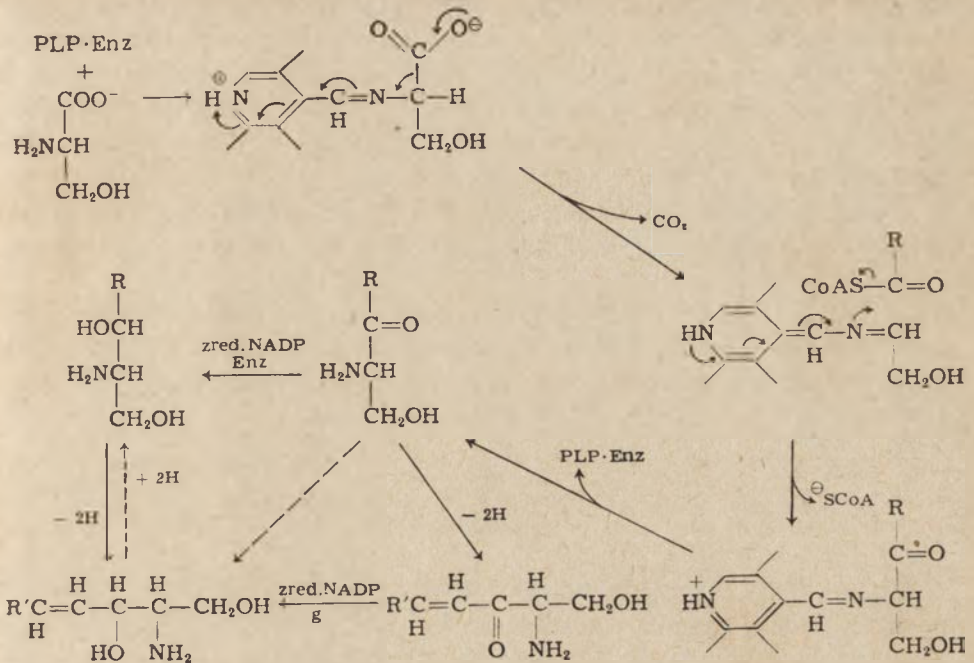
subkomórkowymi lub, w najlepszym przypadku, z nieoczyszczonymi preparatami enzymatycznymi. Nie pozwala to na jednoznaczne ustalenie specyficzności enzymów i dokładne zbadanie ich właściwości, ani też na precyzyjne zbadanie ich rozmieszczenia w komórce. Na podstawie uzyskanych danych można jednak ustalić ogólny zarys metabolizmu sfingoglikolipidów.

I. Sfingozyna

Podstawową zasadą glikosfingolipidów jest najczęściej C₁₈-sfingozyna lub sfinganina (dwuhydroksyfingozyna) i prawie wszystkie prace dotyczą

biosyntezy tych dwu związków. Glikolipidy zwierząt zawierają również inne zasady z tej grupy, na przykład w nerkach występują C_{18} - i C_{20} -trójhydroksysfingozyna (93), fitosfingozyna (76, 111) oraz zasady o rozgałęzionych łańcuchach (111), zaś w gangliozydach z mózgow osobników starszych prawie 50% zasad stanowi C_{20} -sfingozyna (123). Prawdopodobnie powstają one w podobny sposób jak właściwa sfingozyna. Pierwsze dane o biosyntezie sfingozyny opublikowali w 1954 roku Zabin i Meed (154), oraz, niezależnie, Sprinson i Coulon (131). Podawali oni dootrzewnowo znakowane ^{14}C octan, glicynę, etanoloaminę oraz serynę i badali rozmieszczenie radioaktywnego węgla w cząsteczce sfingozyny. Okazało się, że octan i etanoloamina są włączane równomiernie do alifatycznej części łańcucha (w 95%), natomiast 65% radioaktywności seryny odnajduje się w pierwszym węglu sfingozyny. Na tej podstawie autorzy wysunęli hipotezę, że bezpośrednimi prekursorami sfingozyny są kwas palmitynowy i seryna, która nie może być zastąpiona przez etanoloaminę. Przypuszczenie to zostało w pełni potwierdzone przez późniejsze badania *in vitro*. Brady i wsp. (23, 24) stwierdzili, że bezkomórkowa zawiesina mózgu zawiera układ enzymatyczny syntetyzujący sfingozynę z palmitylo-CoA i seryny — ta ostatnia tworzy polarną część cząsteczki. Reakcja zachodzi w obecności zred. NADP, fosforanu pirydoksalu i jonów Mn^{2+} (24). Układ enzymatyczny zawiera według autorów enzym katalizujący redukcję z udziałem zred. NADP palmitylo-CoA do aldehydu palmitynowego. Następnie powstaje kompleks typu zasady Schiffa, w którego skład wchodzi aldehyd palmitynowy, jon metalu, fosforan pirydoksalu i seryna (16). Produktem reakcji jest sfinganina, którą następnie enzymy o budowie prawdopodobnie flawoproteidowej utleniają do sfingozyny (24). Obie zasady powstające na drodze biosyntezy mają formę erytro (43).

Dogodnym obiektem badań nad biosyntezą sfingozyny okazały się drożdże *Hansenula cifferri*, które wydalają sfingozynę do podłoża w ilości około 100—200mg zasady/11 kultury (29, 136). Homogenat tych drożdży syntetyzuje erytrosfingozynę (27) i erytrosfinganinę (26) z seryny i palmitylo-CoA, podobnie jak homogenat mózgu. Reakcja zachodzi w obecności fosforanu pirydoksalu oraz zred. NADP, natomiast nie wymaga obecności jonów metalu. Prawdopodobnie więc szlak metaboliczny jest taki sam. Palmitylo-CoA może być zastąpiony aldehydem palmitynowym jedynie w obecności zred. NADP, ATP i CoA (26). Inkubacja homogenatu z substratami i fosforanem pirydoksalu bez zred. NADP prowadzi do powstania związków pośrednich: 3-ketosfinganiny (27) i 3-ketosfingozyny (25). W wyniku redukcji tych związków powstaje sfinganina i sfingozyna. Palmitynian można zastąpić 2-heksadekanonem, natomiast w tej reakcji α -hydroksypalmitynian nie może być prekursorem sfingozyny. Inhibitorem reakcji jest cysteina (27). Brady i wsp. (25) proponują następujący schemat biosyntezy sfinganiny u *Hansenula cifferri* (schemat 1).



Schemat 1. Proponowany mechanizm powstawania sfingozyny (wg 25)

PLP — Fosforan pirydoksalu; Enz. — enzym; R = CH₂(CH₂)₁₃CH₃; R' = CH₂(CH₂)₁₁CH₃

II. Ceramid

Ceramid czyli N-acylosfingozyna może być syntetyzowany dwojako. S r i b n e y (132) wykrył w homogenatach mózgow szcztura i świnki morskiej oraz w mikrosomach wątroby enzym przenoszący kwas tłuszczowy z CoA na sfingozynę. Substratem może być zarówno naturalnie występująca erytro-sfingozyna jak i treo-sfingozyna (41, 132).

Drugą możliwą drogą syntezy ceramidu jest przyłączenie wolnego kwasu tłuszczowego. G a t t (44, 46) stwierdził, że sedymentująca między 1500—15 000g frakcja homogenatu mózgu zawiera silnie związany ze strukturami subkomórkowymi enzym katalizujący odwracalną reakcję syntezy i hydrolizy wiązania amidowego N-acylosfingozyny. Długie kwasy tłuszczowe hamują zarówno reakcję syntezy jak i hydrolizy, natomiast sfingozyna hamuje wyłącznie reakcję hydrolizy. Enzym ten, o optymalnym pH 4,8, nie wymaga obecności jonów metali, a *in vitro* działa jedynie w obecności detergentów np. Tween-100 lub taurocholau. Substratem enzymu może być zarówno erytro- jak i treo-sfingozyna (41). Enzym ten nie hydrolizuje acetylosfingozyny ani cerebrozydu (46). Identyeczny enzym znajduje się również w wątrobie i nerkach (44). Mikrosomy wątroby zawie-

rają też enzym acylujący fitosfingozynę (153). Enzym z mózgu został 200-krotnie oczyszczony (153), jest to białko o masie cząsteczkowej powyżej 150 000; proteoliza powoduje zmniejszenie masy cząsteczkowej do 100 000 bez obniżenia aktywności enzymatycznej. Wszelkie próby rozdzielania aktywności syntetycznej od hydrolitycznej okazały się nieskuteczne (153).

Podobny enzym katalizujący syntezę i rozpad amidowego wiązania ceramidu, różniący się optymalnym pH (7,6) występuje w soku dwunastnicy (102).

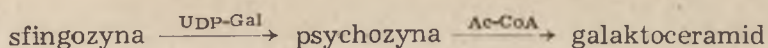
Yawin i Gatt (153) uważają, że ceramid powstaje wyłącznie na drodze bezpośredniego acylowania sfingozyny bez udziału CoA, a wyniki uzyskane przez Sribney'a tłumaczą obecnością w układzie badanym hydrolazy acylo-CoA uwalniającej kwas tłuszczowy z CoA.

III. Cerebrozydy

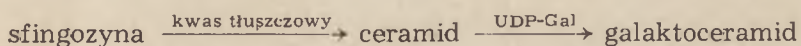
Znane są dwa monoheksozyloceramidy, zwane cerebrozydami, a mianowicie galaktoceramid i glukoceramid. Jako pierwszy czysty glikolipid został wyodrębniony z mózgu przez Thudichuma (144) galaktoceramid. Stanowi on główny glikolipid mózgu, występuje także w innych tkankach, na przykład nerkach (94). Pierwsze dane o wbudowywaniu cukrów do glikolipidów opublikowali Radin i wsp. (113) w 1957 roku oraz Burton i wsp. w 1958 roku (31). Ci ostatni podawali młodym szczurom dojelitowo glukozę i galaktozę znakowane ^{14}C i odnajdywali je w glikolipidach mózgu. Pierwsze badania *in vivo* (31), poparte przez późniejsze badania *in vitro* (14, 31, 74) nasuwały przypuszczenie, że najwyższą aktywność enzymatyczną wykazują mikrosomy, a reakcja wymaga obecności jonów Mg^{2+} , ATP oraz amidu kwasu nikotynowego (31). W warunkach beztlenowych reakcja zachodzi szybciej (31).

Z wyników dalszych badań wynikałoby, że istnieją dwie drogi biosyntezy galaktoceramidu.

Podany do mózgu znakowany na pierwszym węglu kwasu tłuszczowego ceramid odnajduje się raczej w sfingomielinach niż w cerebrozydzie, co sugerowałoby, że nie ceramid jest jego bezpośrednim prekursorem (86). Cleland i Kennedy (33) stwierdzili, że mikrosomy mózgu świnki morskiej zawierają enzym przenoszący galaktozę z UDP wyłącznie na sfingozynę. Akceptorem nie może być ceramid. Analogiczną reakcję, jak stwierdził ostatnio Kanfer (74) katalizują również mikrosomy mózgu szczura. Ta sama frakcja zawiera również enzym przenoszący kwas stearynowy z CoA na psychozynę w obecności ATP, jonów magnezu i detergentu (14). Akceptorem kwasu może być również siarczan sfingozyny i, w słabym stopniu, wolna sfingozyna. Dane te sugerowałyby następujący szlak powstawania galaktoceramidu:



Wyniki innych badań nie pozwalają jednak wykluczyć istnienia alternatywnej drogi syntezy, a mianowicie:



Według Fujimoi i Nakamo (42) w homogenatach mózgu zachodzi przeniesienie galaktozy z UDP-Gal raczej na ceramid (zarówno naturalny jak i syntetyczny) niż na s핑ozynę. Aktywniejszym akceptorem jest ceramid zawierający erytros핑ozynę niż jej formę treo-, oraz s핑ozynę a nie s핑aninę. Według najnowszych badań Morella i Rodina (99) mikrosomy mózgu zawierają enzym przenoszący galaktozę jedynie na ceramid zawierający hydroksykwasы tłuszczowe, a s핑ozyna może być akceptorem jedynie w przypadku braku odpowiedniego ceramidu. Należy jednak wspomnieć, że tylko znikoma część ceramidu z hydroksykwasem (około 1%) ulega reakcji. Z drugiej strony wiadomo, że cerebrozyd mózgu zawiera zarówno hydroksykwasы jak i zwykle kwasы tłuszczowe (143), a zatem cytowani autorzy nie wykluczają istnienia jeszcze innej drogi syntezy cerebrozydu. Rozbieżności wyników uzyskiwanych przez różnych badaczy na analogicznym materiale wskazują na to, że biosynteza galaktoceramidu zależy od wielu czynników i że warunki doświadczalne *in vitro* nie odtwarzają w dostatecznym stopniu warunków *in vivo*. Większość autorów skłonna jest jednak przypuszczać, iż większa część — o ile nie cała ilość galaktoceramidu powstaje na drodze acylowania psuchozyny (14, 33, 74).

Glukoceramid występuje w tkankach normalnych tylko w niewielkich ilościach (94, 95, 138, 145), natomiast w chorobie Gauchera magazynowany jest w wielkich ilościach przede wszystkim w śledzionie (137, 138, 146). Jest on zapewne prekursorem laktoceramidu (6) i gangliozydów (77) oraz innych glikolipidów. Glukoceramid powstaje przez przeniesienie cząsteczki glukozy na lipidowy akceptor przy współdziałaniu specyficznego enzymu. Jedynym dawcą glukozy jest UDP-Glk (6). Obecność odpowiedniej glukozylotransferazy stwierdzono w mózgach zarodków kurzych (3, 6) i młodych szczurów (35, 74), a także w śledzionie (146) oraz leukocytach ludzkich (95). Basu i wsp. (6) wyodrębnili enzym z mózgow zarodków kurzych, z frakcji sedymentującej przy 20 000 g i oczyścili go sześciokrotnie. Transglukozydaza ta, o optymalnym pH 7,8, działa *in vitro* tylko w obecności detergentu, natomiast, w odróżnieniu od innych transferaz, nie wymaga obecności jonów Mg^{2+} ani Mn^{2+} (6), choć te jony reakcję przyspieszają (3). Włączanie glukozy stymuluje najsilniej ceramid, w mniejszym stopniu s핑ozyna oraz s핑anina, przy czym powstają również glukozyllos핑ozyna i glukozyllos핑anina (6). Odmienne są wyniki doświadczeń z mikrosomami mózgu szczura. Wbudowywanie glukozy do glukoceramidu przyspiesza jedynie s핑ozyna, natomiast ceramid nie ma wpływu

(35, 74), mimo, że jedynym produktem reakcji jest glukoceramid (74). Badany układ enzymatyczny nie zawierał enzymu acylującego galaktozyloosfingozynę ani glukozylfosfingozynę (74). Akceptorem glukozy byłyby więc jakaś „aktywna” forma ceramidu, powstająca ze sfingozyny — być może kompleks ceramidu z enzymem katalizującym acylowanie sfingozyny.

Badania Kanfera (74) potwierdzają odrębność dróg syntezy glukoceramidu i galaktoceramidu. Po dodaniu sfingozyny do układu enzymatycznego z mikrosomów mózgu szczura, gdy donatorem jest UDP-galaktoza, powstaje jedynie psychozyna, a jeśli UDP-glukoza—glukoceramid.

IV. Sulfatydy

Strukturę sulfatydów jako siarczanów galaktocerebrozydów ustalił Blix (8). Związki te występują nie tylko w mózgu (8), ale i w innych tkankach, na przykład nerkach (94). Mikrosomy mózgu zawierają układ enzymatyczny przyłączający grupę siarczanową do galaktoceramidu (97). Dawcą grupy siarczanowej jest 3-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarczan (PAPS) (2, 34). Prawdopodobnie w mózgu istnieją dwie sulfotransferazy — jedna z nich przyłącza grupę siarczanową do trzeciego węgla galaktozy w cząsteczce galaktoceramidu, galaktozyloosfingozyny lub laktocerebrozydu, druga estryfikuje wolną galaktozę oraz drobne, rozpuszczalne w wodzie galaktozydy (34).

W homogenacie mózgu owcy zachodzi przeniesienie grupy siarczanowej na endogenny akceptor, który jest tak silnie związany z białkiem enzymu, że ani za pomocą ekstrakcji ani chromatograficznie nie można ich rozdzielić. Produktem działania tego enzymu jest sulfatydy, nigdy siarczan gangliozydu (2).

V. Dwuheksozoceramidy

Laktoceramid jest nie tylko składnikiem normalnych tkanek ssaków (śledziony (83), erytrocytów (115)) i, w większych ilościach, tkanek rakowatych (115), ale prawdopodobnie jest także prekursorem wyższych glikolipidów, na przykład gangliozydów (6, 77). Powstaje on przez przeniesienie cząsteczki galaktozy z UDP-galaktozy na glukoceramid. Specyficzna galaktozylotransferaza z mózgow zarodków kurzych przenosi galaktozę jedynie na glukoceramid bądź na glukozylfosfingozynę, a sfingozyna, sfiniganina, ceramid, psychozyna, galaktoceramid, laktoceramid i hematozyd nie mogą być akceptorami. Reakcja zachodzi jedynie w obecności detergentu i jonów Mg^{2+} lub Mn^{2+} . Inne jony Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} i Cd^{2+} , nie mają wpływu na reakcję (6). Optymalne pH reakcji wynosi 6,8 (6). Analogiczna galaktozylotransferaza występuje również w śledzionie (65,

66, 67), oraz w wątrobie, nerkach i szpiku kostnym szczura (67). Od enzymu opisanego przez Basu i wsp. (6) różni się ona tym, że aktywują ją jedynie jony Mn^{2+} , które nie mogą być zastąpione jonami Mg^{2+} (65, 67); optymalne pH działania enzymu jest nieco niższe (6,1), a sfingolipidy, nie będące akceptorami, hamują reakcję (67).

Drugim cytozdem występującym jedynie w niewielkich ilościach w normalnych tkankach człowieka, na przykład w nerce (93), jest galaktobiozoceramid. Występuje on w większych ilościach w niektórych tkankach nowotworowych (54) i jest głównym cytozdem leukocytów ludzkich (95) i nerek ludzi chorych na chorobę Fabry'ego (141) oraz śledziony u niektórych szczepów myszy (66). Zdolność syntetyzowania tego związku u myszy jest uwarunkowana genetycznie (66).

Szlak biosyntezy galaktobiozoceramidu nie jest jeszcze znany. Wiadomo jedynie, że leukocyty ludzkie zawierają system enzymatyczny przenoszący galaktozę z UDP-galaktozy na nieznaną akceptor z utworzeniem galaktobiozoceramidu, przy czym nie stwierdzono powstawania galaktoceramidu jako związku pośredniego (95), być może na skutek wielkiej szybkości reakcji.

VI. Gangliozydy

Gangliozydy, wykryte w 1942 roku przez Klenka (82) w substancji szarej mózgu, stanowią grupę glikolipidów, w których skład oprócz ceramidu, glukozy, galaktozy i, zazwyczaj, N-acetyllogalaktozoaminy wchodzi kwas N-acetylneuraminowy, zwany też kwasem sialowym (NANA) lub, rzadziej, kwas N-glikoloneuraminowy (139). Normalny mózg zawiera najwięcej GM_1 -monosialogangliozydu. GM_2 , stanowiący 3—5% gangliozydów mózgu ludzi zdrowych, zwany jest gangliozydem Tay-Sachsa, gdyż w schorzeniu tym stanowi 95% gangliozydów (108). GM_3 -gangliozyd, zwany hematocydem stanowi główny glikolipid erytrocytów niektórych ssaków, na przykład psa. Analogiczny związek, w którym kwas sialowy zastąpiony jest kwasem N-glikoloneuraminowym występuje w krwinkach innych ssaków np. konia (63). Sialolipidy występują także w nerkach (94, 110, 111). Z badań nad przebiegiem wbudowywania glukozy do gangliozydów mózgu *in vivo* wiadomo, że najszybciej powstaje GM_1 i w następnej kolejności G_{D1A} (64).

Przypuszcza się, że cząsteczka gangliozydu powstaje raczej przez stopniowe wydłużanie łańcucha oligosacharydowego przyłączonego do ceramidu niż przez przeniesienie całego oligosacharydu z nukleotydu na prosty akceptor lipidowy. Kanfer (73) w 1965 roku wysunął hipotezę, iż końcowym etapem powstawania cząsteczki gangliozydu jest acylowanie oligohexosylosfingozyny. Podstawą tego przypuszczenia był fakt, że po podaniu dootrzewnowo lub domózgowo emulsji znakowanego glukoceramidu z detergentem, radioaktywne stają się głównie ceramid sfingomielin i cerebro-

zyd, a nie gangliozyd (73). Wydaje się jednak, że w tych warunkach zachodzi bardzo szybka degradacja cerebrozydu. Obecność detergentu przyspiesza degradację (54). Większość autorów uważa, że w biosyntezie gangliozydów akceptorem dalszych cząsteczek cukru jest laktoceramid (6, 77, 119). Schemat 2 przedstawia proponowany przez Kaufmana i wsp. (77) szlak powstawania gangliozydów mózgu.

Mózgi zarodków kurzych (77) oraz młodych szczurów (1) zawierają co najmniej trzy odrębne sialotransferazy.

Enzym katalizujący reakcję A (schemat 2) przenosi kwas sialowy na laktoceramid (I) z utworzeniem hematozydu-GM₃ (II). Akceptorami kwasu sialowego mogą być również laktoza, trójheksozyloceramid (VI) (reakcja A') oraz tetraheksozyloceramid (VII) (reakcja A''), ale nie mogą nimi być galaktoceramid, psychozyna ani monosialogangliozydy (1,4). Działanie analogicznej sialotransferazy z nerek, katalizującej wbudowywanie kwasu sialowego do monosialogangliozydów w obecności CMP-kwasu sialowego, UDP-galaktozy i UDP-N-acetyloglukozoaminy, pobudzane jest raczej przez trójheksozyloceramid (VI) niż laktoceramid (75), a więc zachodzi tam raczej reakcja A'. Zarówno enzym otrzymany z mózgu (4) jak i z nerek (75) różnią się optymalnym pH działania oraz termostabilnością od opisanego przez Jourdaina i wsp. (70) enzymu z gruczołów mlekowych, biorącego udział w syntezie sialolaktozy i sialoglikoproteidów.

W wyniku działania enzymu B na monosialogangliozyd (IV) powstaje dwusialogangliozyd G_{DIA} (V). Optymalne pH jego działania wynosi 6,5, jest on najbardziej termolabilny z trzech opisanych sialotransferaz (77). Akceptorem kwasu sialowego w przypadku działania enzymu C jest hematozyd (II), a kwas sialowy przyłączany jest do kwasu sialowego a nie do galaktozy. Reakcja ta, w odróżnieniu od poprzednich, wymaga obecności fosfatydyloetanoloaminy (77), fosfolipidu biorącego też udział w biosyntezie lipopolisacharydów (124, 125) i glikolipidów (78) bakteryjnych. Reakcję tę, również w odróżnieniu od reakcji A i B, przyspieszają histony. Optymalne pH reakcji wynosi 5,6 (77). Wszystkie trzy sialotransferazy *in vitro* działają jedynie w obecności detergentów (77). Niejednakowa wrażliwość na temperaturę, różnice w optymalnym pH, oraz różnorodność czynników przyspieszających poszczególne reakcje wskazują, że są to odrębne enzymy (77). Niestety dotychczas nie udało się ich rozdzielić.

W mózgu zarodków kurzych (134) oraz młodych szczurów (62) znajduje się również enzym przenoszący N-acetylogalaktozoaminę z UDP-galaktozoaminy na hematozyd (GM₃-gangliozyd) (II) z utworzeniem gangliozydu Tay-Sachsa (GM₂-gangliozydu) (reakcja a). Enzym z zarodków kurzych działa jedynie w obecności jonów Mn²⁺ (134), a enzym z młodych szczurów — Mg²⁺ (62). W homogenacie mózgu zarodka kurzego, we frakcji sedymentującej przy 3—39 000 g jako lekka warstwa nad głównym osadem, stwierdzono obecność galaktozylotransferazy przenoszącej galaktozę na N-acetylogalaktozoaminę gangliozydu Tay-Sachsa (III) z utworze-

niem monosialogangliozydu GM₁ (IV) (5). Enzym ten różni się od transferazy biorącej udział w syntezie laktoceramidu (6) tym, że wymaga obecności jonów Mn²⁺, które nie mogą być zastąpione przez jony Mg²⁺. Przenosi on również galaktozę na wolną N-acetylogalaktozaminę i glikoproteidy (5). Nie wiadomo jednak czy badany układ nie zawierał kilku galaktozylotransferaz.

Większość opisanych reakcji transglikozydacji zachodzi lepiej w warunkach beztlenowych (31, 62).

VII. Inne glikolipidy

W piśmiennictwie brak jest informacji na temat biosyntezy innych glikolipidów występujących w rozmaitych tkankach, na przykład globozydu — głównego glikolipidu erytrocytów ludzkich (152), czy złożonych glikolipidów o aktywności grupowej AB0. Dostępne są jedynie fragmentaryczne dane.

W mikrosomach śledziony, a także w homogenatach nerek, wątroby i szpiku kostnego szczura zachodzi przyłączanie galaktozy do laktoceramidu z utworzeniem galaktozylo-galaktozylo-glukozylo-ceramidu będącego prawdopodobnie prekursorem globozydu. Wydaje się, że działa tu odrębna galaktozylotransferaza, aktywowana przez jony Mn²⁺ i, w słabszym stopniu, przez jony Mg²⁺, bardziej termostabilna od enzymu biorącego udział w syntezie laktoceramidu (67).

Komórki HeLa zawierają układ enzymatyczny przyłączający fukozę do glikolipidów, być może także do glikolipidów o aktywności serologicznej H (79).

Opisane enzymy przenoszą na ogół cząsteczkę heksozy na różne akceptory z różną wydajnością. Być może, że inne glikolipidy powstają na bocznych szlakach metabolicznych, w których biorą udział te same enzymy co w syntezie gangliozydów. Mała aktywność enzymu wobec związków o budowie nieco różnej od właściwego akceptora powodowałaby powstawanie niewielkich ilości produktów. Nie jest wykluczone, że czasem wskutek niedostatecznej specyficzności enzymu wobec donatora następuje wbudowanie niewłaściwej heksozy, co powoduje być może zatrzymanie dalszej rozbudowy łańcucha, a w każdym razie powstanie „nietypowego” glikolipidu.

VIII. Glikozyloglicerydy

Ten rodzaj glikolipidów wykryli w kwiecie pszenicy Carter i wsp. (32) w 1956 roku. Dziś wiadomo, że stanowi on główny glikolipid chloroplastów roślin niższych (7, 121) i wyższych (150), występuje też w niezielonych częściach roślin (107), w błonie komórkowej bakterii, przede wszystkim gramdodatnich (129) i niektórych gramujemnych (151) oraz w tkance nerwowej ssaków (126, 135).

Niewiele jest jeszcze danych o biosyntezie tych związków u ssaków, nieco więcej wiadomo o ich powstawaniu u bakterii i roślin. U bakterii w syntezie dwuglikozyloglicerydów biorą udział dwa enzymy (92, 109, 142). Pierwszy, silniej związany z błoną substruktur komórkowych, przenosi pierwszą cząsteczkę cukru na dwugliceryd; drugi, rozpuszczalny, przenosi drugą cząsteczkę na monoglikozyd. Reakcję stymulują jony Mg^{2+} (92, 109), kwasy tłuszczowe (92) i czasami fosfolipidy (78); detergenty nie mają wpływu na reakcję. Powstawanie galaktozyloglicerydów u roślin niższych (81) i wyższych (101, 107, 122) katalizowane jest również przez szereg enzymów, z których enzym włączający pierwszą cząsteczkę cukru jest najsilniej związany z błoną komórkową (107). Jony Mg^{2+} i Mn^{2+} nie mają wpływu na reakcję (101), natomiast przyspiesza ją światło (122). Zarówno u bakterii (109) jak i roślin (101, 107) enzymy są wysoce specyficzne co do substratu i ilość przyłączonych cząsteczek cukru zależy od rodzaju kwasów tłuszczowych. Ostatnie wyniki badań nad *Eugleną gracilis* świadczą, że biosynteza tych związków zachodzić może przez kwas fosfatydylowy lub też, że zachodzi transacylacja o niewyjaśnionym mechanizmie (117). Wydaje się, że biosynteza u ssaków zachodzi podobnie. W mózgu wołu istnieje układ enzymatyczny przenoszący kolejno galaktozę z UDP-galaktozy na gliceryd z utworzeniem mono- i dwu- α -galaktozydów. Reakcję stymulują jony Mg^{2+} oraz dezoksychołan (114). Komórki HeLa posiadają dwa, silnie związane z błoną, układy enzymatyczne syntetyzujące tego typu związki. Jeden przenosi mannozę na dwuoleinian, drugi fukozę na dwupalmitynian. Oba enzymy działają tylko w obecności jonów Mg^{2+} . Wytrącanie acetonem powoduje dysocjację kompleksu enzym-substrat (9). Uderzająca jest duża specyficzność enzymów syntetyzujących glikozyloglicerydy w porównaniu do enzymów syntetyzujących sfingoglikolipidy: różnią one rodzaj kwasu tłuszczowego przyłączonego do glicerolu.

IX. Układy enzymatyczne biosyntezy glikolipidów

Na podstawie dotychczasowych badań można stwierdzić, że układ enzymatyczny syntetyzujący glikolipidy obejmuje szereg specyficznych glikozylotransferaz przenoszących pojedyncze cząsteczki heksoz z odpowiedniego nukleotydu na lipidowy akceptor z utworzeniem coraz bardziej rozbudowanych związków. Niektórzy autorzy przypuszczają, że jest to kompleks wieloenzymatyczny (6, 119), co tłumaczyłoby fakt, że dodanie do układu potencjalnego akceptora nie zawsze stymuluje reakcję. Następna cząsteczka cukru byłaby zatem przenoszona na połączenie akceptora z kompleksem wieloenzymatycznym. Przeciw tej hipotezie przemawia jednak odmienne pH optymalnego działania enzymów syntetyzujących glikolipidy, różne stałe K_m i V_m oraz zróżnicowana termostabilność tych enzymów itp.

Większość glikozylotransferaz działa jedynie w obecności jonów Mg^{2+} (3, 6, 31, 62) lub Mn^{2+} (3, 5, 6, 134). Wyjątkiem jest glikozylotransferaza ceramid:glukoceramid (6) oraz sialotransferazy (77) działające również w układzie nie zawierającym tych jonów. Stężenie jonów metali w miejscu syntezy glikolipidów jest jednym z czynników ograniczających syntezę. *Roseman* uważa, że niedobór tych jonów może być przyczyną powstawania w pewnych warunkach krótszych „niedokończonych” lipidów (119).

Enzym *in vitro* działa jedynie przy odpowiednim rozproszeniu akceptora, co można osiągnąć za pomocą detergentu (3, 6, 4, 62, 65, 77, 114), bądź adsorpcji na dużej powierzchni na przykład na celicie (99). Działanie detergentu zależy od jego charakteru jonowego, na przykład przyłączanie galaktozy do laktoceramidu przez mikrosomy wątroby jest przyspieszane przez obojętny detergent *cutscum* (izooktylofenoksy-polyoksyetanol) natomiast *Tween-20* nie ma wpływu na reakcję (67). Podobny może być mechanizm pobudzania syntezy dwusialogangliozydu przez histony — białka te wiążą gangliozydy (91).

Większość badań nad biosyntezą glikolipidów przeprowadzano z tkanką mózgową. Metodyka rozdziału tej tkanki na frakcje subkomórkowe nie jest jeszcze dokładnie opracowana i różni autorzy stosują rozmaite metodyki, wskutek czego wyniki nie zawsze można porównywać (37). Dane *Burtona* i wsp. (31) z 1958 roku o włączaniu znakowanej w pierwszym węglu galaktozy do glikolipidów, a dotyczące przede wszystkim biosyntezy galaktoceramidu, sugerowały, że 50% galaktozy włączane jest w mikrosomach, 5—15% w mitochondriach, 11—16% w jądrach, a 19—29% w zrębie błony. Wyniki prac późniejszych są rozbieżne. Na ogół uważa się, że biosynteza gangliozydów, podobnie jak glikoproteidów mózgu, odbywa się w synaptosomach, w których stwierdzono najwyższą aktywność sialotransferaz (36). *Basu* i wsp. (6, 77), *Kanfer* (74) stwierdzili, że największą aktywność glikozylotransferaz wykazuje frakcja sedymentująca między 12 a 30 000 g, a więc zawierająca przede wszystkim mitochondria i synaptosomy oraz część mikrosomów (37). Inni badacze: *Morell* i *Rodin* (99), *Fujino* i *Nakamo* (42), *Curtino* i wsp. (35), *Arce* i wsp. (1) wykrywali obecność glikozylotransferaz głównie we frakcji mikrosomalnej, sedymentującej przy 100 000 g. Przyłączanie grupy siarczanowej do cerebrozydu zachodzi przede wszystkim w mikrosomach (97). Synteza ceramidu z wolnych kwasów tłuszczowych ma miejsce przede wszystkim we frakcji mitochondrialnej (44), a z acylo-CoA — we frakcji mikrosomalnej (132). Tam też acylowana jest psychozyna (14). W komórkach HeLa fukoza wbudowywana jest do glikolipidów w gładkiej błonie wewnętrznej oraz w błonie plazmatycznej, natomiast N-acetyloglukozoamina — w błonie mikrosomalnej (104). W śledzeniu najwyższą aktywność galaktozylotransferaz stwierdzono we frakcji mikrosomalnej (67). Enzymy te są mocno związane z błoną i solubilizacja detergentami (10, 97) lub sonifikacja (97) zwiększa wielokrotnie ich aktywność *in vitro*.

Biosynteza glikoproteidów według większości autorów katalizowana jest bądź to przez kompleks wieloenzymatyczny związany z błoną mikrosomalną (55), która być może zmienia w trakcie tego procesu charakter z szorstkiego w gładki przez odszczepienie rybosomów (90), bądź też przez łańcuch glikozylotransferaz związanych z różnymi miejscami błony. W tym ostatnim przypadku biosynteza zaczynałaby się na błonie mikrosomów szorstkich, w których włączane są pierwsze cząsteczki cukru (przede wszystkim N-acetyloglukozoamina), kończyła zaś na błonie mikrosomów gładkich, gdzie włączane są przede wszystkim końcowe cukry i kwas siarowy (90, 98). *Bosman* i wsp. (10), na podstawie włączania znakowanej N-acetyloglukozoaminy do glikolipidów i glikoproteidów błony komórkowej komórek HeLa, uważają, że błony gładkie są miejscem integracji glikolipidów i glikoproteidów w podjednostki, które następnie łączą się dając błonę plazmatyczną. Fukoza wbudowywana byłaby w ostatnim etapie, już na błonie plazmatycznej. Rozpuszczalne glikolipidy powstawałyby jako prekursor glikolipidów błony lub też wskutek wypłukiwania z błony (10). Jest nadal kwestią otwartą czy i jakie istnieją powiązania między biosyntezą glikolipidów i glikoproteidów. Wydaje się, że niektóre enzymy biorą udział w biosyntezie tylko jednego rodzaju związków, na przykład sialotransferazy (77), inne być może działają w obu systemach jak galaktozylotransferaza przenosząca galaktozę na gangliozyd Tay-Sachsa i na glikoproteidy (5).

Za powiązaniem między szlakami biosyntezy obu typów związków świadczy system grup krwi AB0. Nośnikami specyficzności antygenowej w tym systemie są glikolipidy krwinkowe (61, 88) oraz rozpuszczalne glikoproteidy (147). Związki te składają się z jednakowego lub bardzo podobnego łańcucha oligosacharydowego, determinującego specyficzność serologiczną i odmiennej makrocząsteczki glikolipidowej lub glikoproteidowej. Przyłączanie ostatnich cząsteczek cukru do łańcucha kontrolowane jest przez geny grupowe. *Race* i wsp. (112) oraz *Ziderman* i wsp. (155) wykazali, że geny grupowe kontrolują aktywność odpowiednich glikozylotransferaz przyłączających właściwe cukry do prekursorów glikoproteidowych substancji grupowych. Nie ma dotychczas danych o biosyntezie glikolipidów grupowych. Interesujące wyniki uzyskano niedawno badając działanie N-acetylogalaktozaminotransferazy ze śluzówki żołądka świni, enzymu przekształcającego glikoproteid o aktywności H w substancję grupową A. Inkubowane z tym enzymem erythrocyty grupy 0 lub B nabywają cechy grupowej A (130). Wyniki te wskazywałyby, że ta N-acetylogalaktozaminotransferaza bierze udział zarówno w biosyntezie glikolipidów, jak i glikoproteidów, albo też, że erythrocyty zawierają również grupowe czynniki glikoproteidy. Za tym ostatnim przypuszczeniem przemawiają wyniki niektórych ostatnich prac (149).

Intensywność biosyntezy glikolipidów zależy od wieku. U kurcząt enzymy warunkujące tę syntezę wykazują największą aktywność w stadium

zarodka (3, 4, 6, 77, 134). Szczury zaczynają włączać parenteralnie podaną ^{14}C -galaktozę do glikolipidów dopiero w wieku 6 dni, maksimum inkorporacji przypada na 22-gi dzień, po czym następuje spadek aktywności do 1/3, mimo że ilość cerebrozydu w mózgu jeszcze rośnie (100). Rosenbergi Stern (123) wyróżniają trzy fazy wzrostu mózgu szczura (analogiczne okresy można wyróżnić u człowieka). I faza trwa do dwu tygodni życia — jest to okres gwałtownego wzrostu masy mózgu, II faza do piątego tygodnia, wzrost mózgu jest nieco wolniejszy, III faza do piątego miesiąca — wzrost mózgu jest jeszcze wolniejszy. Ilość cerebrozydu i gangliozydów rośnie w pierwszym i drugim okresie linearnie, proporcjonalnie do wzrostu masy mózgu. Po zakończeniu trzeciej fazy zaczyna się spadek ilości glikolipidów (123). Z wiekiem zmienia się również nieco skład jakościowy tych związków. Na przykład w gangliozydach młodych szczurów przeważa C-18 sfingozyna; z wiekiem wzrasta ilość C-20 sfingozyny osiągając u starych osobników 50% całkowitej ilości zasady. Zmienia się też skład kwasów tłuszczowych, na przykład kwas stearynowy stanowi główny kwas glikolipidów u zwierząt młodych, a u starszych wiekiem zwierząt zawartość kwasu stearynowego w gangliozydach lekko spada, a w cerebrozydzie stanowi już tylko minimalny procent (123).

Jednym z czynników przyspieszających wbudowywanie *in vitro* cukrów do gangliozydów jest czynnik wzrostowy nerwów, o którym wiadomo, że stymuluje *in vivo* wzrost tkanki nerwowej. Mechanizm działania tego hormonu jest nieznan (53).

Glikolipidy tkanki rakowej różnią się na ogół od glikolipidów tkanki normalnej nie tyle składem jakościowym co stosunkami ilościowymi. Wydaje się, że tkanka nowotworowa na skutek upośledzenia syntezy glikolipidów zawiera więcej związków o krótszym łańcuchu oligosacharydowym; u chomika fibroblasty nowotworowe zawierają dziesięciokrotnie więcej laktoceramidu, a pięciokrotnie mniej hematozydu niż fibroblasty normalne (60), a w komórkach nabłonkowych raka wątroby stosunek gangliozydów $G_{D1a}:GM_1:GM_2$ wynosi 1:12:117 zamiast 1:0,5:2,6, jak w komórkach zdrowych (15). Ostatnio z nowotworów wyodrębniono kilka nowych glikolipidów; niektóre z nich wydają się być „niewykończonymi” substancjami grupowymi (57). Być może, że znalezione w innych nowotworach, a nie występujące w zdrowych tkankach glikolipidy (52, 58, 59), są również takimi „niedosyntetyzowanymi” związkami.

X. Rozpad glikolipidów

Mówiąc o metabolizmie glikolipidów nie można zapominać, że jest to proces dynamiczny — w tkance zachodzi nie tylko ich biosynteza, ale również rozpad. Powstałe proste związki stanowiąc mogą budulec do resyntezy nowych lipidów. Egzogenne glikolipidy są hydrolizowane w jelicie

cienkim przez hydrolazy o optimum działania w słabo alkalicznym pH (18). Sok dwunastnicy zawiera też enzym katalizujący odwracalną reakcję syntezy i hydrolizy wiązania amidowego ceramidu (102). Nilson (103) wykazał, że 40—45% podanej w postaci glikolipidów sfingozyny zostaje wchłonięte jako niezmieniony cerebrozyd i szybko wbudowane do nowych glikolipidów. Podany domózgowo cerebrozyd rozkładany jest szybko do ceramidu i dalej do sfingozyny i kwasów tłuszczowych (86). Tkanka mózgowa zawiera szereg karboksylaz katalizujących rozpad przede wszystkim gangliozydów (87). W śledzienie rozkładane są głównie glikolipidy stromy krwinkowej — gangliozyd, laktoceramid i inne (72, 133).

W tkance nerwowej hydrolazy rozkładające glikolipidy znajdują się przede wszystkim we frakcji sedymentującej przy 800—12 000 g (11, 40, 47), w odróżnieniu od glikozydaz hydrolizujących jedynie drobne, rozpuszczalne w wodzie glikozydy (71), obecnych na ogół we frakcji sedymentującej przy 12 000—18 000 g (118) lub też w supernatancie po wirowaniu przy 100 000 g (39).

Z mózgu wyodrębniono i oczyszczono (91, 128) sialidazę rozkładającą dwu- i trójsialogangliozydy, hematozyd i sialolaktozę, ale nie działającą na monosialogangliozydy GM_1 i GM_2 ani na sialoproteidy (91). Analogiczna sialidaza występuje w nerkach i jelicie cienkim człowieka (84). Gangliozyd Tay-Sachsa, GM_2 , hydrolizowany jest przez inną sialidazę występującą w mózgu, jelicie cienkim, nerkach. Produktem reakcji jest trójheksocyloceramid (84).

Tkanka mózgowa zawiera też galaktozydazy. Gatt i wsp. (49, 50, 51) opisali enzym rozkładający laktoceramid do glukoceramidu. Enzym ten oczyszczono stukrotnie (50). Rozkłada on przede wszystkim gangliozyd GM_1 i tetraheksocyloceramid, ale działa również, choć słabiej, na krótsze glikolipidy — trój- i dwuheksocyloceramidy (47) oraz *p*-nitrofenylogalaktozyd (50). Galaktozydaza ta nie działa na galaktoceramid ani psychozynę (47). Galaktoceramid jest rozkładany przez odrębną galaktozydazę (11, 56), działającą również na laktoceramid, ale nie na wyższe glikolipidy, na przykład Gal-Gal-Glk-ceramid (12). Enzym ten oczyszczono pięciokrotnie. Występuje on w mózgu, śledzienie, nerkach i płucach (56). Badania porównawcze nad izozymami galaktozydazy u ludzi zdrowych i chorych z zespołem Hurlera sugerują, że rozpad gangliozydów warunkuje izozym o większej ruchliwości elektroforetycznej (68). Tkanka mózgowa zawiera też α -galaktozydazę rozkładającą galaktozyloglicerydy (114).

Tkanka nerwowa zawiera trzy N-acetyloheksozoamidazy (39), ale tylko jedna z nich, związana z frakcją sedymentującą przy 1000—25 000 g, odszczepia N-acetylogalaktozoaminę od trójheksocyloceramidu i, trudniej, od gangliozydu GM_2 . Reakcję przyspieszają jedynie detergenty kwaśne np. taurocholan, natomiast niektóre lipidy, między innymi gangliozyd GM_2 w przypadku trójheksocydu, reakcję hamują (40). Hydrolaza ta ma najwyższą ruchliwość elektroforetyczną spośród izozymów (106). Analogiczny

enzym znajduje się również w mięśniach (85).

W tkance nerwowej powstały z laktoceramidu glukoceramid rozkładany jest przez β -glukozydazę (45, 49, 51), o właściwościach fizykochemicznych bardzo zbliżonych do właściwości β -galaktozydazy rozkładającej galaktoceramid (12).

Enzymy katalizujące rozpad glikolipidów w śledzionie pełnią doniosłą rolę w usuwaniu produktów powstałych po hemolizie starych krwinek, przede wszystkim globozydu o budowie N-acetylogalaktozoaminylo-galaktozylo-galaktozylo-glukozyloceramidu (152). Sztucznie wywołana, np. przez podanie fenylohydrazyny, wzmożona hemoliza, a także podanie stromy krwinkowej powoduje wzrost aktywności hydrolaz śledziony i wątroby (72). Z supernatantu po wirowaniu przy 100 000 g homogenatu śledziony wyodrębniono i oczyszczono osiemdziesięciokrotnie glukozydazę aktywniejszą wobec glukoceramidu niż wobec p-nitrofenyloglukozydu (20, 21).

W homogenacie jelita cienkiego występuje galaktozydaza różniąca się od enzymów tkanki nerwowej wysoką aktywnością wobec galaktozylo-galaktozylo-glukozyloceramidu — produktu częściowego rozpadu globozydu (17, 18). Ta sama tkanka zawiera również enzym rozkładający galaktoceramid i glukoceramid, a także, słabiej, laktoceramid. Enzym ten wyodrębniono z frakcji sedymentującej przy 600—8 000 g i trzystukrotnie oczyszczono (19).

Mitochondria wątroby zawierają enzym rozkładający w obecności ATP, jonów Mg^{2+} oraz fosforanu pirydoksalu sfingozynę do aldehydu palmitynowego i dalej do kwasu palmitynowego (80).

Na ogół hydrolazy związane są silnie z błonami substruktur komórkowych skąd można je uwolnić dość drastycznymi metodami jak sonifikacją, ekstrakcją detergentami itp. (11, 12). W miarę starzenia się organizmu rośnie ilość rozpuszczalnych hydrolaz (13). Niektóre z nich są na tyle słabo związane, że do solubilizacji wystarcza kilkakrotne zamrożenie i rozmrożenie tkanki przed homogenizacją (46, 68, 106, 127). Brady i wsp. (20, 21) stwierdzili obecność rozpuszczalnej glukozydazy w homogenacie śledziony. Gatt (47) na podstawie podobieństwa właściwości występujących w mózgu hydrolaz glikolipidów (właściwości fizykochemicznych powodujących trudności z rozdzieleniem enzymów, podobieństwa optymalnego pH ich działania, stałych K_m , V_m itp.) wysunął przypuszczenie, iż są one składnikami wieloenzymatycznego kompleksu związanego z błoną lizozymalną. Kompleks ten katalizowałyby stopniowe odszczepianie końcowych cząsteczek cukrów z oligosacharydowego łańcucha glikolipidu (47). Działanie detergentami, sonifikacja, zamrażanie i rozmrażanie powoduje solubilizację całego kompleksu lub też tylko niektórych, słabiej związanych białek.

Wszystkie omawiane tu hydrolazy podobnie jak transferazy, a inaczej

niż enzymy hydrolizujące drobnocząsteczkowe glikozydy (118) działają *in vitro* jedynie w obecności detergentów (9, 12, 13, 40, 45, 46, 47, 49, 51, 54). Inne lipidy czasami przyspieszają (13) a czasami hamują reakcję (40). Prawdopodobnie i w tym przypadku utworzenie kompleksu lipidu z enzymem, będącego pierwszym etapem reakcji, uwarunkowane jest odpowiednią wielkością micelli. Detergent utrzymuje micelle w stanie odpowiedniego rozproszenia, lipid pomocniczy zapobiega zbyt wielkiej dyspersji lub też zapewnia odpowiednią konformację cząsteczki. Taurocholan przyspieszający większość reakcji katabolicznych powoduje koprecypitację cerebrozydu z cerebrozydazą (12).

Hydrolazy występują zarówno w mózgu zwierząt młodych i dojrzałych jak i starych (11, 13). Galaktozydaza rozkładająca galaktoceramid występująca raczej w podkorzu niż korze mózgowej (11) pojawia się u młodego szczura już na cztery dni przed okresem intensywnego gromadzenia cerebrozydu, a po okresie szybkiego wzrostu mózgu aktywność jej spada. Gangliozydazy pojawiają się równocześnie z początkiem gromadzenia gangliozydów, a aktywność ich maleje z wiekiem (13). Okres półrozpadu galaktoceramidu u noworodków szczura wynosi 45 dni, a gangliozydów 24 dni — jeżeli mierzyć go ilością uwalnianej N-acetylogalaktozaminy, zaś poniżej 10 dni — jeżeli mierzyć go ilością uwalnianej galaktozy (30) lub glukozy (64). W mikrosomach czas półtrwania gangliozydów jest nieco krótszy niż w zakończeniach nerwowych (64). Okres półtrwania egzogenego globozydu w wątrobie wynosi 3—4 dni (133). Brak któregoś z omawianych enzymów powoduje patologiczne nagromadzenie produktów lipidowych. Obserwuje się to w kilku schorzeniach neurologicznych tzw. lipidozach.

Brak enzymów rozkładających gangliozydazy w tzw. uogólnionej gangliozydozie (105) i chorobie Hurlera (68) powoduje nagromadzenie przede wszystkim gangliozydów GM₁; niedobór N-acetylogalaktozoamidazy w niektórych postaciach choroby Tay-Sachsa prowadzi do nagromadzenia GM₂ zwanego gangliozydem Tay-Sachsa (85, 106, 127). W chorobie Gauchera brak jest glukozydazy rozkładającej glukoceramid (22, 48). Brak enzymów powodujących rozpad glikolipidów stromy krwinkowej prowadzi do odkładania się odpowiednich związków w śledzionie, na przykład galaktozylo-galaktozylo-glukozyloceramidu przy braku odpowiedniej galaktozydazy w chorobie Fabry'ego (17, 18, 141) lub glukoceramidu przy braku glukozydazy w chorobie Gauchera (20, 21, 22, 72, 104, 120).

W przebiegu lipidoz obserwuje się często nagromadzanie się w tkankach również glikoproteidów. Jest sprawą otwartą czy przyczyną tego jest brak enzymu rozkładającego zarówno glikolipidy jak i glikoproteidy (68, 127), czy też, jak przypuszczają Matalon i wsp. (96) nagromadzone glikolipidy zmieniając strukturę błony utrudniają działanie enzymów roz-

kładających glikoproteidy. Svennerholm na podstawie obecnego stanu wiedzy o enzymach biorących udział w syntezie i rozpadzie gangliozydów, a także o genetycznie uwarunkowanych blokach enzymatycznych powodujących zaburzenia metabolizmu tych związków, zaproponował szlak ich przemiany przedstawiony na schemacie 3 (140).

Biosyn-teza		Degradacja	Gromadzony lipid, dziedziczne bloki metaboliczne
(3, 6, 35, 74, 95, 146)	ceramid ↓ Glk-cer ↑	(45, 49, 51)	Glk-cer, choroba Gauchera
(6, 65, 66)	↓ Gal-Glk-cer ↑	(47, 49, 50, 51)	
(1, 4)	↓ Gal-Glk-cer NANA ↑	(78, 91)	
(62, 134)	↓ GalNAc-Gal-Glk-cer NANA ↑	(40)	Tay-Sachsa GM ₂ i trójheksozyd
(5)	↓ Gal-GalNAc-Gal-Glk-cer NANA ↑	(47)	GM ₁ , uogólniona gangliozydoza i choroba Hurlera
(77)	↓ Gal-GalNAc Gal-Glk-cer NANA NANA(NANA) ↑	(91, 78)	

Schemat 3. Główny szlak przemiany gangliozydów mózgu z uwzględnieniem znanych bloków metabolicznych (wg 140)

Badania nad metabolizmem glikolipidów są jeszcze w stadium początkowym. Nie znamy pełnego szlaku ich powstawania, nie znamy bliżej specyficzności i innych właściwości enzymów biorących udział w tym metabolizmie; żaden z nich, prócz enzymu syntetyzującego ceramid, nie został oczyszczony. Nie znamy też miejsca w komórce, w którym zachodzi synteza. Nie wiadomo też nic o kontroli syntezy i rozpadu tych związków na poziomie komórkowym, oraz przyczyn jej zaburzeń w komórce nowotworowej. Podobieństwo glikolipidów i glikoproteidów nasuwa też pytanie o powiązania metabolizmu obu tych grup związków. Obecny stan badań pozwala jednak na zorientowanie się w problemie, na naszkicowanie hipotetycznych szlaków, na stawianie nowych pytań.

LITERATURA

1. Arce A., Maccioni H. F., Caputto R., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 52 (1966).
2. Balasubramanian A. S., Bachhawat B. K., *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 218 (1965).
3. Basu S., *Federation Proc.* **27**, 346 (1968).
4. Basu S., Kaufman B., *Federation Proc.* **24**, 479 (1965).
5. Basu S., Kaufman B., Roseman S., *J. Biol. Chem.* **240**, PC 4115 (1965).
6. Basu S., Kaufman B., Roseman S., *J. Biol. Chem.* **243**, 5802 (1968).
7. Benson A. A., Wisner R., Ferrani R. A., Miller J. A., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4740 (1958).
8. Blix G., *Z. Physiol. Chem.* **219**, 83 (1933), cyt. wg 91.
9. Bosman H. B., *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 122 (1969).
10. Bosman H. B., Hagopian A., Eyler E. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 573 (1969).
11. Bowen D. M., Radin N. S., *Biochim. Biophys. Acta* **152**, 587 (1968).
12. Bowen D. M., Radin N. S., *Biochim. Biophys. Acta* **152**, 599 (1968).
13. Bowen D. M., Radin N. S., *J. Neurochem.* **16**, 501 (1969).
14. Brady R. O., *J. Biol. Chem.* **237**, PC 2416 (1962).
15. Brady R. O., Borek C., Bradley R. M., *J. Biol. Chem.* **244**, 6552 (1969).
16. Brady R. O., Formice J. V., Koval B. J., *J. Biol. Chem.* **233**, 1072 (1958).
17. Brady R. O., Gal A. E., Bradley R. M., Martenson E., Warshaw A. L., Laster L., *New Engl. J. Med.* **276**, 1163 (1967).
18. Brady R. O., Gal A. E., Bradley R. M., Warshaw A. L., Laster L., *Federation Proc.* **26**, 277 (1967).
19. Brady R. O., Gal A. E., Kanfer N. J., Bradley R. M., *J. Biol. Chem.* **240**, 3766 (1965).
20. Brady R. O., Kanfer N. J., Shapiro D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 221 (1965).
21. Brady R. O., Kanfer N. J., Shapiro D. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 39 (1965).
22. Brady R. O., Kanfer N. J., Shapiro D., Bradley R. M., *J. Clin. Invest.* **45**, 1112 (1966).
23. Brady R. O., Koval G. J., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2648 (1957).
24. Brady R. O., Koval G. J., *J. Biol. Chem.* **233**, 26 (1958).
25. Brady R. N., Mari S. J. di, Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **244**, 491 (1969).
26. Braun P. E., Snell E. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 298 (1967).
27. Braun P. E., Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **243**, 3775 (1968).
28. Brundish D. E., Shaw N., Baddiley J., *Biochem. J.* **105**, 885 (1967).
29. Burton R. B., *Lipids and Lipidosis*, red. Schettler G., Berlin-Heidelberg-New York 1967, str. 122.
30. Burton R. M., Balfour Y. M., Gibbons J. M., *Federation Proc.* **23**, 230 (1964).
31. Burton R. M., Sodd M. A., Brady R. O., *J. Biol. Chem.* **233**, 1053 (1958).
32. Carter H. E., McCluer R. H., Slifer E. D., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 3735 (1956).
33. Clelend W. W., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **235**, 45 (1960).
34. Cumar F. A., Barra H. S., Maccioni H. J., Caputo R., *J. Biol. Chem.* **243**, 3807 (1968).
35. Curtino J. A., Calderon R. O., Caputto R., *Federation Proc.* **27**, 346 (1968).
36. Den H., Kaufman B., *Federation Proc.* **27**, 346 (1968).

37. Eichberg J. Jun., Whittaker V. P., Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **92**, 91 (1964).
38. Faure M., Informacja osobista.
39. Frohwein Y. Z., Gatt S., *Biochemistry* **6**, 2775 (1967).
40. Frohwein Y. Z., Gatt S., *Biochemistry* **6**, 2783 (1967).
41. Fujino Y., Ito S., *Biochim. Biophys. Acta* **152**, 627 (1968).
42. Fujino Y., Nakamo N., *Biochem. J.* **113**, 573 (1969).
43. Fujino Y., Zabin J., *J. Biol. Chem.* **237**, 2069 (1962).
44. Gatt S., *J. Biol. Chem.* **238**, PC 3131 (1963).
45. Gatt S., *Biochem. J.* **101**, 687 (1966).
46. Gatt S., *J. Biol. Chem.* **241**, 3724 (1966).
47. Gatt S., *Biochim. Biophys. Acta* **137**, 192 (1967).
48. Gatt S., Berman E. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 9 (1961).
49. Gatt S., Rapport M. M., *Israel J. Med. Sci.* **1**, 624 (1965).
50. Gatt S., Rapport M. M., *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 567 (1966).
51. Gatt S., Rapport M. M., *Biochem. J.* **101**, 680 (1966).
52. Graf L., Rapport M. M., *Cancer Res.* **21**, 1532 (1961).
53. Graves M., Varon S., McKhan S., *J. Neurochem.* **16**, 1533 (1969).
54. Gray G. M., *Biochem. J.* **94**, 91 (1965).
55. Hagopian A., Eylor E. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **129**, 447 (1969).
56. Hajra A. K., Bowen D. M., Kishimito Y., Radin N. S., *J. Lipid. Res.* **7**, 379 (1966).
57. Hakomori S. I., Andrews H. D., *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 225 (1970).
58. Hakomori S. I., Jeanloz R. W., *J. Biol. Chem.* **239**, PC 3606 (1964).
59. Hakomori S. I., Jeanloz R. W., *Federation Proc.* **24**, 231 (1965).
60. Hakomori S. I., Murukami W. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 254 (1968).
61. Hakomori S. I., Strycharz G. D., *Biochemistry* **7**, 1279 (1968).
62. Handa S., Burton R. M., *Federation Proc.* **25**, 586 (1966).
63. Handa S., Yamakawa T., *Jap. J. Exptl. Med.* **34**, 293 (1964).
64. Harzer K., Jatkevitz H., Sandhaff K., *J. Neurochem.* **16**, 1279 (1969).
65. Hauser G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 502 (1967).
66. Hauser G., Hildebrandt J., *Federation Proc.* **28**, 595 (1969).
67. Hildebrandt J., Hauser G., *J. Biol. Chem.* **244**, 5170 (1969).
68. Ho M. W., O'Brien J. S., *Science* **165**, 611 (1969).
69. Joffe S., Rapport M. M., Graf L., *Nature* **197**, 60 (1963).
70. Jourdain G. W., Carlson D. M., Roseman S. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 353 (1963).
71. Jungalwala F. B., Robins E., *J. Biol. Chem.* **243**, 4258 (1968).
72. Kampine J. P., Kanfer J. N., Gal A. E., Bradley R. M., Brady R. O., *Biochim. Biophys. Acta* **137**, 135 (1967).
73. Kanfer N. I., *J. Biol. Chem.* **240**, 609 (1965).
74. Kanfer N. J., *Lipids* **4**, 163 (1969).
75. Kanfer N. J., Blacklow R. S., Warren L., Brady R. O., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 287 (1964).
76. Karlson K. A., Martenson E., *Biochim. Biophys. Acta* **152**, 230 (1968).
77. Kaufman B., Basu S., Roseman S., *J. Biol. Chem.* **243**, 5804 (1968).
78. Kaufman B., Kundig F. D., Distler J., Roseman S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 312 (1965).
79. Kaufman R. L., Ginsburg V., *Exptl. Cell Res.* **50**, 127 (1968).
80. Keenan R. W., Maxam A., *Biochim. Biophys. Acta* **176**, 348 (1969).
81. Kenyon C., Ph. D. Thesis Harvard Univ., 1967 (cyt. wg 117).

82. Klenk E., *Z. Physiol. Chem.* **273**, 176 (1942), (cyt. wg 94).
83. Klenk E., Rennkamp F., Hoppe-Sejlers Z. *Physiol. Chem.* **273**, 253 (1942), (cyt. wg 29).
84. Kolodny E. H., Brady R. O., Quink J. M., Kanfer J. N., *Federation Proc.* **28**, 596 (1969).
85. Kolodny E. H., Brady R. O., Volk B. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **37**, 526 (1969).
86. Kopaczyk K. C., Radin N. S., *J. Lipid Res.* **6**, 140 (1965).
87. Korey R., Stein A., Brain Lipids and Lipoproteins and the Leukodystrophies, Proc. of Symp., Roma 1961, red. Folch-Pi, Bauer J., Edsenin J., 1963, str. 71.
88. Kościelak J., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 313 (1963).
89. Kościelak J., Hakomori S. J., Jeanloz R. W., *Immunochemistry* **5**, 441 (1968).
90. Lawford G. R., Schachter H., *J. Biol. Chem.* **241**, 5408 (1966).
91. Leibovitz Z., Gatt S., *Biochim. Biophys. Acta* **152**, 136 (1968).
92. Lennarz W. J., Talamo B., *J. Biol. Chem.* **241**, 2707 (1966).
93. Martenson E., *Biochim. Biophys. Acta* **116**, 296 (1966).
94. Martenson E., Glykolipid of Human Kidney, Geteborg 1966.
95. Martenson E., Yankee R., Kanfer N. J., *Federation Proc.* **26**, 277 (1967).
96. Matalon R., Dorfman A., Dawson G., Sweeley C. C., *Science* **164**, 1522 (1969).
97. McKhan G. M., Ho L. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 109 (1965).
98. Molnar J., Robinson G. B., Winzler R. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 1882 (1965).
99. Morell P., Radin N., *Biochemistry* **8**, 506 (1969).
100. Moser H. W., Karnkowsky M. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 1990 (1959).
101. Neufeld E. F., Hall C. C. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 503 (1964).
102. Nilson A., *Biochim. Biophys. Acta* **186**, 339 (1969).
103. Nilson A., *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 113 (1969).
104. Ockerman P. A., *Biochim. Biophys. Acta* **165**, 59 (1968).
105. Okada S., O'Brien J. S., *Science* **160**, 1002 (1968).
106. Okada S., O'Brien J. S., *Science* **165**, 698 (1969).
107. Ongun A., Mudd J. B., *J. Biol. Chem.* **243**, 1558 (1968).
108. Pascal T. A., Saifer A., *Neurochemistry* **16**, 301 (1969).
109. Pieringer R. A., *J. Biol. Chem.* **243**, 4894 (1968).
110. Puro K., *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 401 (1969).
111. Puro K., Keranen A., *Biochim. Biophys. Acta* **187**, 393 (1969).
112. Race C., Ziderman D., Watkins W. M., *Biochem. J.* **107**, 733 (1968).
113. Radin N. S., Martin F. B., Brown J. R., *J. Biol. Chem.* **224**, 499 (1957).
114. Rao K. S., Wenger D., Pieringer R. A., *Federation Proc.* **27**, 346 (1968).
115. Rapport M. M., Graf L., Alonzo N. F., *J. Lip. Res.* **1**, 301 (1960).
116. Rapport M. M., Graf L., Yasif J., *Arch. Biochem. Biophys.* **92**, 438 (1963).
117. Renkonen O., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **244**, 4899 (1969).
118. Robins E., Hirsch H. E., Emmons S. S., *J. Biol. Chem.* **243**, 4246 (1968).
119. Roseman S., Biochemistry of Glycoprotein and Related Substances, Proc. 4th Int. Conf. on Cystic Fibrosis of the Pancreas, II cz., red. Rossi E., Stol E., Roseman S., Basel S. Karger, New York 1968, str. 444.
120. Rosenberg A., Chargaff E., *J. Biol. Chem.* **233**, 1323 (1958).

121. Rosenberg A., Gounaux J., Milch P., *J. Lip. Res.* **7**, 733 (1966).
122. Rosenberg A., Gounaux J., *J. Lipid. Res.* **8**, 80 (1967).
123. Rosenberg A., Stern N., *J. Lipid. Res.* **7**, 122 (1966).
124. Rothfield L., Horecker B. L., *Proc. Nat. Acad. Sci U. S.* **52**, 939 (1964).
125. Rothfield A., Pearlman M., *J. Biol. Chem.* **241**, 1386 (1966).
126. Rumsby M. G., Rossiter R. J., *J. Neurochem.* **15**, 1473 (1968).
127. Sandhoff K., *F. E. B. S. Letters* **4**, 351 (1969).
128. Sassi A., Di Donato S., Tettamanti G., Zambotti V., *Proc. Fed. Europ. Biochem. Soc.*, F-12, Warszawa 1966.
129. Shaw N., Baddiley J., *Nature* **217**, 142 (1968).
130. Schenkel-Brunner H., Tuppy H., *Nature* **223**, 1272 (1969).
131. Sprinson D. B., Coulon A., *J. Biol. Chem.* **207**, 585 (1954).
132. Sribney M., *Biochim. Biophys. Acta* **125**, 542 (1966).
133. Statter M., Shapiro D., *Israel. J. Med. Sci.* **1**, 514 (1965).
134. Steigerwald J. G., Kaufman B., Basu S., Roseman S., *Federation Proc.* **25**, 586 (1966).
135. Stein J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **144**, 118 (1967).
136. Stodola F. H., Wickerham L. J., Scholfield C. R., Dutton H. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 176 (1962).
137. Suomi W. D., Agranoff B. N., *J. Lipid. Res.* **6**, 211 (1965).
138. Svennerholm E., Svennerholm L., *Nature* **198**, 688 (1963).
139. Svennerholm L., *J. Lipid. Res.* **5**, 145 (1964).
140. Svennerholm L., *Biochem. J.* **111**, 6p (1969).
141. Sweeley C. C., Kliensky B., *J. Biol. Chem.* **238**, PC 3148 (1963).
142. Talamo B., Lennarz W., *Federation Proc.* **24**, 479 (1965).
143. Thierfelder H., Klenk E., *J. Die Chemie de Cerebroside und Phosphitade*, Springer J., Berlin 1930, cyt. wg 91.
144. Thudichum J. L. W., Report of the Medical Officer of the privey Council, *Londyn* **3**, 113 (1874), cyt. wg 97.
145. Tomai Z. Y., Yamakawa T., *Jap. J. Exptl. Med.* **38**, 144 (1968).
146. Trams E. G., Brady R. O., *J. Clin. Inv.* **39**, 1546 (1960).
147. Watkins W. M., *Science* **152**, 172 (1966).
148. Wiegand, *Rev. Physiol. Biochem. Exptl. Pharmacol.* 1960, str. 190, cyt. wg. 91.
149. Whitmore N. B., Trabald N. C., Reed C. F., Weed R., *Vox Sanguinis* **17**, 289 (1969).
150. Whitermans J. F. G. M., *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 99 (1960).
151. Wilkinson S. G., *Biochim. Biophys. Acta* **164**, 148 (1968).
152. Yamakawa S., Nachimura S., Kumimura M., *Jap. J. Exptl. Med.* **35**, 201 (1965).
153. Yavin Z., Gatt S., *Biochemistry* **8**, 1692 (1969).
154. Zabin I., Mead J., *J. Biol. Chem.* **211**, 87 (1954).
155. Ziderman D., Gampert S., Smith Z. G., Watkins W. M., *Biochem Biophys. Res. Comm.* **29**, 56 (1967).

DANUTA HULANICKA *

Biosynteza cysteiny i jej regulacja w komórce bakteryjnej

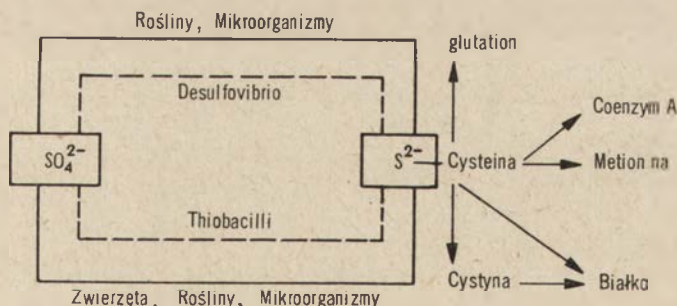
Biosynthesis of Cysteine and its Regulation in Bacteria Cell

Assimilatory sulfate reduction and cysteine formation are described. Some aspects of the cysteine biosynthesis are discussed.

Występowanie w świecie żywym siarki o różnej wartościowości, łatwość przechodzenia z jednego poziomu utleniania w inny, możliwość tworzenia różnorodnych połączeń z innymi atomami siarki oraz z tlenem uniemożliwiają pełne omówienie metabolizmu związków siarki w jednym artykule. W niniejszej publikacji główną uwagę poświęcono przedstawieniu asymilacyjnej redukcji siarczanu i regulacji tego procesu u bakterii.

I. Asymilacyjna i dysymilacyjna redukcja siarczanu

Redukcja nieorganicznego siarczanu z wytworzeniem związków zawierających dwuwartościową siarkę, na przykład cysteiny, jest wyłącznie własnością większości mikroorganizmów i roślin. Cały świat zwierzęcy jest zależny od dostarczenia cysteiny albo metioniny pochodzenia roślin-



Schemat 1. Cykl siarkowy w przyrodzie z zaznaczeniem centralnej roli cysteiny; metabolizm siarczanu asymilacyjny (——), dysymilacyjny (----)

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

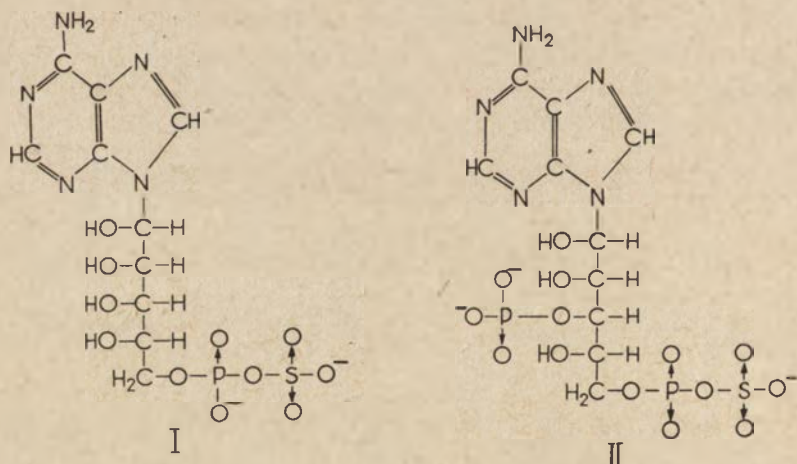
Wykaz stosowanych skrótów: APS — adenylosiarczan, PAPS — 3-fosfoadenylosiarczan, OAS — o-acetylo-L-seryna

nego lub bakteryjnego. Schemat 1 przedstawia cykl siarkowy w przyrodzie z zaznaczeniem centralnej roli cysteiny.

Istnieją dwa rodzaje redukcji siarczanu: asymilacyjny i dysymilacyjny. Redukcja asymilacyjna ma na celu przede wszystkim dostarczenie związków zawierających dwuwartościową siarkę do syntezy cysteiny — węzłowego związku w metabolizmie siarczanowym. Proces ten jest uniwersalny w świecie roślinnym i szeroko rozpowszechniony wśród mikroorganizmów.

U niektórych bakterii występuje inna droga redukcji siarczanu. Bakterie te czerpią energię z redukcji związków siarkowych. Droga ta nosi nazwę dysymilacyjnej (60). U *Desulfovibrio sulfuricans*, bezwzględnych beztlenowców, siarczan jest końcowym akceptorem elektronów w procesie oddychania. Ponieważ u tych bakterii ze względów energetycznych redukowane są duże ilości siarczanu, nadmiar powstałego siarczku jest wydzielany do środowiska, a częściowo tylko zużywany do syntezy cysteiny. W zasadzie przebieg reakcji w obu drogach jest analogiczny. Różnią się one jedynie tym, że w dysymilacyjnym metabolizmie siarczanu substratem reduktazy jest adenylilosiarczan (APS, I), a w asymilacyjnej 3'-fosfoadenylilosiarczan (PAPS, II). Dysymilacyjny metabolizm jest ekonomiczniejszy, gdyż redukcja APS zamiast PAPS umożliwia komórce zaoszczędzenie jednego mola ATP na jeden mol siarczanu.

Droga dysymilacyjna była w ostatnich latach przedmiotem szerokich badań w szeregu pracowni (7, 33, 45, 46), a w roku 1965 Postgate (47) omówił metabolizm tych bakterii. Szczegółowe przedstawienie tego procesu przekracza ramy niniejszego artykułu.



II. Biosynteza cysteiny

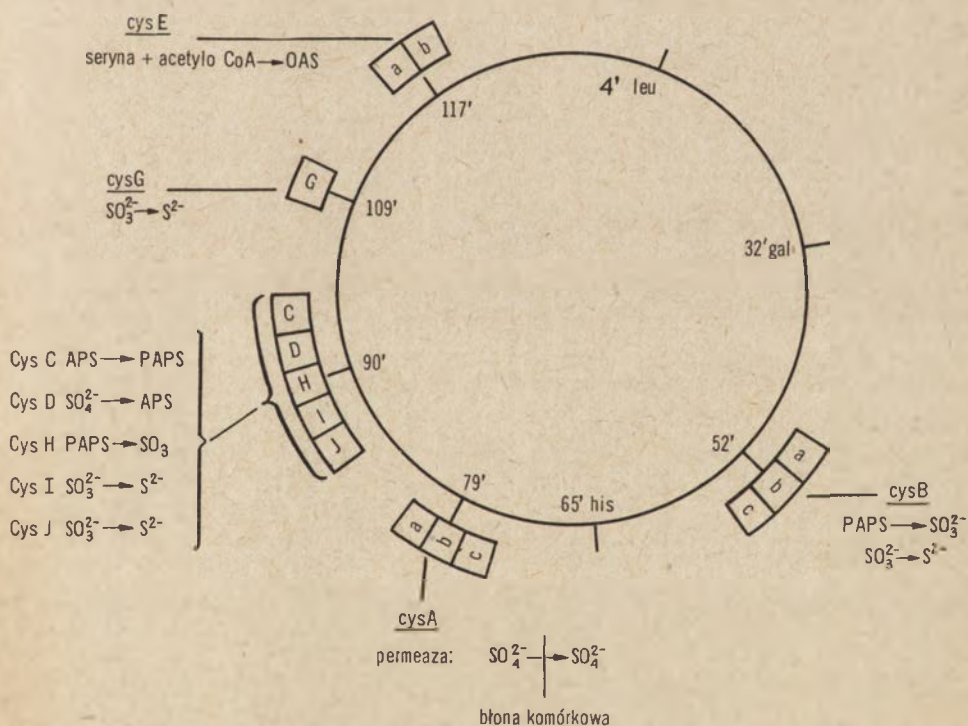
Poznanie poszczególnych etapów redukcji siarczanu z wytworzeniem cysteiny zawdzięczamy w dużej mierze Bandurskiemu i Wilsonowi (5, 60, 67), którzy u drożdży opisali reakcje prowadzące do wytwo-

zenia aktywnego siarczynu oraz pierwsi wprowadzili powszechnie dziś używane skróty PAPS i APS.

Niemalą pomocą w ustaleniu poszczególnych etapów biosyntezy cysteiny, podobnie jak przy poznawaniu innych dróg biosyntetycznych, były mutanty bakteryjne.

Mizobushi i wsp. (38) badając szereg mutantów cysteinowych *S. typhimurium* określili ich zapotrzebowanie wzrostowe oraz ustalili, że geny kodujące enzymy biosyntezy cysteiny tworzą pięć niezależnych jednostek transdukcyjnych. Dokładne mapowanie regionu *cysC* zostało opisane dwa lata później przez Demereca (9). Monty i wsp. badali od strony biochemicznej otrzymane mutanty (34, 35).

O ile biochemię syntezy cysteiny w komórce *E. coli* poznano równie dobrze jak u *S. typhimurium*, to genetyczna analiza tego procesu u tych bakterii została w pełni zbadana stosunkowo niedawno. Od szeregu lat biosyntezą cysteiny u *E. coli* zajmuje się wraz ze współpracownikami Pasternak z Uniwersytetu w Oxford (26, 42, 65). W roku 1968 ukazały się prace Jones-Mortimera z tej pracowni, zawierające wyniki mapowania mutantów cysteinowych *E. coli* (24). Zbadanie natury plejotropowych mutantów cysteinowych *E. coli* *cysE* i *cysB* umożliwiło wyjaśnienie mechanizmu kontrolującego syntezę cysteiny w komórce (25).



Rys. 1. Chromosom *Salmonelli typhimurium* z zaznaczeniem lokalizacji genów cysteinowych oraz reakcji przeprowadzonych przez poszczególne enzymy (według 24)

Na rysunku 1 przedstawiono chromosom *S. typhimurium* z zaznaczeniem lokalizacji genów biosyntezy cysteiny oraz reakcji sterowanych przez poszczególne geny. Do tej pory nie znaleziono mutantu *S. typhimurium* kodującego sulfhydrylazę o-acetyloseryny.

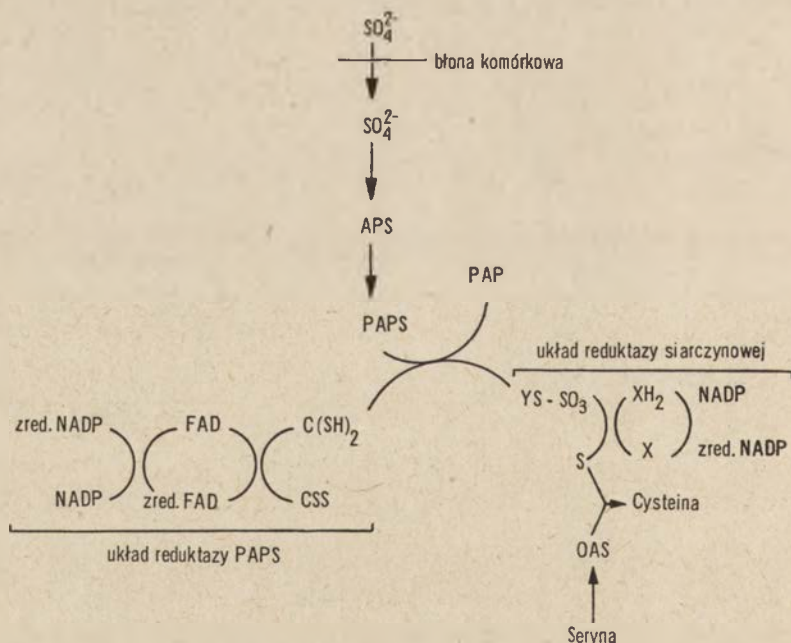
Zależność między genami a defektami enzymatycznymi przedstawiono w tablicy 1.

Metabolizm wewnątrzkomórkowego siarczanu można podzielić na trzy

Tablica 1.

Zestawienie genów biosyntezy cysteiny i kodowanych przez nie enzymów według (24)

<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
cysA permeaza SO_4^{2-}	cysA permeaza SO_4^{2-}
cysB regulatorowy	cysB regulatorowy
cysC APS kinaza	cysC APS kinaza
cysD ATP sulfurylaza	cysD ATP sulfurylaza
cysE transacetylaza serynowa	cysE transacetylaza serynowa
cysH reduktaza PAPS	cysH reduktaza PAPS
cysP	cysI } cysJ } cysG } układ reduktazy siarczynowej
cysQ	
cysG	



Schemat 2. Biosynteza cysteiny

CSS — białko transportujące atomy wodoru, wchodzące w skład reduktazy PAPS, YS-SO_3 — forma związana SO_3^{2-} z białkiem zawierającym grupy -SH

etapy. Pierwszy etap — to aktywacja wewnątrzkomórkowego jonu siarczanowego, drugi to redukcja siarczanu do siarczku poprzez siarczyn, a trzeci wprowadzenie jonu siarczku do związku organicznego, o-acetylo-L-seryny (OAS), z wytworzeniem cysteiny.

Schemat 2 przedstawia biosyntezę cysteiny, poszczególne etapy przebiegają analogicznie u mikroorganizmów i u roślin.

1. Aktywacja wewnątrzkomórkowego siarczanu

Permeaza. Pierwszym etapem przemiany siarczanowej jest pobranie SO_4^{2-} przez komórkę. U bakterii przejście przez błonę komórkową odbywa się na drodze aktywnego transportu, z udziałem permeazy siarczanowej (10).

Zagadnienie transportu siarczanu u *E. coli* jak dotąd jest mało zbadanym procesem. Natomiast permeaza siarczanowa *S. typhimurium* należy do jednego z nielicznych, stosunkowo dobrze poznanych systemów permeaz. Permeazę siarczanową koduje gen *cysA*. Analiza genetyczna mutantów (38) wykazała, iż gen ten składa się z trzech cistronów *cysAa*, *Ab* i *Ac*. Obecność w komórce wszystkich trzech nieuszkodzonych cistronów jest warunkiem pobrania przez komórkę jonu siarczanowego (10). Transport siarczanu do wnętrza komórki jest procesem zależnym od energii i temperatury. Powinowactwo układu transportującego do substratu jest stosunkowo wysokie ($K_m = 3,6 \times 10^{-5}\text{M}$).

Permeaza siarczanowa również przeprowadza jon $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ do wnętrza komórki, czyli ma podwójną funkcję (34), jednak siarczan jest substratem fizjologicznym. Mutanty *cysA* nie są zdolne do wzrostu ani na siarczanie ani na tiosiarczanie, nawet jeśli stężenie tych anionów jest 200-krotnie wyższe od stężenia umożliwiającego wzrost szczepu dzikiego. Tiosiarczan i siarczyn są silnymi kompetycyjnymi inhibitorami transportu siarczanu.

Kinetyka pobierania siarczanu przez komórki różni się od kinetyk innych układów transportujących. Pardee i wsp. (13) podają, iż w pierwszej minucie następuje gwałtowne pobranie siarczanu, w ciągu następnych dwóch minut zachodzi wydzielanie anionu przez komórkę, po czym ustala się równowaga.

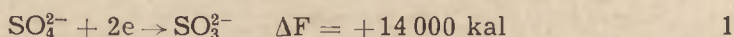
W dalszych pracach Pardee i wsp. (40) donoszą o wykryciu i wyodrębnieniu białka wiążącego SO_4^{2-} . Nawet mutanty *cysA* niezdolne do transportu SO_4^{2-} wykazują zdolność wiązania tego jonu. Sferoplasty lub komórki po szoku osmotycznym tracą zdolność wiązania SO_4^{2-} . Lokalizację białka wiążącego o niskim ciężarze komórkowym (32 000) opisano w dwa lata później (41).

Białko warunkujące wiązanie SO_4^{2-} stanowi część układu transportującego SO_4^{2-} . Pobieranie siarczanu przez komórkę regulowane jest przez dwa systemy kontrolne, represji oraz sprzężenia zwrotnego (ang. *feedback*). Te dwa systemy kontrolne umożliwiają komórce operatywne re-

gulowanie ilości siarczanu transportowanego do wnętrza komórki. Układ ten ulega represji i derepresji, w zależności od źródła siarki w pożywce; hodowla na cysteinie powoduje represję, natomiast wzrost przy ograniczonej ilości SO_4^{2-} lub w obecności kwasu L-djenkolowego powoduje derepresję (10). Fakt, iż permeaza może być zdereprimowana w nieobecności siarczanu (wzrost w obecności kwasu L-djenkolowego), dowodzi, iż układ ten nie jest systemem indukowalnym.

Cysteina jest również inhibitorem zwrotnym permeazy *E. coli* (25) i *S. typhimurium* (23). Wyniki uzyskane przez Hulanicką (23) wskazują silne hamowanie permeazy siarczanowej przez 0,1mM cysteinę u *S. typhimurium*. U *E. coli* Ellis (15) stwierdził zmniejszenie pobierania siarczanu przez komórkę w obecności L-cysteiny lub L-cystyny. Inne badane związki jak glutation, cysteamina, L-metionina, L-seryna i D-seryna nie miały wpływu na aktywność permeazy.

Aktywacja siarczanu. Redukcja siarczanu do siarczynu jest reakcją wymagającą dostarczenia dużych ilości energii.



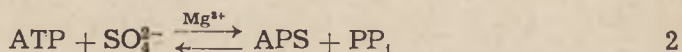
Dlatego też zanim wewnątrzkomórkowy siarczan zostanie zredukowany musi ulec aktywacji. W procesie tym powstaje adenylosiarczan. Z chwilą utworzenia wiązania fosforanowo-siarczanowego, grupa siarczanowa w APS może ulegać redukcji bądź przeniesieniu na inne związki. Jednak jedynie u *Desulfovibrio* samo utworzenie wiązania fosforanowo-siarczanowego w APS jest wystarczające, aby powstały związek uzyskał własności donora grupy siarczanowej. Natomiast u większości mikroorganizmów i u roślin konieczna jest dodatkowa fosforylacja z utworzeniem PAPS, powszechnie znanego jako aktywny siarczan (60). Z powodu tej dodatkowej grupy fosforanowej porównanie PAPS do acetylo-CoA przez Lipman a n n a (36) jest niezupełnie trafne.

Powszechność występowania PAPS w świecie żywym wskazywałaby, że powstanie aktywnego siarczanu jest nieodzownym etapem metabolizmu siarczanowego na wszystkich szczeblach rozwoju ewolucyjnego. Zwierzęta, chociaż nie posiadają zdolności redukcji siarczanu, wytwarzają PAPS, który zużywany jest do syntezy między innymi siarczano-węglowodanów i lipidów (20).

Enzymy aktywujące siarczan opisano u bakterii (12, 42), u *Neurospora* (4, 22), u drożdży (5) i u *Penicillium chrysogenum* (52). Istnieją dowody, iż fotosyntetyzujące organizmy jak *Chlorella* (63) i *Euglena* (2) również tworzą PAPS jako jeden ze związków pośrednich metabolizmu siarczanowego.

U wyższych roślin obecność sulfurylasy ATP stwierdzono w chloroplastach szpinaku. W literaturze brak jest danych o kinazie APS. Jednak dowodem pośrednim występowania kinazy jest fakt, że PAPS jest substratem dla reduktazy siarczanowej (4).

Aktywny siarczan powstaje stopniowo, w pierwszym etapie siarczan reaguje z ATP i powstaje APS.



Reakcja ta jest katalizowana przez adenylilotransferazę ATP: siarczan (EC 2.7.7.4) zwaną powszechnie w skrócie sulfurylazą. Reakcję tę badano w różnych układach zwierzęcych, roślinnych i bakteryjnych (42, 67). Mechanizm reakcji, niezależnie od pochodzenia enzymu, jest jednakowy. Równowaga reakcji ze względów energetycznych jest przesunięta w kierunku tworzenia ATP i siarczanu. Jednak dzięki obecności w komórce pirofosfatazy, usuwającej powstający PP_1 , reakcja przebiega z wytworzeniem APS.

Charakterystycznym rysem sulfurylazy jest niespecyficzność tego enzymu. Reaguje on ze wszystkimi anionami pierwiastków grupy VI układu okresowego. Jeśli substratem jest selenian powstaje adenylilofosforano-selenian. Prawdopodobnie tą drogą są syntetyzowane występujące w naturze związki selenowe. Z innymi anionami grupy VI, chromianami, molibdenianami i wolframianami, połączenia z AMP są bardzo nietrwałe.



W obecności tych anionów dochodzi do rozkładu ATP i strat energetycznych. Możliwe, iż tą reakcją wytłumaczyć można toksyczność tych anionów.

Następnym etapem w procesie aktywacji siarczanu jest reakcja APS z drugą cząsteczką ATP. Reakcja ta jest katalizowana przez enzym nazwany 3'-fosfotransferazą ATP: adenylilosiaraczan (EC 2.7.1.1.5.) lub w skrócie kinazą APS.

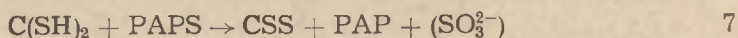
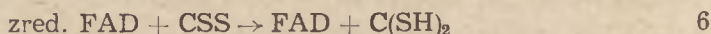
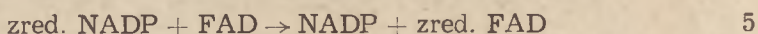


Druga grupa fosforanowa dołącza się do 3-go węgla rybozy.

2. Redukcja siarczanu

Drugi etap metabolizmu siarczanowego — reduktywne reakcje prowadzące do wytworzenia jonu siarczkowego, będącego bezpośrednim prekursorem atomu siarki w cysteinie, przebiegają analogicznie u bakterii (53), grzybów (52, 35), glonów (63) i u wyższych roślin (28, 59). Oczywiście istnieją różnice we właściwościach enzymów otrzymanych z różnych źródeł. Na przykład reduktaza siarczanowa z *S. typhimurium* wykazuje zdolność redukowania zarówno siarczanu, jak i azotynu (29, 55), natomiast oczyszczone preparaty z *Allium odorum* wykazują aktywność tylko względem siarczanu (59). Zredukowany NADP może służyć jako bezpośredni donor atomów wodoru dla preparatów reduktazy z *E. coli* lub z drożdży, natomiast oczyszczone preparaty otrzymane z liści *Allium* wykazują bardzo słabą aktywność wobec zredukowanego NADP.

Reduktaza PAPS. Redukcja siarczanu znajdującego się w komórce w postaci PAPS jest procesem złożonym, w którym bierze udział szereg enzymów. Przebieg procesu przedstawiają następujące reakcje:

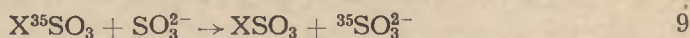


Pierwsze trzy reakcje katalizowane są przez enzymy wchodzące w skład systemu reduktazy PAPS, CSS jest białkiem transportującym wodory. Powstający siarczyn napisano w nawiasach celem zaznaczenia, że w komórce znajduje się on w postaci związanej.

Wilson i wsp. (66) ro. delili system reduktazy PAPS na enzymy A i B, białka wrażliwe na temperaturę, przeprowadzające reakcję (5) i (6) oraz na frakcję termostabilną, zawierającą grupy -SH.

Jak wspomniano wyżej produktem reakcji katalizowanej przez reduktazę PAPS jest prawdopodobnie nie wolny siarczyn, ale raczej jeszcze nie scharakteryzowany kompleks siarczynu z białkiem zawierającym grupy -SH (62). Za istnieniem takiego kompleksu przemawia fakt niemożności odizolowania produktu reakcji. Grupa (SO_3^{2-}) jest prawdopodobnie dołączana do grupy -SH aminokwasu wchodzącego w skład enzymu A lub B albo białka CSS.

Torii i Bandurski (62) badając systemy otrzymane z drożdży stwierdzili spadek ilości grup -SH po dodaniu PAPS do mieszaniny zawierającej enzym A, B i zred. NADP. Zauważono również, iż związany siarczyn ulega wymianie z dodawanym wolnym siarczynem zgodnie z reakcją:

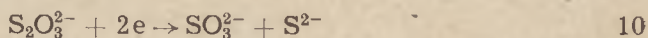


Odwracalną dysocjację powstałego kompleksu można by tłumaczyć redukcją podawanego *in vivo* siarczynu (3) oraz wydzielaniem wolnego siarczku podczas redukcji PAPS. Zagadnienie, czy siarczyn ulega dalszej redukcji jedynie w formie związanej, nie jest całkowicie rozstrzygnięte. Wydaje się, że tworzenie kompleksu siarczyn-białko u *S. typhimurium* jest niezbędnym warunkiem dalszej redukcji tego anionu. Natomiast preparaty z *E. coli* (29) i drożdży (21), redukują również siarczyn niezwiązany.

Zagadnieniem redukcji siarczanu u *S. typhimurium* zajmują się od szeregu lat Monty i wsp. (12, 34, 54). Redukcja siarczanu znajdującego się w komórce *S. typhimurium* w postaci PAPS uzależniona jest od obecności czterech cistronów Ba, Bb, Bc i H. Jak wyżej wspomniano, cztery białka biorą udział w reakcji redukcji PAPS do SO_3^{2-} : enzymy A i B, białko CSS oraz enzym katalizujący utlenianie zred. NADP. Zgodność między ilością enzymów a ilością cistronów na pierwszy rzut oka mogłaby sugerować, iż poszczególne cistrony warunkują syntezę poszczególnych białek.

Tak początkowo przypuszczali Dreyfuss i Monty (11). Założeniu temu jednak przeczą inne obserwacje. Gen *cysB* jest niezbędny również dla redukcji siarczynu do siarczku (11) oraz dla pełnego wykorzystania $S_2O_3^{2-}$ jako źródła siarki (34). Gen *cysB* wydaje się być genem regulatorowym zarówno u *E. coli* (24), jak i u *S. typhimurium* (57).

Nieorganiczny tiosiarczan może służyć jako źródło siarki dla wielu mikroorganizmów. Badania zapotrzebowania wzrostowego szeregu mutantów *Neurospora* i *Aspergillus* wykazały, że $S_2O_3^{2-}$, lub jego organiczne połączenia są pośrednikami w redukcji siarczynu (39, 48, 49). Dodanie tiosiarczanu do pożywki powodowało zmniejszenie włączania radioaktywnego siarczynu do cysteiny zarówno u *E. coli* (50), jak i u *S. typhimurium* (8). Na podstawie tych wyników uznano tiosiarczan za jeden ze związków pośrednich w biosyntezie cysteiny. Dopiero późniejsze prace (34) wykazały, że jon $S_2O_3^{2-}$ nie leży na głównym torze przemian siarczynu, a wykrywanie radioaktywności w cysteinie u bakterii hodowanych na radioaktywnym S_3S^{2-} jako źródle siarki, polega raczej na reduktywnym rozkładzie jonu $S_2O_3^{2-}$ zgodnie z następującą reakcją:

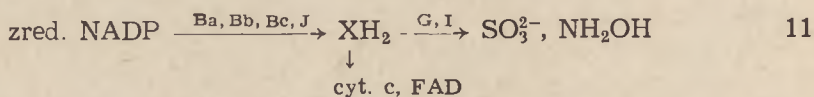


Mutanty *S. typhimurium*, które nie mogą wykorzystywać jonu siarczynowego jako źródła siarki nie rosną również na tiosiarczynie. Fakt ten wskazywałby, że siarczek jest jedynym prekursorem atomu siarki w cząsteczce cysteiny. Doświadczenia z mutantami nie zawierającymi reduktazy siarczynowej wykazały zużytkowanie tylko jednego atomu siarki (zewnątrznego) z cząsteczek tiosiarczynu (34). Asymilacja przez komórkę *S. typhimurium* tiosiarczynu jako alternatywnego źródła siarki jest reprimowana przez cysteinę, a ponadto siarczek jest silnym inhibitorem metabolizmu tiosiarczynu na zasadzie sprzężenia zwrotnego. W tym przypadku działają zatem również dwa znane mechanizmy regulujące — represja i sprzężenie zwrotne. U drożdży Kaji i McElroy (27) również stwierdzili przemianę tiosiarczynu w siarczyn i siarczek.

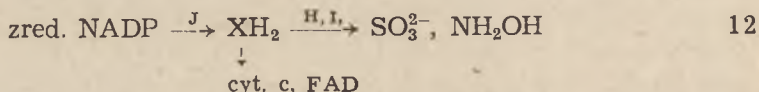
Reduktaza siarczynowa. W wielu pracach donoszono, iż enzymem katalizujący redukcję SO_3^{2-} , tzw. reduktaza siarczynowa, może utleniać zred. NADP nie tylko przy współudziale siarczynu, lecz także innych akceptorów elektronów, na przykład hydroksylaminy czy azotynów (14, 32, 37, 54).

Kemp i wsp. (29) otrzymali z *E. coli* oczyszczone 100—200-krotnie preparaty reduktazy siarczynowej, które mimo tak wysokiego stopnia oczyszczenia nadal wykazywały aktywność wobec hydroksylaminy i siarczynu. Doprowadziło to autorów do wniosku, iż jeden i ten sam enzym katalizuje reakcję utlenienia zred. NADP, w której akceptorami elektronów mogą być różne związki. W tej samej pracy autorzy donoszą o otrzymaniu mutantu *E. coli*, który nie miał aktywności reduktazy siarczynowej, ale wykazywał aktywność reduktazy zred. NADP: cytochrom c. Aktywność tej reduktazy ulegała represji, jeśli mutant hodowany był na cysteinie.

Dreyfuss i Monty (11) wykazali, że u *S. typhimurium* aktywność reduktazy siarczynowej, enzymu katalizującego redukcję siarczynu z udziałem zredu. NADP jako donatora wodoru, jest zależna od obecności w komórce sześciu cistronów Ba, Bb, Bc, G, I, J. W rok później Monty i wsp. (53, 55) opisali dalszy podział mutantów niezdolnych do redukcji siarczynu, opierając się na ich zdolności do redukowania innych akceptorów jak cytochrom c, hydroksylamina i FAD w układach zawierających zredu. NADP jako źródło wodoru. Mutanty te podzielili na 2 grupy: na mutanty Ba, Bb, Bc, J, które nie wykazują aktywności wobec żadnego akceptora oraz na mutanty G i I, które zachowały zdolność redukcji cytochromu c i FAD. Stwierdzono również koordynacyjną represję lub derepresję redukcji cytochromu c, hydroksylaminy i siarczynu w zależności od źródła siarki w hodowli. Autorzy zaproponowali następujący schemat:



W świetle późniejszych danych (57), jak i pracy Jones-Mortimer a (25) nad regulacją biosyntezy cysteiny wydaje się, że *cysB* jest genem regulatorowym i uszkodzenie jednego z trzech cistronów powoduje brak aktywności nie tylko reduktazy siarczynowej, ale i wszystkich enzymów cysteinowych. Aktualny schemat powinien więc wyglądać następująco:



Przeniesienie elektronów ze zredu. NADP na siarczyn lub hydroksylaminę zachodzi przynajmniej w dwóch etapach. Najpierw nieznaną związek pośredni „X” jest redukowany przez zredu. NADP bezpośrednio lub pośrednio, zdolność mikroorganizmu do jego redukcji jest zależna od genu *cysJ*. Z kolei „XH₂” może służyć jako donator elektronów dla redukcji cytochromu c i FAD. Jeśli komórka posiada nieuszkodzone geny *cysG* i *cysI*, „XH₂” może redukować siarczyn lub hydroksylaminę.

Dalsze badania enzymatyczne (53) wskazują, iż reduktaza siarczynowa ma dwa aktywne centra, jedno reaguje z cytochromem c i FAD, drugie z siarczynem i NH₂OH. Do wniosków tych autorzy doszli badając hamowanie redukcji cytochromu c oraz siarczynu przez NH₂OH. Stwierdzono, iż jedynie w przypadku redukcji siarczynu występuje kompetycyjne hamowanie. Również obserwacja, iż arsenin jest kompetycyjnym inhibitorem redukcji SO₂ i NH₂OH, a nie ma wpływu na redukcję cytochromu c przemawia za hipotezą istnienia dwóch centrów. Trzecim argumentem jest dowód genetyczny (55): zdolność do redukcji zarówno siarczynu, jak i NH₂OH zależy od tych samych cistronów.

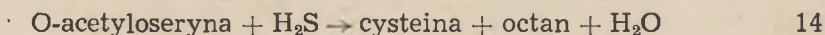
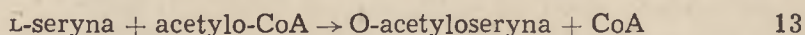
Istnienie różnic fenotypowych pomiędzy mutantem *cysI* i *cysJ* wskazuje, iż każdy z pięciu cistronów regionu *cys C, D, H, I* i *J* warunkuje osob-

ną funkcję i popiera twierdzenie Mizobuchi (38), że każdy z tych cistronów jest strukturalnym genem poszczególnych enzymów biosyntezy cysteiny.

3. Trzeci etap biosyntezy cysteiny

Końcowym etapem w biosyntezie cysteiny jest reakcja jonu siarczkowego ze związkiem organicznym. Doświadczenia izotopowe *in vivo* z *E. coli* wykazały, iż łańcuch cysteiny pochodzi z seryny (1). Początkowo uważano, że seryna reaguje bezpośrednio z jonem siarczkowym tworząc cysteinę. Z drożdży (51) i *E. coli* (43) wyodrębniono enzym, serynową sulfhydrylazę. Fizjologiczne znaczenie tego enzymu jest wątpliwe. Hodowla *E. coli* na cysteinie nie powoduje represji tego enzymu, a jego aktywność w porównaniu z aktywnością o-acetylo-serynowej sulfhydrylasy jest bardzo niska.

W 1966 roku Kredich i Tomkins (31) stwierdzili, że u *S. typhimurium* i *E. coli* sulfurylacja seryny do cysteiny przebiega dwuetapowo, zgodnie z następującymi reakcjami:



Reakcja pierwsza katalizowana jest przez transacetylazę serynową, druga przez sulfhydrylazę o-acetyloserynową. W następnych pracach (6, 30) Kredich i wsp. otrzymali z ekstraktów z *S. typhimurium* oczyszczone preparaty tych dwóch enzymów. Stwierdzili oni, że oba enzymy tworzą dwufunkcyjny białkowy kompleks nazwany przez autorów cysteinową syntetazą. Kompleks ten, o ciężarze cząsteczkowym 309 000, składa się z jednej drobiną transacetylazy serynowej (ciężar cząsteczkowy 160 000) oraz z dwóch drobin sulfhydrylasy o-acetyloserynowej (ciężar cząsteczkowy 68 000). OAS w stężeniu od 10^{-4} do 10^{-8} M powoduje odwracalną dysocjację kompleksu.

Występująca w kompleksie sulfhydrylaza o-acetyloserynowa stanowi tylko 5% całkowitej ilości enzymu, reszta występuje w stanie wolnym. Dane fizykochemicznej analizy obu białek wskazują, że obie sulfhydrylasy, związana i wolna, są identyczne. Za jednorodnością obu sulfhydrylaz przemawia możliwość tworzenia identycznego kompleksu z oczyszczonej wolnej sulfhydrylasy A i transacetylazy, która z sulfhydrylaz ma działanie fizjologiczne — trudno w obecnej chwili definitywnie określić.

Badania enzymatyczne mutantów *cysE* (30), wymagających do wzrostu cysteiny, wykazały normalny poziom aktywności sulfhydrylasy oraz bardzo niski albo zupełny brak aktywności transacetylazy. Na tej podstawie można przyjąć, że gen *cysE*, składający się z dwóch cistronów a i b, jest genem strukturalnym serynowej transacetylazy. Do tej pory nie znaleziono mutantu *S. typhimurium* z uszkodzonym genem o-acetyloserynowej sulfhydrylasy.

Jones - Mortimer i wsp. (24, 26) potwierdzili u *E. coli* dwuetapowość przejścia seryny w cysteinę. Również w świecie roślinnym przejście seryny w cysteinę zachodzi w dwóch etapach. Już w 1967 roku Giovannelli i Mudd (18, 19) oraz Thompson i Morris (61) stwierdzili, że OAS jest lepszym substratem dla roślinnej syntetazy cysteinowej niż seryna. Dopiero w 3 lata później (56) udało się wykryć aktywność serynowej transacetylazy w ekstraktach roślin wyższych. Dane te pozwalają przypuszczać, że u roślin podobnie jak i u bakterii i grzybów sulfurylacja seryny zachodzi poprzez o-acetyloserynę.

III. Regulacja biosyntezy cysteiny

Dotychczas znane są dwa modele regulacji procesów biosyntetycznych i katabolicznych w komórce bakteryjnej (17). Model kontroli negatywnej, zaproponowany przez Jacob i Monod, oraz model kontroli pozytywnej, opracowany przez Englesberga i współpracowników dla operonu arabinozy. Zasadniczym elementem w kontroli negatywnej jest założenie, że produkt genu regulatorowego zapobiega ekspresji genów, jak to ma miejsce w operonie histydyny czy laktozy. Natomiast w układach podlegających kontroli pozytywnej produkt genu regulatorowego jest niezbędny dla ekspresji genów. Przykładem układów podlegających pozytywnej kontroli jest redukcja azotanów u *Aspergillus nidulans* (44) oraz wyżej wspomniany operon arabinozy (58). W układzie tym produkt genu regulatorowego araC i L-arabinoza, która spełnia rolę induktora, są niezbędnymi czynnikami dla syntezy enzymów.

Regulacja biosyntezy cysteiny przypomina model regulacji operonu arabinozy.

Jones - Mortimer i wsp. (26) stwierdzili, iż dodanie o-acetyloseryny do hodowli *E. coli* powoduje indukcję enzymów cysteinowych. U *S. typhimurium* również ma miejsce indukcja enzymów cysteinowych pod wpływem OAS. Hulanicka (23) stwierdziła indukcję permeazy i enzymów aktywujących siarczany przez dodanie OAS do hodowli *S. typhimurium*.

Dalsze prace Jones - Mortimera (24) doprowadziły do wyjaśnienia mechanizmu regulacji biosyntezy cysteiny. Znalazł on wśród szeregu mutantów cysteinowych *E. coli* mutanty cysB i cysE, których ekstrakty nie wykazywały aktywności żadnego z enzymów cysteinowych. Wyniki mapowania wykazały, że nie są one sprzężone z żadnym genem strukturalnym cysteinowym, czyli ich plejotropowości nie można tłumaczyć delecją czy polarną mutacją.

Ekstrakty mutantu cysE wyhodowanego na podłożu zawierającym OAS wykazywały aktywność enzymów aktywujących i redukujących siarczany. A więc plejotropowość mutantu cysE wynikała z niemożności syntezy OAS

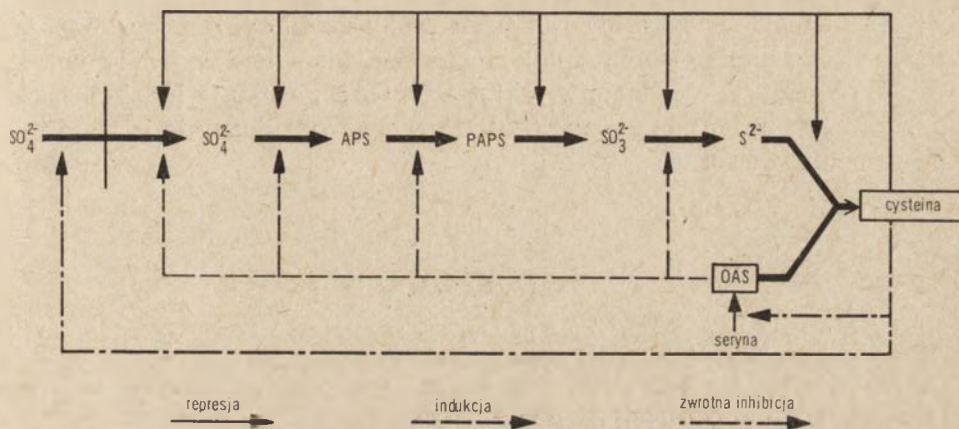
w komórce wskutek uszkodzenia genu *cysE*, kodującego transacetylazę serynową.

Oczywiście *o*-acetyloseryna nie miała wpływu na aktywność enzymatyczną mutanta *cysB*. Test dominacji wykazał, że allele *cysB*⁺ i *cysE*⁺ są dominujące wobec *cysB*⁻ i *cysE*⁻.

Na podstawie powyższych wyników, jak i poprzednich prac (24, 65) Jones - Mortimer (25) doszedł do wniosku, iż biosynteza cysteiny podlega pozytywnej regulacji. Aby w komórce doszło do syntezy enzymów cysteinowych powinny być spełnione trzy warunki:

- komórka powinna zawierać czynny gen *cysB*,
- stężenie cysteiny powinno być niższe od pewnej krytycznej wartości,
- komórka powinna zawierać induktor — *o*-acetyloserynę.

Jones - Mortimer (25) zaproponował schemat regulacji biosyntezy cysteiny u *E. coli* (schemat 3).



Schemat 3. Schemat regulacji biosyntezy cysteiny według (25)

Z poprzednich prac wiadomo było, iż hodowla na cysteinie powoduje represję enzymów cysteinowych (16), Pasternak i wsp. (43) stwierdzili, że represja enzymów redukujących siarczan nie jest koordynacyjna, ale różnicowa. Zakładali oni, iż operatory poszczególnych genów strukturalnych mają różne powinowactwo do represora, przy czym geny kodujące enzymy katalizujące etapy wcześniejsze są bardziej wrażliwe. Zauważyli oni bowiem, że komórki rosnące na pożywce zawierającej siarczyn lub siarczek zawierają więcej cysteiny niż komórki na pożywce z siarczanem. Tego rodzaju mechanizm pozwalałby komórkom rosnącym na związkach pośrednich nie syntetyzować enzymów katalizujących etapy wcześniejsze.

Wheldrake (64) wykazał istnienie odwrotnej zależności między specyficzną aktywnością enzymów aktywujących siarczan a stężeniem cysteiny w komórce. Synteza enzymów nie zależy jedynie od stężenia cystei-

ny w komórce, ale i od induktora OAS (schemat 3). Jednakże cysteina jest inhibitorem zwrotnym nie tylko permeazy, lecz także transacetylazy serynowej, która przekształca serynę w OAS. Spencer i wsp. (57) wzmiankowali, iż cysteina już w stężeniu $1,1\mu$ molarnym hamuje w 50% syntezę OAS w komórce *S. typhimurium*. Dlatego też cysteina reguluje swoją syntezę na zasadzie represji, ale będąc także inhibitorem zwrotnym transacetylazy serynowej, wpływa na poziom OAS w komórce, a tym samym na indukcję enzymów.

Wyżej opisany schemat opracowano na podstawie badań nad *E. coli* (24, 25). Ostatnie badania wskazują, że podobny mechanizm działa również i u *S. typhimurium*. Hulanicka (23) stwierdziła indukcję enzymów cysteinowych oraz zapobieganie procesowi indukcji przez dodanie do hodowli jednocześnie z induktorem OAS — triazolu, związku hamującego wzrost *S. typhimurium*. Doświadczenia wykazały, iż *in vitro* triazol nie wpływa na aktywność enzymów cysteinowych.

Jak widać z powyższych rozważań regulacja biosyntezy cysteiny jest procesem skomplikowanym i dotychczas nie całkowicie wyjaśnionym. Do chwili obecnej nie wiadomo w jaki sposób OAS powoduje indukcję enzymów, co jest produktem genu regulatorowego *cysB* i czy nie istnieją inne geny regulatorowe.

LITERATURA

1. Abelson P. H., *J. Biol. Chem.* **206**, 335 (1954).
2. Abraham A., Bachawat B. K., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 104 (1963).
3. Asahi T., *J. Biochem. (Tokyo)* **48**, 772 (1960).
4. Asahi T., *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 58 (1964).
5. Bandurski R. S., Wilson L. G., Squires C. L., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 6408 (1956).
6. Becker M. A., Kredich N. M., Tomkins G. M., *J. Biol. Chem.* **244**, 2418 (1969).
7. Bowen T. J., Happold F. C., Taylor B. F., *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 566 (1955).
8. Clowes R. C., *J. Gen. Microbiol.* **18**, 140 (1958).
9. Demerec M., Gillespie D. H., Mizobuchi K., *Genetics* **48**, 997 (1963).
10. Dreyfuss J., *J. Biol. Chem.* **239**, 2292 (1964).
11. Dreyfuss J., Monty K. J., *J. Biol. Chem.* **238**, 1019 (1963).
12. Dreyfuss J., Monty K. J., *J. Biol. Chem.* **238**, 3781 (1963).
13. Dreyfuss J., Pardee A. B., *J. Bacteriol.* **91**, 2275 (1966).
14. Ellis R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **85**, 335 (1964).
15. Ellis R. J., *Biochem. J.* **93**, 19 (1964).
16. Ellis R. J., Humphries S. K., Pasternak C. A., *Biochem. J.* **92**, 1967 (1964).
17. Epstein W., Beckwith J. R., *Annual. Rev. Biochem.* **37**, 411 (1968).
18. Giovanelli J., Mudd S. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **27**, 150 (1967).
19. Giovanelli J., Mudd S. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 275 (1968).

20. Gregory J. D., Robbins P. W., *Annual. Rev. Biochem.* **29**, 347 (1960).
21. Hilz H., Kittler M., Knape G., *Biochem. Z.* **332**, 151 (1959).
22. Hilz H., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **332**, 151 (1959).
23. Hulanicka D., VII Kongres PTBiochem. Wrocław 1969, str. 142.
24. Jones-Mortimer M. C., *Biochem. J.* **110**, 589 (1968).
25. Jones-Mortimer M. C., *Biochem. J.* **110**, 597 (1968).
26. Jones-Mortimer M. C., Wheldrake J. P., Pasternak C. A., *Biochem. J.* **107**, 51 (1968).
27. Kaji A., Mc Elroy W. D., *J. Bacteriol.* **77**, 630 (1959).
28. Kawashima N., Asahi T., *J. Biochem. (Tokyo)* **49**, 52 (1961).
29. Kemp J. D., Atkinson D. E., Ehret A., Lazzarini R. A., *J. Biol. Chem.* **238**, 3466 (1963).
30. Kredich N. M., Becker M. A., Tomkins G. M., *J. Biol. Chem.* **244**, 2428 (1969).
31. Kredich N. M., Tomkins G. M., *J. Biol. Chem.* **241**, 4955 (1966).
32. Lazzarini R. A., Atkinson D. E., *J. Biol. Chem.* **236**, 3330 (1961).
33. Le Gall J., Dragoni N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 145 (1966).
34. Leinweber F. J., Monty K. J., *Biol. Chem.* **238**, 3775 (1963).
35. Leinweber F. J., Monty K. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 782 (1965).
36. Lipmann F., *Science* **128**, 575 (1958).
37. Mager J., *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 553 (1960).
38. Mizobuchi K., Demerec M., Gillespie D. H., *Genetics* **47**, 1617 (1962).
39. Nakamura T., Sato R., *Nature* **185**, 163 (1960).
40. Pardee A. B., Prestidge L. S., Whipple M. B., Dreyfuss J., *J. Biol. Chem.* **241**, 3962 (1966).
41. Pardee A. B., Watanabe K., *J. Bacteriol.* **96**, 1049 (1968).
42. Pasternak C. A., *Biochem. J.* **85**, 44 (1962).
43. Pasternak C. A., Ellis R. J., Jones-Mortimer M. C., Crichton C. E. *Biochem. J.* **96**, 270 (1965).
44. Pateman J. A., Cove D. J., *Nature* **215**, 1234 (1967).
45. Peck H. D., Jr., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 112 (1966).
46. Peck H. D., Jr., Deacon T. E., Davidson J. T., *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 329 (1965).
47. Postgate J. R., *Bacteriol. Rev.* **29**, 425 (1965).
48. Ragland J. B., Liverman G. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 574 (1956).
49. Ragland J. B., Liverman G. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **76**, 496 (1958).
50. Roberts R. B., Abelson P. H., Cowie D. B., Balton E. T., Britten R. J. Carnegie Inst. Wash. Publ. No 607, 318 (1957).
51. Schlossman K., Lynen F., *Biochem. Z.* **328**, 591 (1957).
52. Segel I. H., Johnson M. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 216 (1963).
53. Siegiel L. M., Click E. M., Monty K. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 125 (1964).
54. Siegel L. M., Leinweber F. J., Monty K. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 2705 (1965).
55. Siegel L. M., Monty K. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 201 (1964).
56. Smith J. K., Thompson J. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **35**, 939 (1969).
57. Spencer H. T., Collins J., Monty K. J., *Federation Proc.* **26**, 677 (1967).
58. Sheppard D., Englesberg E., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **31**, 345 (1966).
59. Tamura G. J., *J. Biochem. (Tokyo)* **57**, 207 (1965).
60. Thompson J., *Annual. Rev. Plant Physiol.* **18**, 59 (1967).
61. Thompson J. F., Morris C. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 281 (1968).

62. Torii K., Bandurski R. S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 537 (1964).
63. Weddling R. T., Black M. K., *Plant Physiol.* **35**, 72 (1960).
64. Wheldrake J. F., *Biochem. J.* **105**, 697 (1967).
65. Wheldrake H. F., Pasternak C. A., *Biochem. J.* **96**, 276 (1965).
66. Wilson L. G., Asahi T., Bandurski R. S., *J. Biol. Chem.* **236**, 1822 (1961).
67. Wilson L. G., Bandurski R. S., *J. Biol. Chem.* **233**, 975 (1958).

RYSZARD RUDNICKI *

Biosynteza i przemiany kwasu abscysynowego w roślinach

Biosynthesis and Metabolism of Abscisic Acid in Plants

The site of plant biosynthesis and metabolic conversions of the new plant hormone — abscisic acid — and its related compounds are reviewed.

Rozwój ontogenetyczny rośliny jest uzależniony od działania szeregu czynników środowiskowych: światła, wilgotności, temperatury, których działanie zapoczątkowuje, wzmaga lub hamuje procesy życiowe.

Dotychczas uzyskane dane wskazują, że dominującą rolę w przekazywaniu bodźców środowiskowych układom metabolicznym, czynnym w organizmie roślinnym, pełnią niskocząsteczkowe związki chemiczne, zwane roślinnymi regulatorami wzrostu i rozwoju lub hormonami roślinnymi. Dzięki intensywnie prowadzonym w ostatnich latach badaniom określono rolę biologiczną tych związków, a w wielu przypadkach wyjaśniono częściowo mechanizm ich działania. Odnosi się to przede wszystkim do auksyn, giberelin i cytokinin, pobudzających wzrost i rozwój roślin.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat w wielu ośrodkach naukowych zajmowano się badaniem inhibitorów wzrostu, oddziaływających na procesy fizjologiczne, między innymi na opadanie liści i owoców, hamowanie wzrostu, spoczynek nasion i pąków, kiełkowanie nasion czy też kwitnienie. W wyniku tych badań znaleziono w roślinie nowy hormon roślinny o charakterze inhibitora wzrostu — kwas abscysynowy (ABA) (2, 38). Dalsze badania wykazały, że kwas abscysynowy indukuje w roślinach spoczynek pąków i nasion, pobudza odpadanie owoców i liści oraz, w niektórych roślinach, współdziała z giberelinami w kontroli kwitnienia.

Reakcje roślin na kwas abscysynowy i jego współdziałanie z innymi hormonami roślinnymi w regulacji wielu procesów fizjologicznych i biochemicznych opisano już w pracach przeglądowych (2, 14, 24, 38, 46). Podobnie omówiono już dane dotyczące wyodrębnienia tego związku z materiału roślinnego, jego występowania, budowy chemicznej oraz dane dotyczące działania ABA na układy metaboliczne podlegające kontroli znanych dotąd regulatorów wzrostu (2, 24, 38, 46, 49).

* Dr, Zakład Fizjologii Roślin Sadowniczych, Instytut Sadownictwa, Skierniewice
Wykaz stosowanych skrótów: ABA — kwas abscysynowy

Analogie strukturalne między kwasem abscysynowym i innymi regulatorami wzrostu roślin, a także różnorakie działanie ABA w roślinie i jego współdziałanie z innymi hormonami roślinnymi w regulowaniu procesów fizjologicznych i reakcji biochemicznych są powodem zainteresowania biosyntezą i przemianami tego związku. Można przypuszczać, że biosynteza i metabolizm ABA są ściśle związane z biosyntezą i metabolizmem innych hormonów roślinnych, w stosunku do których kwas abscysynowy działa często antagonistycznie. Chociaż drogi biosyntezy auksyn (25), giberelin (22, 31) i cytokinin (19) są mniej więcej wyjaśnione, to jednak miejsce i mechanizm biosyntezy kwasu abscysynowego w roślinie poznano dotychczas w niewielkim stopniu.

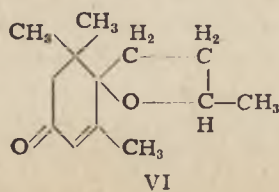
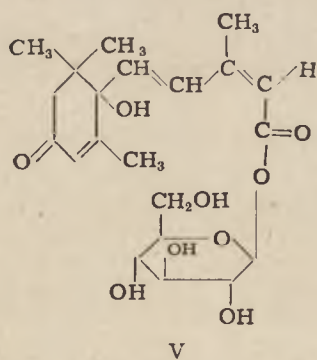
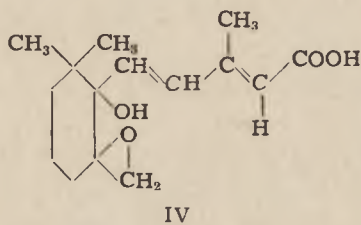
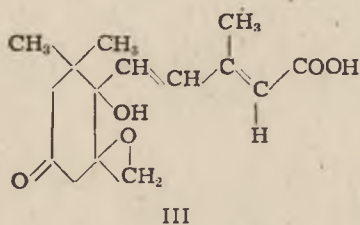
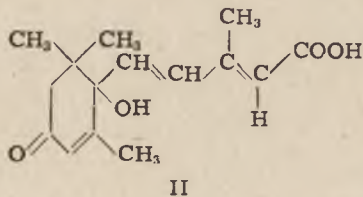
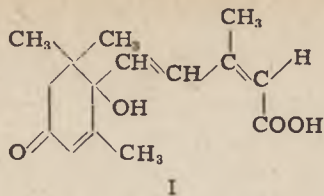
I. Kwas abscysynowy i jego naturalne analogi

Kwas abscysynowy wykryli O h k u m a i wsp. (1, 34, 35) jako czynnik przyspieszający odpadanie owoców bawełny. W a r e i n g i wsp. (9, 11, 37, 47, 48) znaleźli kwas abscysynowy w liściach roślin drzewiastych kilku gatunków i stwierdzili, że związek ten indukuje tworzenie się zimowych pąków spoczynkowych. Wykazano nadto, że kwas abscysynowy jest głównym składnikiem aktywnym tzw. „inhibitora β ”, występującego w większości roślin (28). O h k u m a i wsp. (34, 35) określili kwas abscysynowy jako kwas 3-metylo-5-(1-hydroksy-2,6,6-trójmetylo-2-cykloheksan-1-yl) *cis-trans* pentadienowy (I). Opracowano również spektropolarymetryczną metodę oznaczania ABA w ekstraktach roślinnych (7, 8).

Prowadzone przez wielu badaczy prace nad endogennymi czynnikami regulującymi odpadanie owoców i liści oraz inicjującymi spoczynek doprowadziły do wyodrębnienia z materiału roślinnego wielu związków o budowie i działaniu fizjologicznym zbliżonym do kwasu abscysynowego. Wyodrębniono w stanie krystalicznym i zidentyfikowano (2) izomer *trans-trans* kwasu abscysynowego (II), abscysylo-glukopiranozyd (V), kwas fazeinowy (III) i jego izomer *trans-trans* (IV), oraz teaspiron (VI). Spośród tych związków jedynie obydwa izomery przestrzenne kwasu abscysynowego *cis-trans* i *trans-trans* otrzymano na drodze syntetycznej.

Działanie fizjologiczne tych związków nie jest jeszcze dokładnie określone. Również w niewielkim stopniu poznano drogi ich biosyntezy i powiązania między nimi.

Naturalny kwas abscysynowy jest związkiem optycznie czynnym i występuje w roślinie jako (+) *cis-trans*-ABA (7). Syntetyczny kwas abscysynowy jest racematem i składa się z mieszaniny racemicznej izomerów (\pm) *cis-trans*-ABA i (\pm) *trans-trans*-ABA w stosunku 1:1. Początkowo uważano, że enancjomer (-) ABA jest nieaktywny biologicznie, jednakże M i l b o r r o w (30) stwierdził, że znacznie oczyszczone preparaty obu izomerów ABA wykazują podobną aktywność biologiczną.



Izomer *trans-trans* ABA wykryto w ekstraktach roślinnych w stosunkowo niewielkich ilościach (15, 41). Wyniki badań prowadzonych przez różnych badaczy nad aktywnością fizjologiczną izomeru *trans-trans* nie były jednoznaczne. Na niektóre procesy fizjologiczne, na przykład na kwitnienie, działa on podobnie do ABA, natomiast jego działanie jako inhibitora w testach wzrostowych jest nieznaczne (6, 27, 32, 42). Okazało się (5, 30), że naturalny *cis-trans*-ABA na skutek działania światła ulega fotochemicznej izomeryzacji do *trans-trans* izomeru dając mieszaninę obu izomerów w stosunku 1:1. Nieaktywny w biologicznych testach wykonywanych w ciemności izomer *trans-trans*-ABA przekształca się na świetle w *cis-trans*-ABA, co powoduje wystąpienie odpowiedniej reakcji fizjologicznej. Wyodrębnienie z materiału roślinnego izomeru *trans-trans*-ABA przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej (41) i gazowej (15) mogło być wynikiem fotochemicznego przekształcenia *cis-trans*-ABA podczas procedury ekstrakcji i chromatografii. Milborrow (30) wykazał, że izomer *trans-trans*-ABA stanowi około 3% całej zawartości kwasu abscysynowego w owocach dzikiej róży.

Kwas fazeinowy otrzymali MacMillan i Pryce (26) z nasion fasoli (*Phaseolus multiflorus*). Związek ten pełni w fasoli rolę stymulatora odpadania strąków. Milborrow (30) zidentyfikował kwas fazeinowy w owocach pomidora jako jeden z produktów przekształceń egzogenego ABA (30).

Glukozyd kwasu abscysynowego (abscysylo- β -D-glukopiranozyd) wyosobnili Koshimizu i wsp. (23) z owoców *Lupinus luteus*. Autorzy ci stwierdzili, że aktywność fizjologiczna tego związku jako inhibitora wzrostu w testach biologicznych jest dwukrotnie niższa od aktywności ABA.

Teaspirom wyodrębnili Ina i Sakato (21) z liści herbaty.

Dotąd nie opublikowano jeszcze żadnych danych dotyczących aktywności fizjologicznej kwasu *trans*-fazeinowego i teaspiromu. Wydaje się, że wszystkie wymienione wyżej związki są pierwszymi poznanymi przedstawicielami dużej grupy biologicznie czynnych pochodnych kwasu abscysynowego związanych z nim biosyntetycznie i charakteryzujących się podobnym działaniem fizjologicznym.

II. Miejsce biosyntezy kwasu abscysynowego w roślinie

Stwierdzenie w jakiej tkance roślinnej zachodzi biosynteza kwasu abscysynowego ma podstawowe znaczenie dla określenia roli fizjologicznej i mechanizmu działania tego związku. Określenie organu zdolnego do syntezy ABA jest również ważne dla poznania biosyntezy i przemian tego hormonu. Dotychczas większość danych uzyskano badając przemieszczanie ABA w roślinie (1, 2, 4, 10, 13, 20). Wareing i wsp. (11, 37, 47, 48)

stwierdzili, że biosynteza kwasu abscysynowego w roślinie zachodzi w liściach, skąd jest on transportowany do innych organów roślinnych. Kwas abscysynowy indukuje spoczynek zimowy roślin drzewiastych. W warunkach krótkiego dnia zawartość ABA w liściach zwiększa się silnie co zdaniem autorów jest wynikiem szybszej jego biosyntezy.

E v a n s (13) wykazał, że kwas abscysynowy może być transportowany z liści do wierzchołków wzrostu (akropetalnie). Natomiast przeprowadzone przez A d d i c o t t a (1) doświadczenia nad pobudzaniem przez kwas abscysynowy odpadania ogonków liściowych wskazują, że jest on transportowany w kierunku korzeni (bazypetalnie). Podobnie M i l b o r r o w (2) stwierdził, że transport znakowanego ^{14}C ABA w ogonkach liściowych zachodzi trzykrotnie silniej w kierunku bazypetalnym niż akropetalnym. D ö r f f l i n g i B ö t t g e r (10) wykazali, że kierunek transportu ABA w pędach rośliny z rodzaju *Coleus* zależy od wieku tych pędów. W młodych pędach związek ten jest transportowany głównie w kierunku korzeni, natomiast w starych pędach zarówno w kierunku bazypetalnym jak i akropetalnym.

Wyżej przedstawione dane wskazują, że synteza kwasu abscysynowego może zachodzić w liściach. W świetle wyników innych doświadczeń liście nie są jednak jedynym miejscem biosyntezy tego związku w roślinie. Ilościowa analiza kwasu abscysynowego w owocach truskawki, będących w różnych stadiach rozwojowych, wykazała kilkakrotnie większą zawartość tego związku w owocach dojrzałych (czerwonych) niż w niedojrzałych (zielonych) (41) (tablica 1).

W zerwanych z drzewa, niedojrzałych gruszkach (40) (tablica 2) i jabłkach (3), dojrzewanych bezpośrednio po zerwaniu z drzewa, a także w czasie dłuższego ich przechowywania w chłodni poziom kwasu abscysynowego zwiększa się kilkakrotnie.

Tablica 1

Stężenie (+)-ABA w owocach i liściach truskawki*, mierzone za pomocą testu biologicznego (I), pochłaniania w ultrafiolecie przy 260nm (II) i spektropolarymetrycznie (III)

Organ roślinny	I		II			III		
	izomer cis- -trans	izomery		suma	cis- -trans	trans- -trans	suma	
		cis- -trans	trans- -trans					
Czerwone dojrzałe owoce	70	67	47,9	114,9	109	47	156	
Białe niedojrzałe owoce	28	35	13,9	48,9	35	10	45	
Zielone owoce	22							
Liście	8							

* Owoce i liście zbierano 10 czerwca 1967 roku

Tablica 2

Zmiany zawartości kwasu abscysynowego w gruszkach odmiany Faworytka Klapsa podczas przechowywania w chłodni

Data pomiaru	Liczba dni przechowywania	Warunki przechowywania	Jędrność (w funtach)	Kolor (według 14-stopniowej skali)	Stopień dojrzałości	Zawartość ABA w $\mu\text{g}/\text{kg}$ świeżej masy
29.VIII.67	7	0°C	10,7	3,6	niedojrzałe	188
	7	18°C	2,0	14,0	dojrzałe	820
2 .IX.67	34	0°C	8,3	3,8	niedojrzałe	711
11.X.67	50	0°C	8,1	5,8	niedojrzałe	597
18.X.67	57	50 dni w 0°C + 7 dni w 18°C	2,6	12,9	dojrzałe	948
26.X.67	64	2 dni w 18°C + 62 dni w 0°C	3,8	8,8	częściowo dojrzałe	450
	64	4 dni w 18°C + 60 dni w 0°C	2,9	11,0	dojrzałe	900

Zaobserwowano, że w owocach awokado i pomidora traktowanych znakowanym ^{14}C kwasem mewalonowym następuje intensywne znakowanie kwasu abscysynowego (33, 36). Dane te wskazują, że w owocach zachodzi biosynteza kwasu abscysynowego *de novo*, niezależnie od biosyntezy w liściach. Pewne dane wskazujące na obecność inhibitora, o właściwościach fizjologicznych i chromatograficznych podobnych do ABA, w soku wydzielającym się z korzeni siewek jabłoni na wiosnę (H. Plich, niepublikowane dane) nie wykluczają również możliwości biosyntezy kwasu abscysynowego w korzeniach.

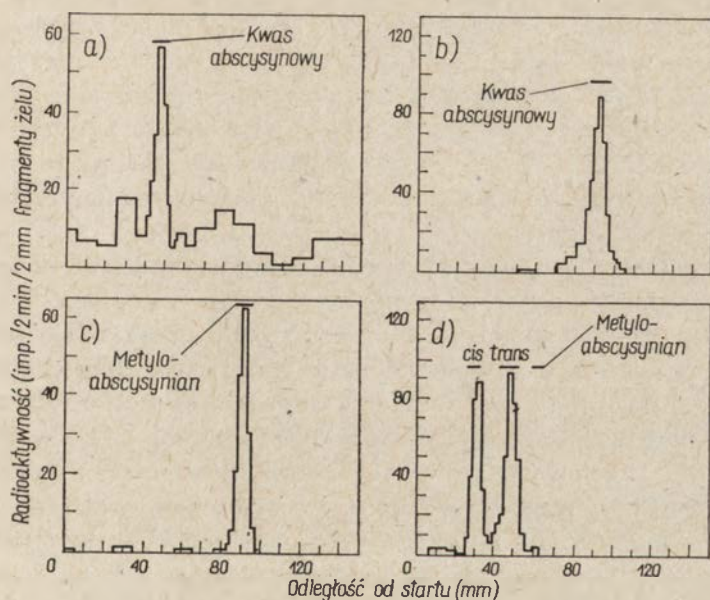
III. Mechanizm biosyntezy kwasu abscysynowego w roślinie

Struktura kwasu abscysynowego wskazuje na powiązania biosyntezy tego związku z biosyntezą karotenoidów. Wyniki dotychczasowych badań nad biosyntezą kwasu abscysynowego nie pozwalają na całkowite wykluczenie możliwości, że powstaje on z jakiegoś karotenoidowego prekursora.

Taylor i Smith (45) przypuszczają, że kwas abscysynowy wytwarza się z karotenoidów w wyniku ich rozpadu pod wpływem światła. Według tych autorów bezpośrednim prekursorem kwasu abscysynowego w roślinie jest wiolaksantyna. Po naświetleniu wiolaksantyny silnym światłem niebieskim udało się autorom otrzymać związek zachowujący się

podczas chromatografii podobnie do ABA i silnie hamujący kiełkowanie nasion *Lepidium*. Taylor i Smith przypuszczają, że wskutek zmniejszenia się zawartości chlorofilu w starzejących się liściach karotenoidy zawarte w tkance pochłaniają promieniowanie niebieskiej części widma. Konsekwencją tego jest bardziej intensywna degradacja fotochemiczna karotenoidów, być może z przekształceniem ich w kwas abscysynowy. Podwyższony poziom kwasu abscysynowego w liściach przyspiesza z kolei ich opadanie.

Hipotezy tej dotychczas nie potwierdzono w warunkach *in vivo*. Przeciwnie jej przemawiają dane o występowaniu ABA również w młodych liściach i owocach, a także fakt, że w niedojrzałych truskawkach synteza ABA zachodzi wcześniej niż występuje wybarwienie się owocu (39). Hipotezy



Rys. 1. Kochromatografia radioaktywnego (+) ABA i jego pochodnych z syntetycznym racemicznym kwasem abscysynowym

Mikrogramowe ilości syntetycznego ABA mieszano z radioaktywnym materiałem i chromatografowano na płytkach cienkowarstwowych z żelom krzemionkowym. Położenie plam ABA i związków pochodnych, lokalizowanych na chromatogramach w świetle ultrafioletowym o długości fali 254nm przedstawia linia pozioma na histogramach. Radioaktywność plam badano spektrometrycznie przy użyciu płynnego scyntyлятора

Histogramy: a) radioaktywność części ekstraktu po rozdzieleniu w układzie toluen:octan etylu:kwas octowy (15:3:1 v/v); b) strefa kwasu abscysynowego z histogramu a) chromatografowana w układzie propanol:butanol:amoniak:woda (6:2:2:1 v/v); c) strefa kwasu abscysynowego po chromatografii b), ABA przekształcono w ester metylowy i chromatografowano w układzie octan etylu:heksan (1:1 v/v); d) produkty po potraktowaniu estru metylowego z chromatografii c) za pomocą NaBH_4 , chromatografowane w układzie octan etylu:heksan (1:1 v/v)

teza ta nie tłumaczy również zależności między zawartością ABA w roślinie a zmianami fotoperiodycznymi. Zarówno analogie strukturalne, jak

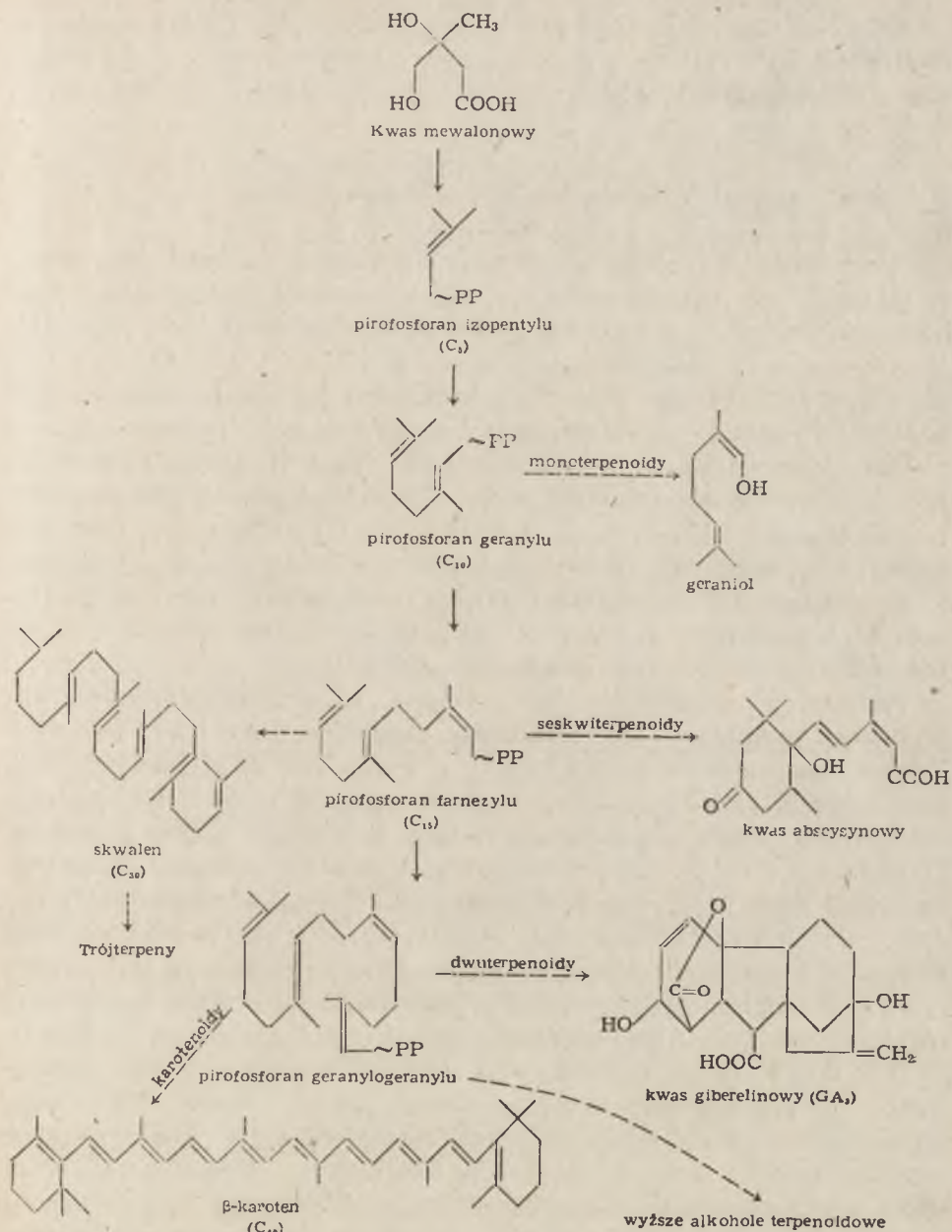
i dotychczas publikowane dane o biosyntezie kwasu abscysynowego w roślinie wskazują, że jest on syntetyzowany na tej samej drodze co wszystkie izoprenoidy.

Dokładniejsze poznanie mechanizmu biosyntezy kwasu abscysynowego stało się możliwe z chwilą zastosowania kwasu mewalonowego znakowanego węglem ^{14}C do badań nad biosyntezą ABA (33, 36). Powstawanie kwasu abscysynowego z kwasu mewalonowego badali N o d d l e i R o b i n s o n (33). Po inkubacji owoców avocado i pomidora z (\pm) kwasem mewalonywym znakowanym ^{14}C w pozycji 2 łańcucha, kwas abscysynowy wykazywał silną radioaktywność (rysunek 1).

R o b i n s o n i R y b a c k (36) używając kwasu mewalonowego podwójnie znakowanego trytem ^3H i węglem ^{14}C wykazali, że kwas abscysynowy powstaje w roślinie jako izomer *trans-trans*-ABA z *trans-trans*-farnesylo-pirofosforanu. W dalszym etapie biosyntezy następuje przekształcenie tego izomeru w kwas abscysynowy. Mechanizm tego przekształcenia nie jest dotychczas wyjaśniony, a próby wykrycia odpowiedniej izomerazy, podjęte przez M i l b o r r o w (30), nie powiodły się. Nie zidentyfikowano również bezpośredniego prekursora ABA powstającego z kwasu mewalonowego. R o b i n s o n i R y b a c k (36) uważają zatem, że nie można wykluczyć całkowicie, że ABA powstaje w tkankach roślinnych w wyniku degradacji karotenoidów.

Wiele danych wskazuje na ścisłą zależność między intensywnością biosyntezy izoprenoidów a cyklem rozwojowym rośliny. Zdaniem G o o d w i n a (16, 17), układ enzymatyczny syntetyzujący podstawowe terpenoidy (do C-15) znajduje się zarówno wewnątrz, jak i poza chloroplastami, natomiast układ enzymatyczny związany z syntezą specyficznych terpenoidów chloroplastów, jak fitol i karotenoidy, występuje tylko w chloroplastach. Zakładając selektywną nieprzepuszczalność membran chloroplastów dla kwasu mewalonowego w obu kierunkach Goodwin sądzi, że regulacja syntezy izoprenoidów w komórkach roślinnych zachodzi na skutek selektywnego uruchamiania tych dwóch układów enzymatycznych w zależności od warunków środowiska. Takie założenie tłumaczyłoby fakt wzmożonej biosyntezy trójterpenoidów i steroidów w ciemności i przewagę biosyntezy składników chloroplastów, tj. fitolu, karotenoidów i związków chinonowych na świetle.

Segregacja biosyntezy terpenoidów w komórkach roślinnych może umożliwiać regulację syntezy związków terpenoidowych w roślinie w zależności od warunków środowiska. Taki sposób regulacji biosyntezy izoprenoidów tłumaczyłby również różnice w poziomie niektórych hormonów roślinnych w zależności od warunków fotoperiodycznych. E a g l e s i W a r e i n g (11) wykazali, że w roślinach hodowanych w warunkach krótkiego dnia wzrasta poziom kwasu abscysynowego a zmniejsza się poziom giberelin, natomiast w warunkach długiego dnia zanika kwas abscysynowy a poziom giberelin się zwiększa. Powiązania między biosyntezą



Schemat 1. Prawdopodobny przebieg biosyntezy terpenoidów według Graebego (18)

giberelin i kwasu absycynowego ujmuje w skrócie schemat 1 zaproponowany przez Graebego (18).

Według schematu cząsteczka kwasu absycynowego tworzy się z trzech cząsteczek kwasu mawalonowego poprzez związki pośrednie: pirofosforan geranylu i pirofosforan farnesylu, przy czym ten ostatni jest wspólnym

prekursorem dla kwasu abscysynowego i giberelin. Nie można wykluczyć możliwości, że w roślinie istnieje kilka dróg biosyntezy kwasu abscysynowego, uruchamianych selektywnie w różnych stadiach rozwoju rośliny.

IV. Metabolizm kwasu abscysynowego

Efekt działania syntetycznego kwasu abscysynowego jest zróżnicowany w zależności od zastosowanego stężenia i sposobu podania roślinie tego hormonu. Stwierdzono, że działanie kwasu abscysynowego jest najsilniejsze gdy podawano go roślinie w sposób ciągły (11, 12, 43). Evans (13) zauważył, że ABA hamował silnie kwitnienie *Lolium temulentum* gdy podano go roślinie tuż przed momentem zakwitnięcia, natomiast wcześniejsze podanie ABA nie wywoływało tego efektu. Wykazano ponadto, że jakkolwiek kwas abscysynowy silnie pobudza odpadanie pozbawionych blaszek ogonków liściowych, to odpadanie całych liści było tylko nieznacznie stymulowane przez ten związek nawet w wysokim stężeniu. Wskazuje to na występowanie w roślinach układu rozkładającego lub inaktywującego ABA, przy czym aktywność tego układu jest zróżnicowana w zależności od organu i stadium rozwojowego rośliny.

Pierwszych danych o sposobie inaktywacji i metabolizmie kwasu abscysynowego w tkankach roślinnych dostarczył Milborrow (30). Zsyntetyzowane przez Cornforth i wsp. (15) dwa, znakowane na atomie węgla 2, izomery kwasu abscysynowego (\pm) ABA i (\pm) *trans-trans*-ABA podawał on w postaci roztworów wodnych pędem pomidora. Po inkubacji tkankę homogenizowano, ekstrahowano związki radioaktywne i rozdzielano je za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Gdy pędem podawano znakowany ABA, głównym produktem uzyskiwanym po ekstrakcji i chromatograficznym oczyszczeniu był radioaktywny abscylo- β -D-glukopiranozyd, natomiast gdy stosowano znakowany *trans-trans*-ABA, otrzymywano *trans-trans*-abscylo- β -D-glukopiranozyd (tablica 3).

Gdy tkankę roślinną przed podaniem znakowanych izomerów zagotowano, nie obserwowano glukozytacji kwasu abscysynowego. Kwas abscysynowy ulega zatem w tkankach roślinnych glukozytacji katalizowanej enzymatycznie. Dalsze doświadczenia wykazały, że izomer *trans-trans*-ABA nie ulega w tkankach roślinnych enzymatycznemu przekształceniu do ABA. Małą zawartość *trans-trans*-ABA w roślinie, nie przekraczającą 3% całkowitej ilości ABA, można natomiast wytłumaczyć znacznie większą szybkością przemiany tego związku w glukozyd w porównaniu z szybkością glukozytacji ABA (tablica 3).

Analiza spektropolarymetryczna niezwiązanych glukozydowo izomerów ABA i *trans*-ABA wykazała zwiększone ilości enancjomerów (—) ABA i (—) *trans*-ABA. Również przewagę enancjomerów (—) wykazano w obu izomerach ABA uwolnionych z glukozydów. Świadczy to, że nienatywne

(—) izomery ABA pochodzące z syntetycznego kwasu abscysynowego są przekształcane intensywniej w glukozydy od enancjomerów (+). Enancjomery (+) ABA i (+) *trans*-ABA ulegają natomiast łatwiej przekształceniu w tkankach roślinnych do kwasu fazeinowego (29, 30).

Nie wyjaśniono jeszcze dotychczas znaczenia tych wszystkich przemian

Tablica 3

Biosynteza abscysylo- i *trans*-abscysylo- β -D-glukopiranozydu z mieszaniny ABA i *trans*-ABA w pędach pomidora

	Masa izomerów niezwiązanych w glukozydzie	Masa izomerów po uwolnieniu z glukozydu
a) ABA	704	75
<i>trans</i> -ABA	331	736
b) ABA	1081	155
<i>trans</i> -ABA	186	1126

a) 15 godzin inkubacji 1655 μ g ABA i 1655 μ g *trans*-ABA w pędach pomidora o masie 75g. W hydrolizacie wodnym pozostało 4,9% niewyeksahowanego 14 C.

b) 24 godzin inkubacji, 1052 μ g ABA i 1952 μ g w *trans*-ABA w pędach pomidora o masie 75g. W hydrolizacie wodnym pozostało 7,7% niewyeksahowanego 14 C.

W obu doświadczeniach podawano mieszaninę 2mg (\pm)ABA (20 μ C/mM) i 2mg (\pm)*trans*-ABA (14 μ C/mM)

kwasu abscysynowego w roślinie. Stwierdzono natomiast, że około 20% ABA w owocach róży występuje w formie glukozydu, oraz, że związek ten jest jednym z głównych produktów wytwarzanych z (\pm) ABA przez kilka innych roślin (23, 30). Wskazuje to na duże znaczenie glukozydu ABA w całokształcie przemian tego hormonu w roślinie.

Abscysylo- β -D-glukopiranozyd nie ulega hydrolizie pod wpływem β -glukozydazy, gdyż ABA jest związany z cukrem wiązaniem estrowym. Natomiast, jak stwierdził Milbrow (30), glukozyd ABA ulega szybkiej hydrolizie pod wpływem esterazy, dlatego też trudno jest określić jakie jest jego działanie fizjologiczne. Nie wiadomo czy glukozyd ABA jest związkiem pośrednim w katabolizmie ABA, czy też pełni rolę magazynu nadmiaru ABA w roślinie. Trudno w tej chwili również powiedzieć, czy kwas fazeinowy jest jednym ze związków pośrednich w biosyntezie czy w degradacji kwasu abscysynowego w tkankach roślinnych.

W ostatnich latach otrzymano szereg syntetycznych analogów kwasu abscysynowego (44, por. 2). Badania nad oddziaływaniem tych związków na rośliny wykazały, że charakteryzuje je podobna do ABA aktywność fizjologiczna w różnych testach wzrostowych (44). Nie można więc wykluczyć, że szereg związków o podobnej do ABA budowie, utworzonych na drodze anabolicznej i katabolicznej kwasu abscysynowego, może spełniać podobną do ABA rolę w hormonalnej regulacji procesów biochemicznych i fizjologicznych w roślinie.

LITERATURA

1. Addicott F. T., Carns H. R., Lyon J. L., Smith O. E., McMeans J. L., *Regulateurs Naturels de la Croissance Vegetale C.N.R.S. Paris* 1964, str. 687.
2. Addicott F. T., Lyon J. L., *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **20**, 139 (1969).
3. Borecka H., Pieniążek J., *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. V* **16**, 655 (1968).
4. Bowen M. R., Hoad G. V., *Planta (Berlin)* **81**, 64 (1968).
5. Cornforth J. W., Mallaby R., Ryback G., *J. Chem. Soc. str.* 1565 (1968).
6. Cornforth J. W., Milborrow B. V., Ryback G., *Nature* **206**, 715 (1965).
7. Cornforth J. W., Milborrow B. V., Ryback G., *Nature* **210**, 627 (1965).
8. Cornforth J. W., Milborrow B. V., Ryback G., Rothwell K., Wain R. L., *Nature* **211**, 742 (1966).
9. Cornforth J. W., Milborrow B. V., Ryback G., Wareing P. F., *Nature* **205**, 1269 (1965).
10. Dörffling K., Bottger M., *Planta (Berlin)* **80**, 299 (1968).
11. Eagles C. F., Wareing P. F., *Physiol. Plantarum* **17**, 314 (1964).
12. El-Antably H. M. M., Wareing P. F., Hillman J., *Planta (Berlin)* **73**, 74 (1967).
13. Evans L. T., *Science* **151**, 107 (1966).
14. Galston A. W., Dawies P. J., *Science* **163**, 1288 (1969).
15. Gaskin P., MacMillan J., *Phytochemistry* **7**, 1699 (1968).
16. Goodwin T. W., w *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, red. T. W. Goodwin, New York 1965, str. 143.
17. Goodwin T. W., w *Biochemistry of Chloroplasts*, red. T. W. Goodwin, New York 1967, str. 721.
18. Graehe J. E., *Science* **157**, 73 (1967).
19. Helgeson J. P., *Science* **161**, 974 (1968).
20. Hoad G. V., *Life Sci.* **6**, 1113 (1967).
21. Ina K., Sakato Y., *Tetrahedron Letters* **23**, 2777 (1968).
22. Kopcewicz J., *Wiadom. Botan* **14**, 27 (1970).
23. Koshimizu K., Inui M., Fukui H., Mitsui T., *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **32**, 789 (1968).
24. Krzyśko K., *Kosmos* **18**, 27 (1969).
25. Maciejewska-Potapczykowa W., *Substancje Wzrostowe Roślin, P.W.R.i L., Warszawa* 1967.
26. MacMillan J., Pryce R. J., *Chem. Comm. str.* 124 (1968).
27. Milborrow B. V., *Planta (Berlin)* **70**, 155 (1966).
28. Milborrow B. V., *Planta (Berlin)* **76**, 93 (1967).
29. Milborrow B. V., *Chem. Comm. str.* 966 (1969).
30. Milborrow B. V., *J. Exptl. Bot.* **21**, 17 (1970).
31. Muromcew G. S., Pieńkow L., A., Gibereliny, P.W.R.i L., Warszawa 1964.
32. Nitsch C., *Ann. Sci. Nat. Botan. (Paris) Ser. 12*, **9**, 1 (1968).
33. Noddle R. C., Robinson D. R., *Biochem. J.* **112**, 547 (1969).
34. Ohkuma K., Addicott F. T., Smith O. E., Thiessen W. E., *Tetrahedron Letters* **29**, 2529 (1965).
35. Ohkuma K., Lyon J. L., Addicott F. T., Smith O. E., *Science* **142**, 1592 (1963).
36. Robinson D. R., Ryback G., *Biochem. J.* **113**, 895 (1969).
37. Robinson P. M., Wareing P. F., *Physiol. Plantarum* **17**, 314 (1964).
38. Rudnicki R., *Post. N. Roln.* **20**, 91 (1968).

39. Rudnicki R., Antoszewski R., *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. V*, **16**, 447 (1968).
40. Rudnicki R., Machnik J., Pieniżek J., *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. V*, **16**, 509 (1968).
41. Rudnicki R., Pieniżek J., Pieniżek N., *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. V*, **16**, 127 (1968).
42. Sondheimer E., Galson E. C., *Plant Physiol.* **41**, 1397 (1966).
43. Sumner D. C., Lyon J. L., *Planta (Berlin)* **75**, 28 (1967).
44. Tamura S., Nagao M., *Planta (Berlin)* **85**, 209 (1969).
45. Taylor H. F., Smith T. A., *Nature* **215**, 1513 (1967).
46. Van Overbeeck J., *Science* **152**, 721 (1966).
47. Wareing P. F., Eagles C. F., Robinson P. M., *Regulateurs Naturels de la Croissance Vegetale C.N.R.S., Paris 1964*, str. 376.
48. Wareing P. F., El-Antably H. M. M., Godd J. E. G., Manuel J., *Proc. Internat. Conf. on Growth Regulators in Plants, Roctock 1967*.
49. Wodzicki T. J., *Wiadom. Botan.* **13**, 173 (1969).

Komunikat

Komitet Mikrobiologiczny Polskiej Akademii Nauk oraz Redakcja wydawnictwa ciągłego *Postępy Mikrobiologii* uprzejmie zawiadamiają, że zamówienia na prenumeratę *Postępów Mikrobiologii* przyjmuje Ośrodek Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN.

W wydawnictwie ukazują się artykuły przeglądowo-poglądowe z różnych dziedzin mikrobiologii i kierunków ściśle pokrewnych.

Cena I tomu (rocznika) obejmującego zwykle 3 zeszyty po około 10 arkuszy wydawniczych wynosi średnio 100.— zł.

Rachunki za prenumeratę wydawnictw ciągłych zamawianych przez instytucje przesyłane są kwartalnie za dokonane w tym okresie dostawy. Na życzenie instytucji dostawa wydawnictw ciągłych może również odbywać się za pobraniem pocztowym. Natomiast rachunki dla odbiorców indywidualnych przesyłane są wraz z kolejnymi zeszycami wydawnictwa wyłącznie za pobraniem pocztowym.

Należność należy wpłacać na konto nr 1550-6-81574 w NBP VIII OM Warszawa-Ośrodek Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN lub Nr 1-6-100312 w PKO.

Zamówienia na prenumeratę — z pieczętką placówki, podpisami kierownika placówki i głównego księgowego jednostki regulującej należność oraz zamówienia odbiorców indywidualnych podpisane przez zamawiającego — należy przesyłać pocztą na adres:

OR PAN
Dział Prenumeraty Czasopism
Warszawa
Pałac Kultury i Nauki, pok. 1610

Jednocześnie informujemy, że Wzorcownia Wydawnictw Naukowych Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, piętro II, realizuje zamówienia na roczniki i pojedyncze zeszyty z lat ubiegłych.

grudzień, 1970

STANISŁAW KOHLMÜNZER *

Biosynteza alkaloidów indolowych

Biosynthesis of Indole Alkaloids

Recent results of biogenetic studies on formation of some groups of indole alkaloids are reviewed. The most important precursors as well as intermediate products in the biogenetic pathways are indicated and the role of isoprenoid compounds in biosynthesis of some indole alkaloids is emphasised.

Alkaloidy indolowe stanowią liczną grupę substancji roślinnych interesujących zarówno ze względu na swą strukturę chemiczną, jak i własności farmakologiczne. Znany obecnie ponad 600 związków z tej grupy (19, 42, 63), a ciągle pojawiają się dalsze doniesienia o wyosobnieniu nowych alkaloidów o nieznanym dotychczas strukturze.

Rozpowszechnienie alkaloidów indolowych w świecie roślinnym nie jest tak duże, jak mogłaby na to wskazywać liczba znanych związków. Zdolność biosyntezy tych połączeń wykazują głównie rośliny należące do rodzin *Apocynaceae*, *Loganiaceae* i *Rubiaceae*. Specjalną zdolność wytwarzania alkaloidów pochodnych kwasu lizerginowego i alkaloidów klawinowych spotykamy również u grzybów z rodzaju *Claviceps* (głównie *C. purpurea*) oraz niektórych gatunków roślin z rodziny *Convolvulaceae* (*Ipomea violacea*, *Rivea corymbosa*); podobnie alkaloidy należące do typu fizostygminy spotykane są w rodzaju *Physostigma* (*Leguminosae*), a należące do typu ewodiaminy i kantononu w rodzinie *Rutaceae*. Alkaloidy β -karbolinowe (grupy harmanu) występują głównie w rodzinie *Zygophallaceae* (*Peganum harmala*), *Passifloraceae* i *Eleagnaceae*. W rodzinie *Calycanthaceae* (*Calycanthus*, *Chimonanthus*) występują alkaloidy o ciekawej dimerycznej budowie.

Proste zasadowe związki indolowe (indoloalkilaminy), zaliczane przez niektórych autorów do alkaloidów względnie „protoalkaloidów”, występują w licznych taksonach botanicznych.

Nie jest wykluczone, że alkaloidy indolowe zostaną znalezione w roślinach należących do jeszcze innych jednostek systematycznych. Wykrycie

* Doc. dr, Zakład Farmakologii, Polska Akademia Nauk, Kraków

Wykaz stosowanych skrótów: C-S — alkaloidy typu *Corynanthe-Strychnos*, A — alkaloidy typu *Aspidosperma*, I — alkaloidy typu *Iboga*

alkaloidów typu sporyszowego (pochodne kwasu lizerginowego) w rodzinie *Convolvulaceae* (45) było na przykład zupełnie nieoczekiwane.

Szczególnie interesująca pod względem występowania alkaloidów indolowych jest rodzina *Apocynaceae* obejmująca około 1200 gatunków. Znaleziono tu ponad 300 alkaloidów indolowych, tj. większość znanych związków tego typu, przy czym rośliny zawierające te związki zgrupowane są głównie w podrodzynie *Plumerioideae* (41). Prawdziwym „rekordzistą” pod tym względem jest gatunek *Catharanthus roseus* G. Don. (syn. *Vinca rosea* L.), w którym występuje około 65 alkaloidów indolowych różnego typu (48).

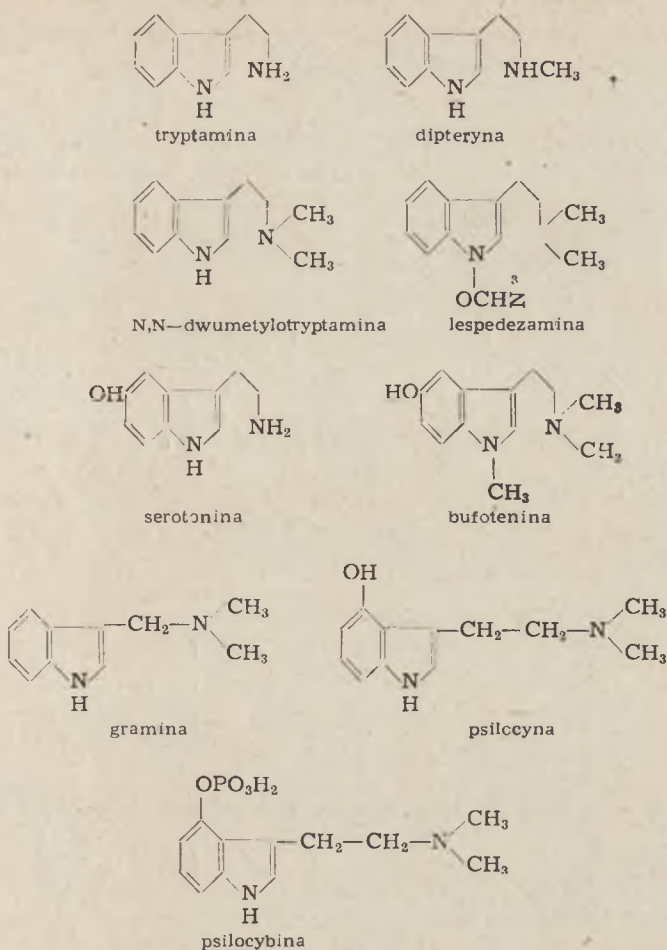
Liczne alkaloidy indolowe mają znaczenie farmakologiczne względnie toksykologiczne, z czego wynika również znaczne zainteresowanie ich biosyntezą w roślinach dostarczających surowców przemysłowych. Do najważniejszych z tych związków należą alkaloidy: rezerpina, strychnina, fizo-
stygmina, alkaloidy sporyszowe, alkaloidy *Vinca minor*, różnych gatunków *Strychnos* sp. (kurara kalebasowa), *Catharanthus roseus*, a także niektóre indoloalkiloaminy i β -karboliny (serotonina, psilocybina, bufotenina, harmina).

Wspólną cechą chemiczną wszystkich alkaloidów indolowych jest występowanie rdzenia indolowego względnie dwuhydroindolowego. Rdzeń ten zawiera jeden atom azotu, ale o charakterze alkaloidowym decyduje drugi zasadowy atom azotu, znajdujący się u większości alkaloidów w położeniu odległym o dwa atomy węgla od rdzenia indolowego. W zasadzie w odróżnieniu od indoloalkiloamin w prawdziwych alkaloidowych związkach indolowych ten drugi zasadowy atom azotu znajduje się w pierścieniu heterocyklicznym.

Osobną, nadzwyczaj interesującą pod względem biochemicznym grupę stanowią alkaloidy o dimerycznej strukturze symetrycznej (na przykład alkaloidy kurary lub *Calycanthus*) lub niesymetrycznej (na przykład winblastyna w *Catharanthus roseus*), zwane ostatnio ściślej alkaloidami bis-indolowymi (28). Do grupy tej należy kilka bardzo aktywnych biologicznie związków, na przykład alkaloidy kurary, winblastyna czy winkrystyna. Liczba poznanych alkaloidów tej grupy wzrosła ostatnio do ponad 60 (28, 43), przy czym prawie wszystkie związki tego typu o budowie niesymetrycznej znaleziono dotychczas w rodzinie *Apocynaceae* (rodzaje: *Voacanga*, *Catharanthus*, *Pleiocarpa*, *Tabernaemontana*), wyjątek stanowią tylko cynchofylamina i izocynchofylamina wykryte w rodzaju *Cinchona* (*Rubiaceae*).

Ze względu na strukturę można podzielić alkaloidy indolowe na kilka różnych typów, które będą dalej omówione. Ważniejsze zasadowe związki indolowe o charakterze protoalkaloidów (indoloalkiloaminy) przedstawia rysunek 1.

Nomenklatura chemiczna, obszerne dane dotyczące występowania i własności alkaloidów indolowych zawarte są w szczegółowych opracowaniach Manskego (63), Hesse (42), Trojanka i Blahy (78).



Rys. 1. Niektóre ważniejsze indoloalkiloaminy

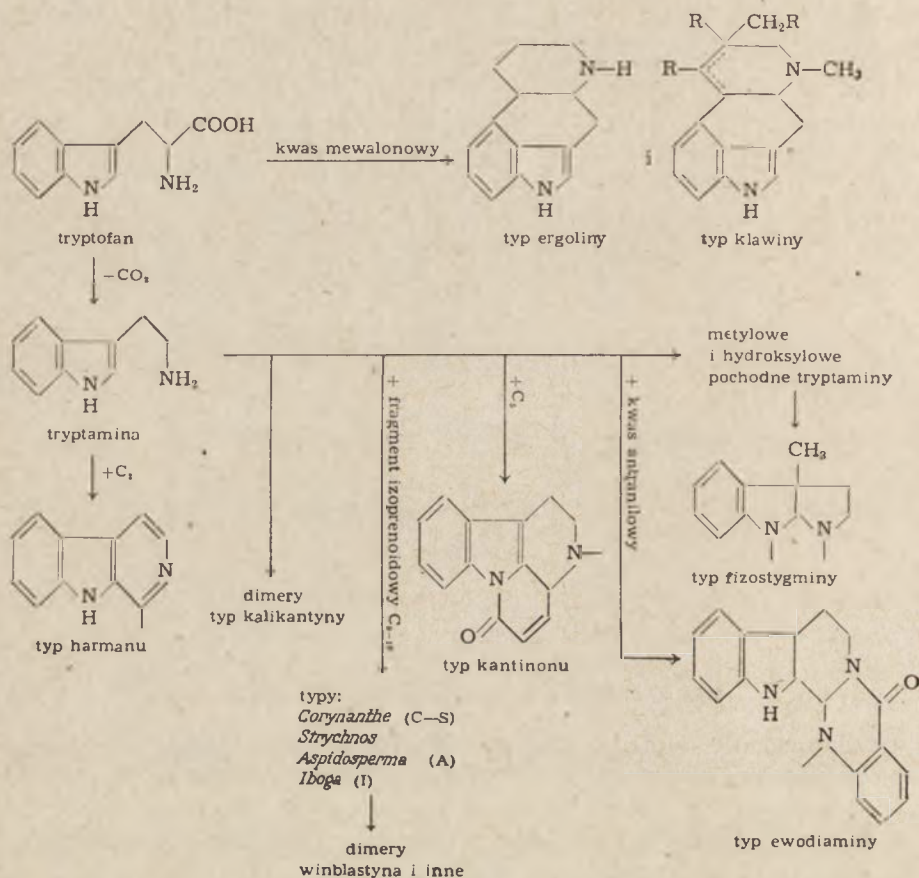
Liczne monografie dają przegląd poszczególnych grup alkaloidów indolowych: alkaloidów *Rauwolfia sp.* (28, 83), *Catharanthus roseus* (48), sporyszu (44), kurary (17).

Biosynteza alkaloidów indolowych zarówno o budowie prostej (grupa harmanu, indoloalkiloaminy), jak i bardziej złożonej jest od kilkunastu lat przedmiotem licznych badań. Szczególnie duży wkład pracy wnieśli Arigoni i wsp. (21, 24, 29, 59, 60, 61), Battersby i wsp. (8—15), Leete i wsp. (49, 51—58, 68, 85), Gröger, Mothes i wsp. (25, 26, 31—39, 66, 67, 75) oraz Scott i wsp. (40, 62, 64, 65, 72, 74). Zespoły te pracowały zasadniczo w oparciu o hipotezy opracowane uprzednio przez Woodwarda (84), Leete (55), Perkiną i Robinsoną (69, 70), Wenkerta (79, 80, 81) i Thomasa (77). Hipotezy te dotyczą głównie sposobu powstawania tzw. części pozatryptofanowej alkaloidów indolowych, zawierającej 10 względnie 9 atomów węgla, a nie zawierającej azotu.

Ogólne typy przyłączeń fragmentów węglowych do cząsteczki trypto-

fanu, stanowiącej podstawowe ugrupowanie cząsteczek wszystkich alkaloidów indolowych (41) przedstawia schemat 1.

Teoretyczne zaliczenie alkaloidów indolowych do grupy biogenetycznej tryptofanu na podstawie podobieństwa strukturalnego znalazło później potwierdzenie eksperymentalne. Między innymi udowodniono wbudowywanie się tryptofanu w graminę.

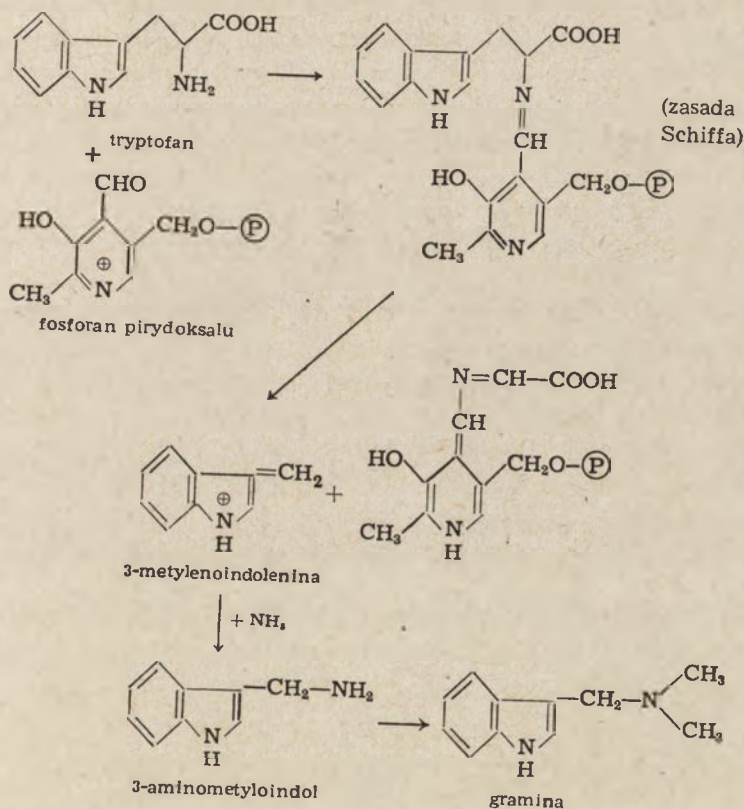


Schemat 1. Biogeneza alkaloidów indolowych

I. Biosynteza protoalkaloidów indolowych (indoloalkiloamin)

Za proste związki alkaloidowe mogą być uważane hydroksylowe i metylowe pochodne tryptaminy, powstającej w wyniku decarboxylacji tryptofanu.

Śród hydroksylowych i metylowych pochodnych tryptaminy na większą uwagę ze względu na swe znaczenie biologiczne zasługują związki przedstawione na rysunku 1, jednak badano tylko biosyntezę graminy (20, 56) i psilocybiny (30). Udowodniono wbudowywanie się β - ^{14}C -tryptofanu w graminę w siewkach jęczmienia, chociaż w graminie zasadowy atom azotu znajduje się w pozycji odmiennej niż w tryptofanie i tryptaminie, gdyż łańcuch boczny jest o jeden atom węgla skrócony. Ustalenie produktów pośrednich biosyntezy nastęrczało dość duże trudności pomimo stosunkowo prostej budowy alkaloidu. O'Donovan i Leete (68) przypuszczali, że droga biosyntezy graminy prowadzi przez 3-aminometyloindol przy współdziałaniu fosforanu pirydoksalu (schemat 2), co zostało już częściowo potwierdzone (82).



Schemat 2. Biosynteza graminy wg O'Donovan i Leete (68)

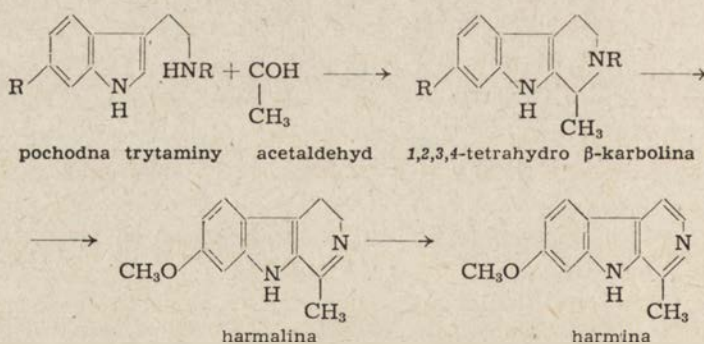
Biosynteza psilocybiny, halucynogennego związku z grzybów, badana przez Agurella i wsp. (2, 4, 5) przebiega prawdopodobnie od tryptofanu przez tryptaminę, N-metylotryptaminę, N,N-dwumetylotryptaminę

i psilocynę. Tryptamina była wbudowywana w znacznie większym stopniu niż tryptofan w cząsteczkę psilocybiny, co wskazuje na dekarboksylację tryptofanu jako pierwszy etap biosyntezy. Powstawania innych prostych pochodnych tryptaminy u roślin prawie nie badano.

II. Biosynteza alkaloidów β -karbolinowych (grupy harmanu)

Badając biosyntezę tych związków udowodniono wbudowywanie się tryptofanu w alkaloidy karbolinowe *Peganum harmala* (*Zygophyllaceae*): harminę, harmalinę i harmalol (36) w kulturach sterylnych korzeni tej rośliny. Wykazano między innymi, że tryptofan wbudowuje się specyficznie w β -karboliny z wyjątkiem grupy karboksylowej. Dało to podstawę późniejszym badaniom biogenetycznym, w których wykazano specyficzne wbudowywanie się podwójnie znakowanych (^{14}C i ^{15}N) tryptofanu i tryptaminy (75). Ustalono, że oba te związki mogą być równie dobrymi prekursorami części indolowej β -karbolin, przynajmniej u niektórych dotychczas zbadanych roślin. Te same wnioski nasunęły się przy badaniu biogenezy niektórych złożonych alkaloidów indolowych. Sprawa powstania struktury trójcyklicznej β -karbolin, tj. uzupełnienia części tryptofanowej, była trudniejsza do wyjaśnienia, podobnie jak ustalenie pośrednich produktów biosyntezy.

Według Perkina i Robinsona (69, 70) część tryptofanowa, a raczej tryptaminowa alkaloidów β -karbolinowych typu harminy zostaje uzupełniona fragmentem dwuwęglowym, którym może być na przykład aldehyd octowy (schemat 3).



Schemat 3. Biosynteza harminy wg Perkina i Robinsona (69, 70)

Doświadczenia z octanem znakowanym w pozycjach 1 i 2 nie potwierdziły jednak w pełni tego przypuszczenia (75), bardziej specyficznym był wbudowywany pirogronian sodowy. Zagadnienie pośrednich produktów biosyntezy i pochodzenia fragmentu dwuwęglowego nie zostało jeszcze w pełni wyjaśnione.

III. Biosynteza złożonych alkaloidów indolowych

Nazwę: złożone alkaloidy indolowe nadano alkaloidom indolowym zawierającym fragment nietryptofanowy złożony z 9—10 atomów węgla. Wbudowywanie się tryptofanu w część indolową tych związków wykazano w przypadku alkaloidów *Rauwolfia serpentina* (ajmaliny (51), rezerpiny (85), serpentyny (53)), alkaloidów *Catharanthus roseus* (windoliny (37, 50, 58), katarantyny (37, 50), ajmalicyny (50)), a także alkaloidu *Tabernanthe iboga* (ibogainy (85)) oraz alkaloidów *Cinchona* (49) i sporyszowych (25).

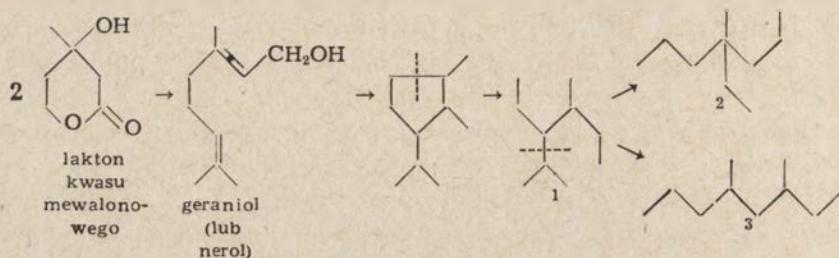
W większości wypadków tryptofan był wbudowywany w całości, wraz z atomem węgla w pozycji β i grupą $-\text{COOH}$. W alkaloidy sporyszowe grupa $-\text{COOH}$ tryptofanu nie była wbudowywana. Dokładną lokalizację radioaktywnego węgla, pochodzącego z tryptofanu znakowanego w różnych pozycjach, ustalano przeprowadzając selektywną odbudowę alkaloidów. Nie wyjaśniono jeszcze czy D-tryptofan może być prekursorem alkaloidów indolowych podobnie jak w przypadku alkaloidów ergolinowych sporyszu (27).

Wykazano również udział tryptaminy w biosyntezie alkaloidów indolowych, jakkolwiek zbyt mało jest jak dotychczas danych o wynikach tzw. doświadczeń „konkurencyjnych” tryptofan-tryptamina. Stwierdzono wbudowywanie się tryptaminy (ar- ^3H tryptaminy) w alkaloidy indolowe *Catharanthus roseus*: katarantynę, windolinę i ajmalicynę (13, 50) oraz w alkaloidy β -karbolinowe *Peganum harmala*.

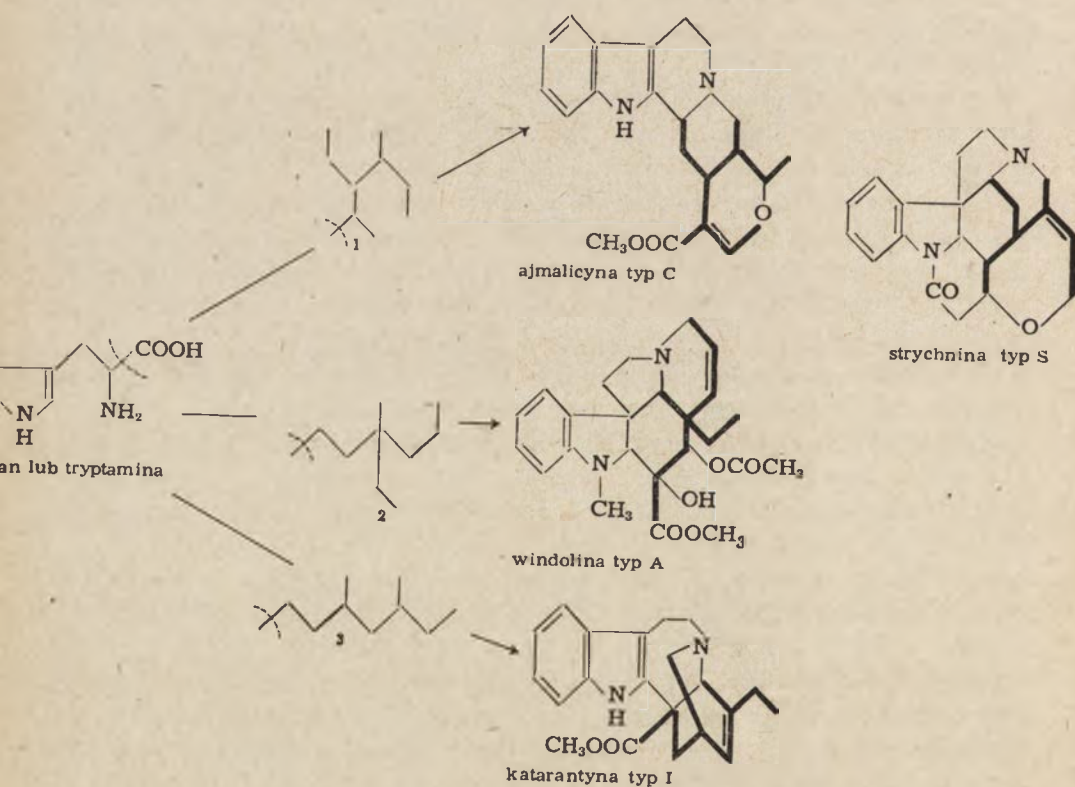
Na podstawie dotychczasowych danych przyjmuje się, że podstawowym prekursorem całej grupy alkaloidów indolowych jest raczej tryptamina, ponieważ u roślin nie znaleziono enzymów dekarboksylujących tryptofan. Mechanizm wbudowywania się tryptofanu poprzez tryptaminę w alkaloidy indolowe nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony.

Biosynteza alkaloidów indolowych zawierających 9—10-cio węglowy fragment nietryptofanowy, szczególnie zaś alkaloidów typu *Corynanthe-Strychnos* (C-S), *Aspidosperma* (A) oraz *Iboga* (I) (schemat 1) była w ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań. Wymienione typy alkaloidów, w których łatwo odszukać można wspomniany fragment węglowy (schemat 5) teoretycznie mogłyby powstawać z tryptaminy i tego fragmentu. Ma on budowę zbliżoną do niektórych monoterpenu, nie zawierając jednak zamkniętego pierścienia pentacyklicznego, jak na przykład związki monoterpenu — nepetalakton czy glikozydy typu aukubiny, loganiny i werbenaliny, zaliczane do grupy irydydów (34, 46). To podobieństwo nasuwało przypuszczenie, że fragment nietryptofanowy alkaloidów indolowych może mieć charakter terpenoidowy, a zatem być wytworem przemian izoprenoidowych. Opierając się na tym podobieństwie Thomas (77) i niezależnie od niego Wenkert (79) wysunęli hipotezę monoterpenu pochodzenia fragmentu nietryptofanowego alkaloidów

indolowych. W myśl tej hipotezy znany prekursor związków terpenoidowych, kwas mewalonowy lub jego lakton, miał przekształcać się w substancje terpenoidowe typu geraniolu, a następnie w cykliczny monoterpren zawierający 10 atomów węgla, z którego po otwarciu pierścienia pentacyklicznego powstawałby inny monoterpren (schemat 4).



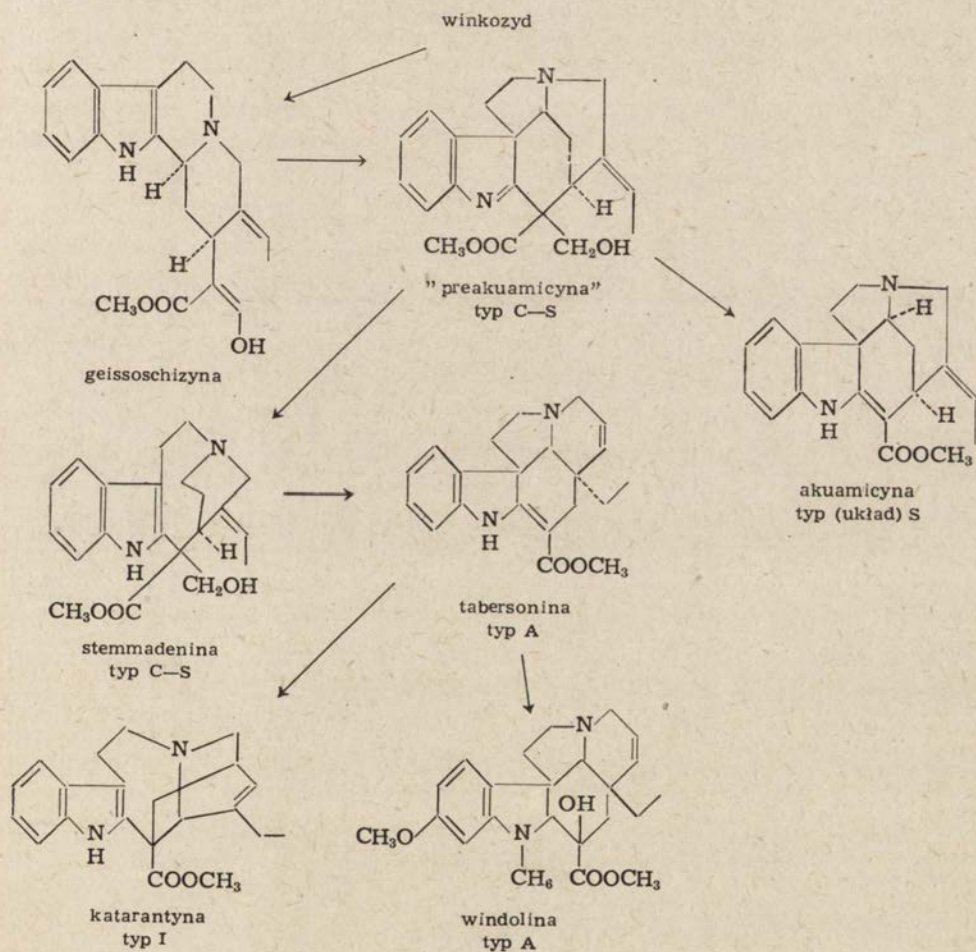
Schemat 4. Biosynteza fragmentu pozatryptofanowego alkaloidów indolowych wg hipotezy monoterpenej Thomasa (77) i Wenkerta (79)



Schemat 5. Biosynteza złożonych alkaloidów indolowych wg Battersby (8) (fragment nietryptofanowy C₉₋₁₀ zaznaczono grubą linią)

Battersby (8) uważa, że wytwarzanie się trzech typów alkaloidów indolowych: C-S, A i I można przedstawić jak na schemacie 5.

Hipoteza monoterpenu wymagała naturalnie doświadczalnego udowodnienia jej słuszności. Kluczowym zagadnieniem było wbudowywanie się kwasu mewalonowego w wymienione trzy typy alkaloidów indolowych. Money i wsp. (64, 65), Goeggel i Arigoni (29), Battersby i wsp. (9, 12) oraz Gröger i wsp. (38, 39) wykazali istotnie wbudowywanie się kwasu mewalonowego w windolinę, serpentynę, ajmalicynę, katarantynę i perywinę u *Catharanthus roseus*, *Rauwolfia serpentina* oraz w 1,2-dehydroaspermidyne u *Rhazya stricta*. Wyniki te podważyły dane Lee i wsp. (55) o nie wbudowywaniu się kwasu mewalonowego w aj-



Schemat 6. Biosynteza alkaloidów indolowych różnych typów wg Scotta i wsp. (73, 74)

malinę u *Rauwolfia serpentina*, co było powodem początkowego kwestionowania hipotezy monoterpenej.

Wykazano również, że geraniol względnie jego izomer, nerol (10), są produktami pośrednimi biosyntezy alkaloidów indolowych: ajmalicyny, perywiny, katarantyny, serpentyny i windoliny u *Catharanthus roseus* (40, 57, 60, 65). Prace te ostatecznie potwierdziły w całej pełni hipotezę monoterpenej Thomasa i Wenkerta, a tym samym hipotezy: malonowo-octanowa Leete (55), preferowa Wenkerta (80, 81) oraz Woodwarda (84) zostały odrzucone. Zresztą Leete sam zrezygnował ze swojej hipotezy (54).

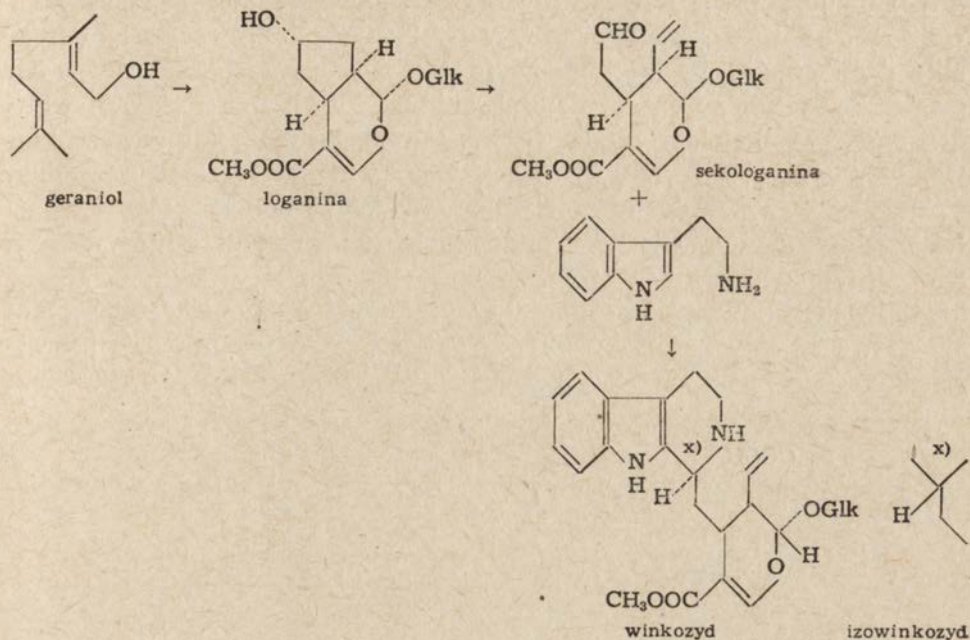
Battersby i wsp. (11) oraz grupa badaczy ze Szwajcarii (21, 59) wykazali w 1966 roku, że gorzki glikozyd monoterpenej, loganina, występujący między innymi w roślinach z rodziny *Gentianaceae* (*Menyanthes trifoliata*), a także *Loganiaceae* (*Strychnos* sp.), jest właśnie tym związkami o strukturze cyklopentanoterpenej, który może dostarczać fragmentu 9—10-cio węglowego alkaloidów indolowych. Eksperymenty żywieniowe z ^{14}C -loganiną wykazały, że u *Catharanthus roseus* związek ten wbudowuje się w katarantynę, windolinę, serpentynę, ajmalicynę i perywinę (14, 59). Podobnie znakowana trytem loganina (otrzymana biosyntetycznie) wbudowywała się w ajmalinę u *Rauwolfia serpentina* (14).

Biogenetyczny związek między geranielem (względnie nerolem) a loganiną ustalili Battersby i wsp. (15), wykazując u roślin z gatunku *Menyanthes trifoliata* powstawanie radioaktywnej loganiny z $1\text{-}^3\text{H}$ -geraniolu i $2\text{-}^{14}\text{C}$ -geraniolu. Podobne rezultaty uzyskali również autorzy szwajcarscy (21, 61) i niemieccy (35).

Dalszym etapem było ustalenie pośrednich produktów biosyntezy między loganiną a poszczególnymi typami alkaloidów. W tym celu Quereschi i Scott (73) badali przemianę alkaloidów w kiełkujących nasionach *Catharanthus roseus* w odstępach kilkudziesięciogodzinnych. Sekwencja powstających w kolejnych odcinkach czasu alkaloidów wskazywała na kolejność przekształceń typów: C-S→A→I. Rzeczą ciekawą był fakt, że żaden z alkaloidów powstających w początkowym okresie kiełkowania, z wyjątkiem ajmalicyny, nie występuje w dojrzałej roślinie. Scott i wsp. (74) określili także inne pośrednie produkty przemian alkaloidów, między innymi glikozydowy alkaloid indolowy, winkozyd, oraz substancję nazwaną „preakuamicyną”, która ma być kluczowym związkiem w biosyntezie wszystkich trzech typów alkaloidów (schemat 6).

Innymi zidentyfikowanymi związkami pośrednimi w biogenezie 3-ch typów alkaloidów indolowych *Catharanthus roseus* są stemmadenina i tabersonina. Znaczenie tabersoniny jako prekursora katarantyny i windoliny potwierdzili również Kutney i wsp. (50).

Przemianami kwas mewalonowy →geraniol→loganina→winkozyd zajmowali się Battersby i wsp. (13). Według autorów otwarcie pierścienia cyklopentanowego loganiny prowadzi do utworzenia sekologaniny.



Schemat 7. Przebieg biosyntezy winkozydu wg Battersby i wsp. (13)

Związek ten, podobnie jak i inne ciała gorzkie rodziny *Gentianaceae* (swerozyd, swertiamaryna, gentiopikrozyd), zaliczany jest do sekoirydoidów (46). Sekologanina z tryptaminą daje winkozyd względnie izo-winkozyd, które wyodrębniono z roślin *Catharanthus roseus*, co stanowi potwierdzenie proponowanego przez Battersby schematu biogenezy tych związków (schemat 7). Analogiczny do winkozydu związek nazwany przez autorów striktozydynam wyodrębnili Brown i wsp. (22) z roślin gatunku *Rhazya stricta* i *Catharanthus roseus*. Tak więc podstawowe produkty przemian pośrednich w biosyntezie alkaloidów indolowych o budowie złożonej zostały już w dużym stopniu zidentyfikowane i związek biogenetyczny między nimi ustalony.

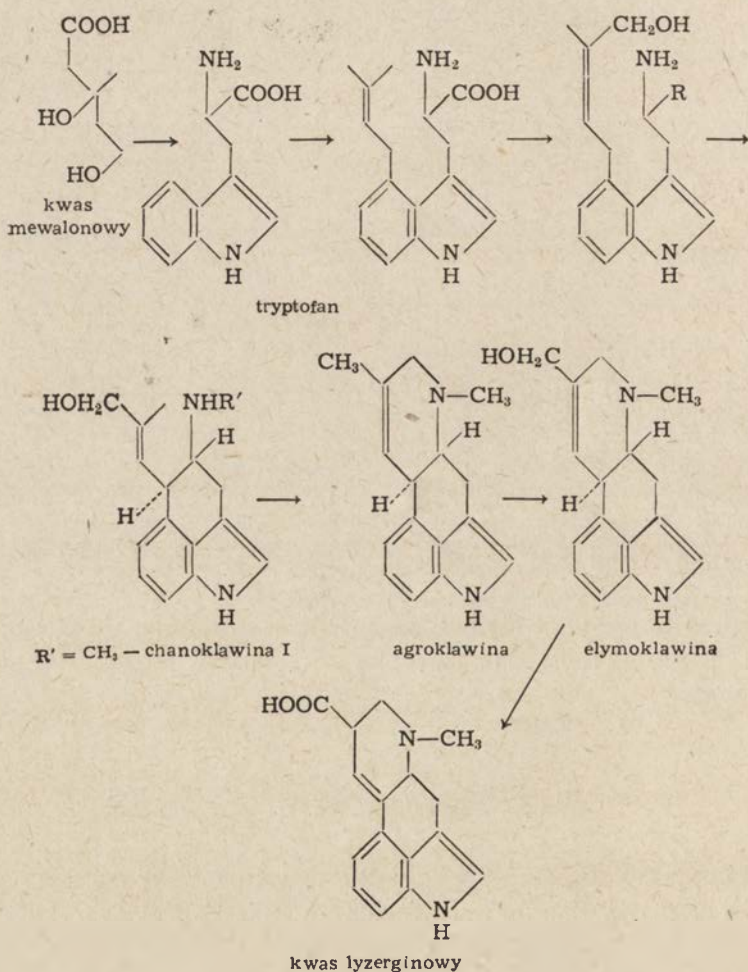
IV. Biosynteza alkaloidów sporyszowych

Alkaloidy sporyszowe mają również strukturę indolową i biogenetycznie należą do grupy tryptofanu (względnie tryptaminy). W zasadzie można tu wyróżnić dwa typy: a) alkaloidy zawierające szkielet ergoliny, zwykle o charakterze peptydowym, b) alkaloidy klawinowe.

Hipotetyczne drogi biosyntezy tych alkaloidów naszkicowane przez Mothesa i wsp. (66) oraz Pleinigera i wsp. (71) prowadziły

z tryptofanu poprzez przyłączenie pięciowęglowej jednostki izoprenoidowej. Floss i wsp. (27) wykazali, że istotnie tryptofan jest prekursorem alkaloidów ergolinowych i wbudowuje się bez grupy karboksylowej w ich cząsteczkę. Natomiast ani tryptamina, ani metylotryptamina nie były wbudowywane w alkaloidy ergolinowe. Pięciowęglową jednostką izoprenoidową, która przyłączając się tworzy czteropierścieniowy szkielet ergoliny, okazał się kwas mewalonowy (16, 18, 33, 76). Wykazano również, że szkielet ergoliny powstaje nie tylko w sporyszu, lecz także u roślin wyższych z rodzaju *Ipomea* (32).

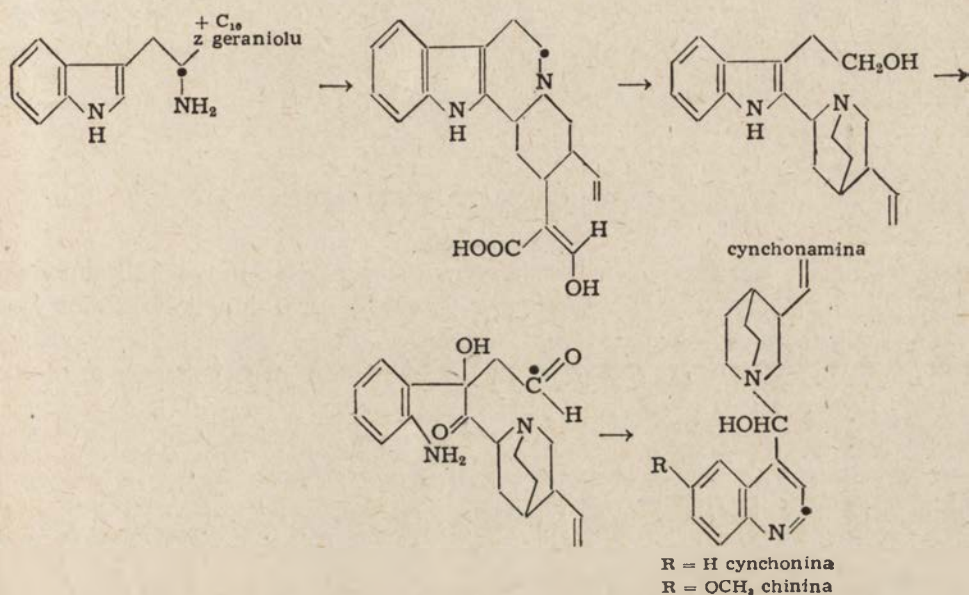
Największe trudności nastęrczało wyjaśnienie pośrednich etapów biosyntezy, a zwłaszcza sposoby wytwarzania się pochodnych kwasu lizerginy-



Schemat 8. Hipotetyczny przebieg biosyntezy alkaloidów sporyszowych wg Flossa i wsp. (25, 26)

nowego (najbardziej interesujących pod względem farmakologicznym) i alkaloidów klawinowych. Niewątpliwie jednym z najważniejszych produktów pośrednich jest elymoklawina, z której na drodze utlenienia i przekształcenia allylowego powstaje szkielet kwasu lizerginowego.

Floss i wsp. (25, 26), Agurell i wsp. (3, 6, 7), Gröger i wsp. (31), Abe (1), Fehr i wsp. (24) ustalili częściowo powiązania biogenetyczne między alkaloidami klawinowymi i peptydowymi. Hipotetyczny schemat biosyntezy alkaloidów ergolinowych, podany przez Flossa i wsp., dotychczas jest potwierdzony doświadczalnie tylko częściowo (schemat 8).



Schemat 9. Biosynteza alkaloidów *Cinchona* wg Leete i wsp. (49, 58)

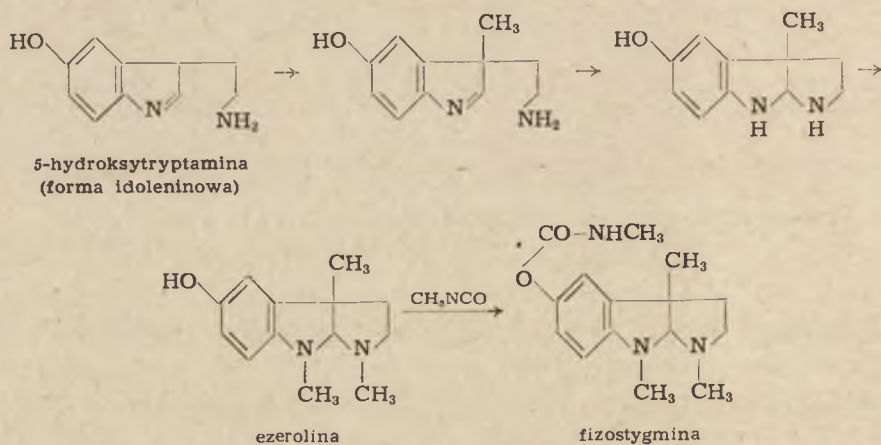
W ostatnich latach zwrócono uwagę na rolę, jaką w biosyntezie alkaloidów sporyszowych odgrywają chanoklawiny, posiadające otwarty pierścień D. Związki te mogą się wbudowywać zarówno w alkaloidy klawinowe, jak i pochodne kwasu lizerginowego. Rola chanoklawin, związków o różnych typach izomerii, nie jest jeszcze w biosyntezie alkaloidów sporyszowych w pełni wyjaśniona, a uzyskane wyniki prac eksperymentalnych nie są jednoznaczne. Nie wiadomo w jaki sposób powstaje pierścień D alkaloidów sporyszowych oraz cykliczny peptyd w alkaloidach peptydowych. Enzymatyczne podłoże tych przemian nie jest również zupełnie poznane.

V. Biosynteza alkaloidów Cinchona

Alkaloidy *Cinchona* sp. pod względem budowy chemicznej należą w większości do pochodnych izochinoliny. Przypuszczenie, że tworzą się one, podobnie jak alkaloidy indolowe, z tryptofanu (względnie tryptaminy) z odpowiednim przekształceniem rdzenia indolowego na izochinolinowy, było niemal fantastyczne. Jednakże K o w a n k o i L e e t e (49) potwierdzili to śmiało przypuszczenie, udowadniając, że u *Cinchona succirubra* następuje wbudowywanie się 2-¹⁴C-tryptofanu w chininę. Układ chinukli-dynowy alkaloidów chinowych podobnie jak fragment 9—10-cio węglowy alkaloidów indolowych ma izoprenoidowy charakter, co nasunęło przypuszczenie o jego izoprenoidowym pochodzeniu. Istotnie stwierdzono, że 3-¹⁴C-geraniol i 2-¹⁴C-geraniol wbudowują się w chininę (58). Schemat biosyntezy chininy nie jest we wszystkich szczegółach potwierdzony doświadczalnie (schemat 9).

VI. Biosynteza innych alkaloidów indolowych

Posiadamy stosunkowo mało danych o biosyntezie innych alkaloidów indolowych. Biosynteza fizostygminy, głównego alkaloidu bobu kalabryjskiego (*Physostigma venenosum*), przebiega najprawdopodobniej według schematu 10. Prekursorem jest 5-hydroksytryptofan przechodzący w 5-hy-



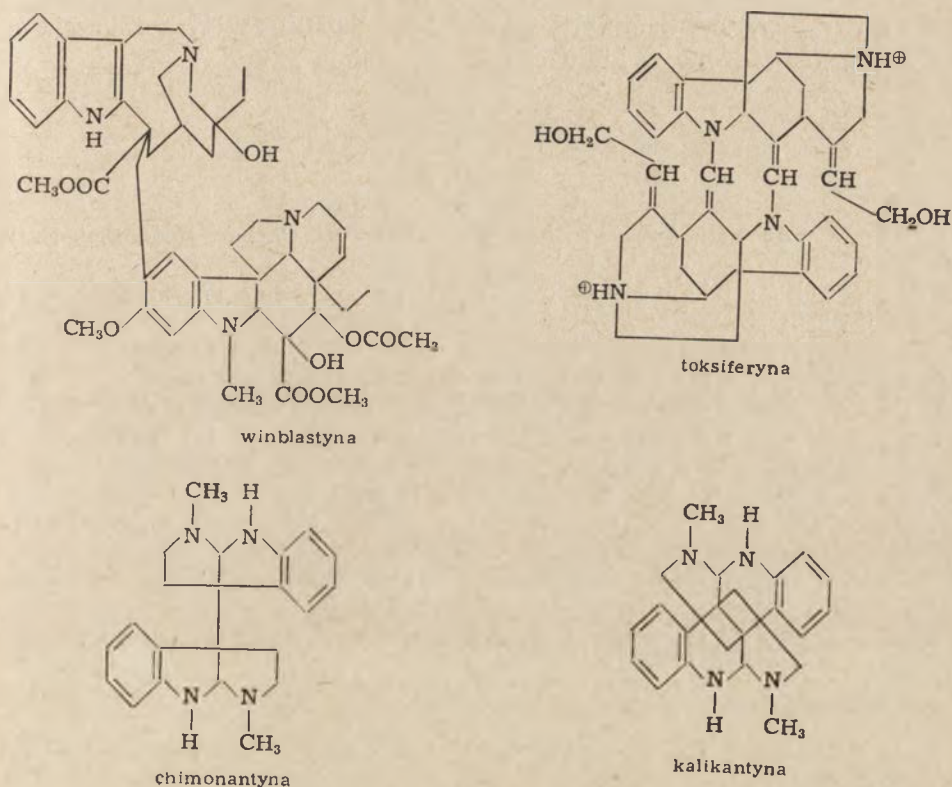
Schemat 10. Biosynteza fizostygminy

droksytryptaminę. Produktem pośrednim ma być ezerolina. Schemat ten jest raczej wynikiem rozważań teoretycznych, zważywszy, że biosyntezie fizostygminy poświęcono tylko nieliczne prace doświadczalne (52).

VII. Alkaloidy „bis”-indolowe

Kilka ważniejszych typów tych związków przedstawiono na rysunku 2. Zawierają one w cząsteczce 38—40 atomów węgla i cztery atomy azotu.

Biosynteza tych związków, składających się zazwyczaj z dwóch monomerycznych alkaloidów indolowych, nie została dotychczas w zadowalający sposób wyjaśniona. Mechanizmy biogenetyczne prowadzące do ich wytworzenia w tkankach rośliny mogą według *Hesse* (43) polegać na dwóch typach przekształceń: 1) reakcjach kondensacji — typu kondensacji karbinolo-aminowej, aldolowej, Mannicha, Michaela względnie elek-



Rys. 2. Niektóre ważniejsze dimeryczne alkaloidy indolowe

trofilowego podstawienia aromatycznego Friedel-Craftsa (wszystkie tego typu reakcje są w zasadzie odwracalne); 2) oksydacyjnym połączeniu. Ten mechanizm jest najczęstszy u dimerycznych alkaloidów izochinolinowych; w grupie alkaloidów indolowych prawdopodobnie występuje tylko u alkaloidów w rodzaju *Calycanthus* (chimonantyny i kalikantyny).

Brak jest dotychczas danych potwierdzających, względnie wyklucza-

jących wspomniane możliwości. Prace nad biosyntezą chimonantyny i kalikantyny (47) udowodniły jedynie wbudowywanie się tryptofanu w cząsteczkę tych alkaloidów u *Chimonanthus fragrans*.

Biosynteza alkaloidów indolowych jest jednym z najbardziej fascynujących procesów biochemicznych dotyczących alkaloidów w roślinach. Sledząc te procesy obserwuje się niezwykle zdolność organizmów roślinnych do wytwarzania najrozmaitszych typów połączeń indolowych ze stosunkowo prostych prekursorów. Ostatnie lata pozwoliły na poznanie wielu mechanizmów tych procesów, o których wyżej wspomniano. Niemniej jednak pozostaje jeszcze dużo problemów biogenetycznych do wyjaśnienia w drodze eksperymentu. Tak np. nie znamy dotychczas bardziej szczegółowych schematów biogenetycznych alkaloidów grupy strychniny, typu oliwacyny, ewodiaminy, kantyny i in. Badania w tym zakresie są aktualnie prowadzone w kilku ośrodkach naukowych.

LITERATURA

1. Abe M., *Abhandl. Deutsch. Akad. Wiss. Berlin Kl. Chemie, Geol. Biol.* Nr 3, 393 (1966).
2. Agurell S., Blomquist S., Catalfomo P., *Acta Pharm. Suec.* 3, 37, 71 (1966).
3. Agurell S., Johansson M., *Acta Chem. Scand.* 18, 2285 (1964).
4. Agurell S., Nilsson G. L., *Acta Chem. Scand.* 22, 1210 (1968).
5. Agurell S., Nilsson G. L., *Tetrahedron Letters* str. 1063 (1968).
6. Agurell S., Ramstad E., *Arch. Biochem. Biophys.* 98, 457 (1961).
7. Agurell S., Ramstad E., *Tetrahedron Letters* str. 501 (1961).
8. Battersby A. R., *Pure Appl. Chem.* 14, 117 (1967).
9. Battersby A. R., Binks A., Lawrie W., Parry G. V., Webster B. E., *J. Chem. Soc.* str. 7459 (1965).
10. Battersby A. R., Brown R. T., Kapil R. S., Knight J. A., Martin J. A., Plunkett A. J., *Chem. Comm.* str. 810 (1966).
11. Battersby A. R., Brown R. T., Kapil R. S., Martin K. A., Plunkett A. J., *Chem. Comm.* str. 890 (1966).
12. Battersby A. R., Brown R. T., Kapil R. S., Plunkett A. J., *Chem. Comm.* str. 46 (1966).
13. Battersby A. R., Burnett A. R., Papous P. G., *J. Chem. Soc. C* str. 1187 (1969).
14. Battersby A. R., Kapil R. S., Martin J. A., Mo L., *Chem. Comm.* str. 133 (1968).
15. Battersby A. R., Kapil R. S., Southage R., *Chem. Comm.* str. 131 (1968).
16. Baxter R. M., Koudel S. L., Okany A., *J. Am. Chem. Soc.* 84, 2997 (1960).
17. Bernauer K., *Fort. Chem. Org. Naturstoffe* 17, 183 (1959).
18. Birch A. J., Mc Loughin B. J., Smith H., *Tetrahedron Letters* str. 1 (1960).
19. Boit H. G., *Ergeb. Alkaloidchemie bis 1960* Akad. Verlag Berlin 1961.
20. Bowden K., Marion L., *Can. J. Chem.* 29, 1037, 1043 (1951).

21. Brechbühler-Bader S., Coscia C. J., Loew P., V. Szczepański C., Arigoni D., *Chem. Comm.* str. 136 (1968).
22. Brown R. T., Smith G. N., Stapleford K. S., *Tetrahedron Letters* str. 4349 (1968).
23. Chatterjee A., Pakrashi S. C., Werner G., *Fort. Chem. Org. Naturstoffe* **13**, 346 (1956).
24. Fehr T., Acklin W., Arigoni D., *Chem. Comm.* str. 801 (1966).
25. Floss H. G., Günther H., Gröger D., Erge D., *J. Pharm. Sci* **56**, 1675 (1967).
26. Floss H. G., Hornemann U., Schilling N., Gröger D., Erge D., *Chem. Comm.* str. 105 (1967).
27. Floss H. G., Mothes U., Günther H. *Z. Naturforsch. Sect. B* **19**, 784 (1964).
28. Garnier J., *Phytochemistry* **8**, 1241 (1969).
29. Goeggel H., Arigoni D., *Chem. Comm.* str. 538 (1965).
30. Gross D., w *Biosynthese der Alkaloide*, Verl. d. Wiss. Berlin 1969, str. 439.
31. Gröger D., Erge D., Floss H. G. *Z. Naturforsch. Sect. B* **18**, 850 (1963).
32. Gröger D., Mothes K., Floss G., Weygand F., *Z. Naturforsch. Sect. B* **18**, 850 (1963).
33. Gröger D., Schütte H. R., Stolle K., *Z. Naturforsch. Sect. B* **18**, 850 (1963).
34. Gröger D., Simchen P., *Phamazie* **22**, 315 (1967).
35. Gröger D., Simchen P., *Z. Naturforsch. Sect. B* **24**, 356 (1969).
36. Gröger D., Simon H., *Abhandl. Deutsch. Akad. Wiss. Kl. Chemie* nr **4**, 543 (1963).
37. Gröger D., Stolle K., Mothes K., *Tetrahedron Letters*, str. 2579 (1964).
38. Gröger D., Stolle K., Mothes K., *Z. Naturforsch. Sect. B* **21**, 206 (1966).
39. Gröger D., Stolle K., Mothes K., *Arch. Pharm.* **300**, 393 (1967).
40. Hall E. S., Mc Capra F., Money T., Fukutomo K., Hanson J. R., Mootoo B. S., Philips G. T., Scott A. L., *Chem. Comm.* str. 348 (1966).
41. Hegnauer R., *Chemotaxonomie der Pflanzen* t. III Birkhauser Verl., Basel, Stuttgart 1964.
42. Hesse M., *Indolalkaloide in Tabellen*, Springer Verl. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964, Ergband 1968.
43. Hesse M., *Deut. Apoth. Z.* **108**, 1480 (1968).
44. Hoffman A., *Die Mutterkornalkaloide*, F. Enke Verl., Stuttgart 1964.
45. Hoffman A., Tschertter H., *Experientia* **16**, 414 (1960)
46. Inouye M., Ueda S., Nakamura Y., *Tetrahedron Letters* str. 3221 (1967).
47. Kirby G. W., Shah S. W., Herbert E. J., *J. Chem. Soc.* str. 1916 (1969).
48. Kohlmünzer S., *Post. Biochem.* **14**, 209 (1968).
49. Kowanko N., Leete E., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 4919 (1962).
50. Kutney J. P., Cretney W. J., Hadfield J. R., Hall E. S., Nelson V. R., Wigfield D. C., *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 3566 (1968).
51. Leete E., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 6338 (1960).
52. Leete E. w *Biogenesis of Natural Compounds*, Pergamon Press Oxford, Londyn 1963.
53. Leete E., *Tetrahedron* **14**, 35 (1961).
54. Leete E., Ahned A., Kompis I., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4168 (1965).
55. Leete E., Ghosal S., Edwards P. W., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1068 (1962).
56. Leete E., Marion L., *Can J. Chem.* **31**, 1195 (1953).
57. Leete E., Ueda S., *Tetrahedron Letters* str. 4915 (1966).
58. Leete E., Wentle J. W., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4743 (1966).

59. Loew P., Arigoni D., *Chem. Comm.* str. 137 (1968).
60. Loew P., Goeggel H., Arigoni D., *Chem. Comm.* str. 317 (1966).
61. Loew P., v. Szczepański C., Arigoni D., *Chem. Comm.* str. 136. (1968).
62. Mac Capra F., Money T., Scott A. I., Wright J. G., *Chem. Comm.* str. 537 (1965).
63. Manske R. H. T., *The Alkaloids*, Academic Press, New York-Londyn 1960, t. 7, str. 4.
64. Money T., Wright I. G., Mac Capra F., Hall E. S., Scot A. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* 53, 901 (1965).
65. Money T., Wright I. G., Mac Capra F., Hall E. S., Scott A. I., *J. Am. Chem. Soc.* 90, 144 (1968).
66. Mothes K., Gröger D., *Mon. Ber. D. Akad. Wiss.* 2, 300 (1960).
67. Mothes K., *Lloydia* 29, 156 (1966).
68. O'Donovan D., Leete E., *J. Am. Chem. Soc.* 85, 461 (1963).
69. Perkin W. H., Robinson R., *J. Chem. Soc.* 115, 933 (1919).
70. Perkin W. H., Robinson R., *J. Chem. Soc.* 115, 967 (1919).
71. Pleiniger H., Fischer R., Lwowski W., Brack A., Kobel A., Hofman A., *Angew. Chem.* 71, 383 (1959).
72. Quereschi A. A., Scott A. I., *Chem. Comm.* str. 947 (1968).
73. Quereschi A. A., Scott A. I., *Chem. Comm.* str. 948 (1968).
74. Scott A. I., Cherry P. C., Quereschi A. A., *J. Am. Chem. Soc.* 91, 4932 (1969).
75. Stolle K., Gröger D., *Arch. Pharm.* 301, 561 (1968).
76. Taylor E. H., Ramstad E., *Nature* 188, 494 (1960).
77. Thomas R., *Tetrahedron Letters*, str. 544 (1961).
78. Trojanek J., Blaha K., *Lloydia* 29, 149 (1966).
79. Wenkert E., *J. Am. Chem. Soc.* 84, 98 (1962).
80. Wenkert E., Bringi N. S., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 1474 (1959).
81. Wenkert E., *Experientia* 15, 165 (1959).
82. Whitlock H. W., Digenis G. A., *Tetrahedron Letters* str. 1521 (1964).
83. Woodson P. E., Youngken H. W., Schlitter J. A., *Rauwolfia: Botany, Pharmacology, Chemistry*, Boston 1957.
84. Woodward R. B., *Nature* 162, 155 (1948).
85. Yamasaki M., Leete E., *Tetrahedron Letters* str. 1499 (1964).

ANDRZEJ JERZMANOWSKI *

Monoterpeny metylocyklopentanowe

Methylcyclopentane Monoterpenes

Structures, biosynthetic pathways and pharmacological properties of methylcyclopentane monoterpenes are reviewed.

Grupa związków określana wspólną nazwą: monoterpeny metylocyklopentanowe — wzbudza ostatnio żywe zainteresowanie wśród badaczy zajmujących się metabolitami roślin. Przyczyna jest dwójaka — po pierwsze — specyficzna i rzadka wśród monoterpentów aktywność farmakologiczna tych związków, po drugie — przypuszczenie o ich udziale w biosyntezie alkaloidów indolowych. Szczególnie ta ostatnia możliwość stała się powodem atrakcyjnych koncepcji o jedności metabolicznej między związkami uważanymi do niedawna za tak odległe biogenetycznie jak terpeny i alkaloidy.

Prace z ostatniego dziesięciolecia, szczególnie R. Thomasa (34), H. N. R. Audy, F. I. Eisebrauna (3), grupy badaczy skupionych wokół G. B. Marini-Bettolo (21) w rzymskim Wyższym Instytucie Zdrowia oraz grupy C. J. P. Djerassi'ego (11) z Uniwersytetu im. Stanforda, przyczyniły się do wyjaśnienia budowy chemicznej, własności farmakologicznych oraz wzajemnych powiązań biogenetycznych pomiędzy większością znanych monoterpentów metylocyklopentanowych.

I. Budowa chemiczna i występowanie

Omawiane związki można ogólnie sklasyfikować jako monoterpeny jednocykliczne, których pierścień jest układem pięcioczłonowym, zawierającym charakterystycznie dołączoną grupę metylową. W świecie roślin wyższych układ taki jest szeroko rozpowszechniony w trzech grupach związków:

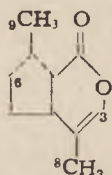
utlenionych monoterpenach
alkaloidach

* Mgr, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

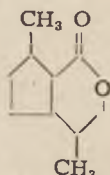
glukozydach, których aglikonami są alkaloidy lub utlenione monoterpeny, a częścią cukrową — β -D-glukoza.

1. Grupa utlenionych monoterpenów metylocyklopentanowych

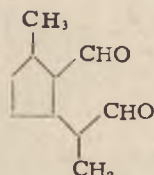
Związki należące do tej grupy wyodrębniono z roślin (I—VI) i z owoców (III, VI, VIII).



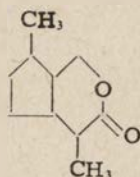
I



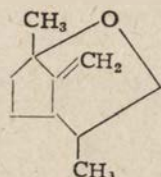
II



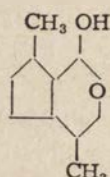
VII



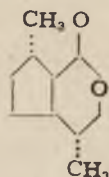
III



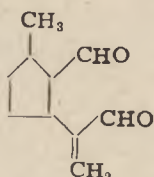
IV



V



VI



VIII

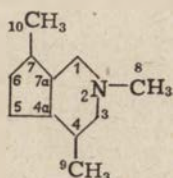
W świetle dzisiejszych danych wydaje się, że jest to jedna z nielicznych grup substancji działających fizjologicznie, produkowana zarówno przez rośliny, jak i zwierzęta. Utlenienie w tych związkach zachodzi w łańcuchach bocznych cząsteczki, przyległych do pierścienia cyklopentanowego, często z wytworzeniem pierścienia laktonowego, cyklicznych eterów lub pół-acetali.

Nepetalakton (I) wyizolowany został po raz pierwszy przez McEivena (23) z rośliny *Nepeta cataria*. Występuje on dość powszechnie w roślinach z rodzaju *Mentha*. Z niektórych roślin tego rodzaju otrzymano też pochodną nepetalaktonu, dwuhydronepetalakton (II). Bogatym źródłem utlenionych pochodnych monoterpenów metylocyklopentanowych okazała się japońska roślina: matatabi (*Actinidia polygama*) (17, 18). Wyosobniono z niej matatabilakton (III), matatabieter (IV), neomatatabiol (V) i izoneo-

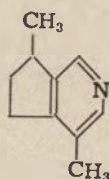
matatabiol (VI). W ostatnich latach związki o strukturze podobnej do nepetalaktonu wydzielono z mrówek (9, 12). Są to między innymi: irydiodial (VII) irydiomyrmecyna (III), identyczna z matatabilaktonem i anizomorfa (VIII).

2. Grupa alkaloidów monoterenowych o strukturze metylocyklopentanowej

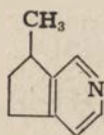
Związki zawierające pierścień cyklopentanowy oraz dodatkowy, heterocykliczny pierścień azotowy (X—XII) otrzymano między innymi z chilijskiej rośliny *Skythanthus acutus* (Apocynaceae) (7), z wymienionej tu już *Actinidia polygama* oraz z *Rauwolfia verticalla* (2).



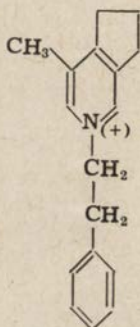
IX



X



XI

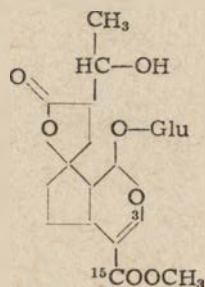


XII

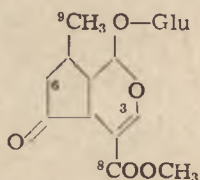
Grupę alkaloidów skytantyny wyizolował i opisał w 1960 roku jednocześnie zespół Marini-Bettolo (21) w Rzymie i zespół Djerrassiego (11) z Uniwersytetu im. Stanforda. Obecnie znane są co najmniej trzy izomery skytantyny (IX) i dehydroskytantyna (XXXV). Ilości tych alkaloidów są różne w poszczególnych częściach rośliny. Najwięcej zawiera ich korzeń. Z rośliny *Actinidia polygama* otrzymano aktynidynę (X). Stwierdzenie terpenoidowego pochodzenia tego związku rzuca nowe światło na drogi biosyntezy układów pirydynowych w roślinach. Z *Rauwolfia verticalla*, znanego źródła alkaloidów indolowych, otrzymano związek (XI) spokrewniony z aktynidyną. Nowy związek z grupy alkaloidów otrzymali w 1966 roku Torssell i Wahlberg (36) z *Valeriana officinalis* L. Alkaloid ten (XII), posiadający czwartorzędową grupę amoniową, jest również strukturalnie zbliżony do aktynidyny.

3. Grupa monoterpénów metylocyklopentanowych zwiázaných glukozydowo

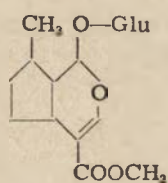
W postaci glukozydów, których częścią cukrową jest β -D-glukoza, występuje kilka spośród utlenionych pochodnych monoterpénów metylocyklopentanowych, między innymi otrzymany z *Plumeria acutifolia* plumerid (XIII) (39). Glukozydem jest też otrzymana z *Verbena officinalis* werbenalina (XIV) (16). W roślinach z rodzaju *Strychnos* spotykany jest glukozyd loganiny (XV), budową zbliżony do werbenaliny (5). Za przekształcony monoterpén metylocyklopentanowy uważa się gencjopikrozyd (XVI) występujący w roślinach z rodziny goryczkowatych (10, 33).



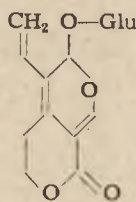
XIII



XIV



XV



XVI

II. Własności biologiczne

Grupa monoterpénów metylocyklopentanowych wykazuje silną i różnorodną aktywność biologiczną, między innymi: antybiotyczną (15), insektycydową (12, 15), odpychania i przyciągania owadów (12, 13, 28), przyciągania kotów i psów (23, 29, 35), obroną przed stawonogami (8, 13, 22, 24), antydiabetyczną (1) oraz przyspieszania szybkości uczenia się u szczurów (1, 21).

Z wymienionych właściwości szczególnie interesujące wydają się oddziaływania na owady. Spotyka się tu wszystkie możliwe typy reakcji: odpychanie, brak oddziaływania i przyciąganie. Monoterpeny metylocyklopentanowe działające na określone gatunki owadów wytwarzane są zarówno przez rośliny, jak i przez owady innych gatunków. Eisner (12) przebadwał wrażliwość na związek roślinny, nepetalakton (I), szeregu gatun-

ków należących do 18 rodzin owadów, powszechnie spotykanych na terenie północno-wschodniej części Stanów Zjednoczonych (tablica 1). Badania prowadzono obserwując zachowanie się owadów pod wpływem par wydobywających się z otworu cienkiej kapilary połączonej ze zbiorniczkiem wypełnionym ciekłym nepetalaktonem. Kapilara umieszczona była w odległości kilku mm od ciała owada. Dla przedstawicieli 13 spośród 18 badanych rodzin owadów nepetalakton okazał się związkami o działaniu odpychającym lub nawet zabójczym, nie działał natomiast na przedstawicieli pozostałych 5 rodzin.

Tablica 1.

Gatunki owadów poddane działaniu par nepetalaktonu (I). Numerami oznaczono rodziny (wg 12)

Gatunki wrażliwe na nepetalakton:	
1. <i>Fulgoridae</i> <i>Acanolonia</i> sp.	8. <i>Staphylinidae</i> dwa niezidentyfikowane gat.
2. <i>Cercopidae</i> <i>Monocophora bicincta</i>	9. <i>Scarabaeidae</i> <i>Ataenius</i> sp.
3. <i>Formicidae</i> <i>Camponotus floridanus</i>	10. <i>Chrysomelidae</i> <i>Disonychia conjugata</i>
4. <i>Leptoceridae</i> <i>Leptocella</i> sp. <i>Oecetis inconspicua</i>	11. <i>Tenebrionidae</i> <i>Leichenum canaliculatum</i>
5. <i>Dytiscidae</i> <i>Coptotomus interrogatus</i>	12. <i>Alleculidae</i> <i>Hymenorus</i> sp.
6. <i>Lampyridae</i> <i>Photinus</i> sp.	13. <i>Curculionidae</i> <i>Derelomus</i> sp. <i>Conotrachelus</i> sp.
7. <i>Cicindelidae</i> <i>Cicindela trifasciata</i>	
Gatunki niewrażliwe na nepetalakton:	
14. <i>Pentatomidae</i> <i>Thyantha</i> sp. <i>Euschistus</i> sp.	16. <i>Pyralidae</i> <i>Paraponyx allionealis</i>
15. <i>Reduviidae</i> <i>Oncocephalus geniculatus</i> <i>Pnirontis</i> sp.	17. <i>Arctiidae</i> <i>Afrida ytadodes</i>
	18. <i>Chironomidae</i> <i>Chironomus</i> sp.

Cavill i Robertson (9) zaobserwowali również wyraźne własności insektycydowe irydiomyrmecyny (III) wyodrębnionej z mrówek. Związek identyczny z irydiomyrmecyną, znany pod nazwą matatabilakton (III), wyizolowano również z roślin (17). Eisner (13), badając owada *Anisomorpha buprestoides*, stwierdził, że owad ten produkuje anizomorfol (VIII) w dwóch specjalnych gruczołach obronnych umieszczonych symetrycznie w odwłoku. Wydzielina gruczołów wyrzucana jest w postaci mgiełki, na ogół pod wpływem bodźca dotykowego. Stwierdzono jednak, że

ptaki powodują wyrzucenie zawartości gruczołów już przez samo zbliżenie się do owada. Anizomorfol działa odstrasza­jąco na owady, pająki, ptaki (sójka amerykańska), myszy — wykazuje też pewne, ujemne działanie na ludzi.

Eisner (12) postuluje, iż związki typu nepetalaktonu i anizomorfolu mogą być dla roślin swego rodzaju substancjami obronnymi, chroniącymi przed owadami roślinozernymi. Związki te, występujące u owadów, pełnią niewątpliwie rolę obronną przed innymi owadami, ptakami i być może niektórymi ssakami. Nie jest wykluczone, że w przyszłości insektycydowe właściwości monoterpenów metylocyklopentanowych znajdują zastosowania praktyczne.

Działanie przyciągające w stosunku do niektórych owadów (*Chrysopa septempunctata* i *Chrysopa japana*) zaobserwowano dla neomatatabiolu (IV) i izoneomatatabiolu (V) wyizolowanych z *Actinidia polygama* (17, 30). Związki te wykazują aktywność już w bardzo małych ilościach.

Wydaje się dzisiaj dość przekonywająco udowodnione, że występujące powszechnie, niemal symbiotyczne zależności między określonymi gatunkami owadów i roślin mają swe podłoże, między innymi w wytwarzaniu przez rośliny specyficznych związków, dawniej zaliczanych do grupy tak zwanych metabolitów wtórnych. Związki te, których dobry przykład stanowi grupa monoterpenów metylocyklopentanowych, oddziałują odpychająco lub przyciągająco na owady wykazując określoną specyficzność gatunkową. Można przypuszczać, że podobnie jak wiele innych procesów specjalizacji biologicznych, również i istniejące obecnie chemiczne podłoże powiązań funkcjonalnych owad-roślina jest wynikiem mechanizmu ewolucyjnego. Według niektórych autorów (14) oddziaływania typu chemicznego pomiędzy komórkami wydzielniczymi roślin a receptorami w narządach owadzich stanowiły podstawowy mechanizm ewolucyjny istniejącej obecnie współzależności tych dwóch grup organizmów. Związki działające przyciągająco lub odpychająco pełnią prawdopodobnie, na równi z przystosowaniami anatomicznymi, rolę selekcjonerów zapewniających zapylanie roślin jedynie przez określone gatunki owadów.

Szczegółowe badania nad własnościami farmakologicznymi β -skytantyny (IX), jednego z alkaloidów o strukturze monoterpenu metylocyklopentanowego, przeprowadzono w laboratorium Marini-Bettolo (21).

U psów usypianych wodzianem chlorału obserwowano po podaniu β -skytantyny występowanie niewielkiego podciśnienia. Efekt ten jednak nie wpływał regulująco na wzrost ciśnienia wywołany jednoczesnym podaniem epinefryny lub jego spadek po podaniu acetylocholino.

U uspiętych królików podanie β -skytantyny wywoływało drżączkę. Pomimo istnienia pierścienia piperydynowego w cząsteczce β -skytantyny nie stwierdzono działania kuraropodobnego tego alkaloidu, to jest porażenia zakończeń nerwów ruchowych.

Badano również wpływ β -skytantyny na zachowanie się szczurów w sy-

tuacjach ciągłego drażnienia szokami elektrycznymi. W stosowanych testach samce szczurów uczyły się unikania szoków przez naciskanie dźwigni na sygnał ostrzegawczy (światło). Wykazano, że β -skytantyna przyspiesza proces uczenia się szczurów w sytuacjach ciągłego unikania szoków. Analogiczne działanie obserwuje się w przypadku podania nikotyny i amfetaminy. Wydaje się, że ugrupowanie N-metylo-piperidynowe, występujące w cząsteczce β -skytantyny warunkuje większość własności farmakologicznych tego alkaloidu.

Stwierdzono również działanie podniecające nepetalaktonu (I) i aktyndyny (X) u kotów (12, 14).

III. Badania nad biosyntezą monoterpenu metylocyklopentanowych

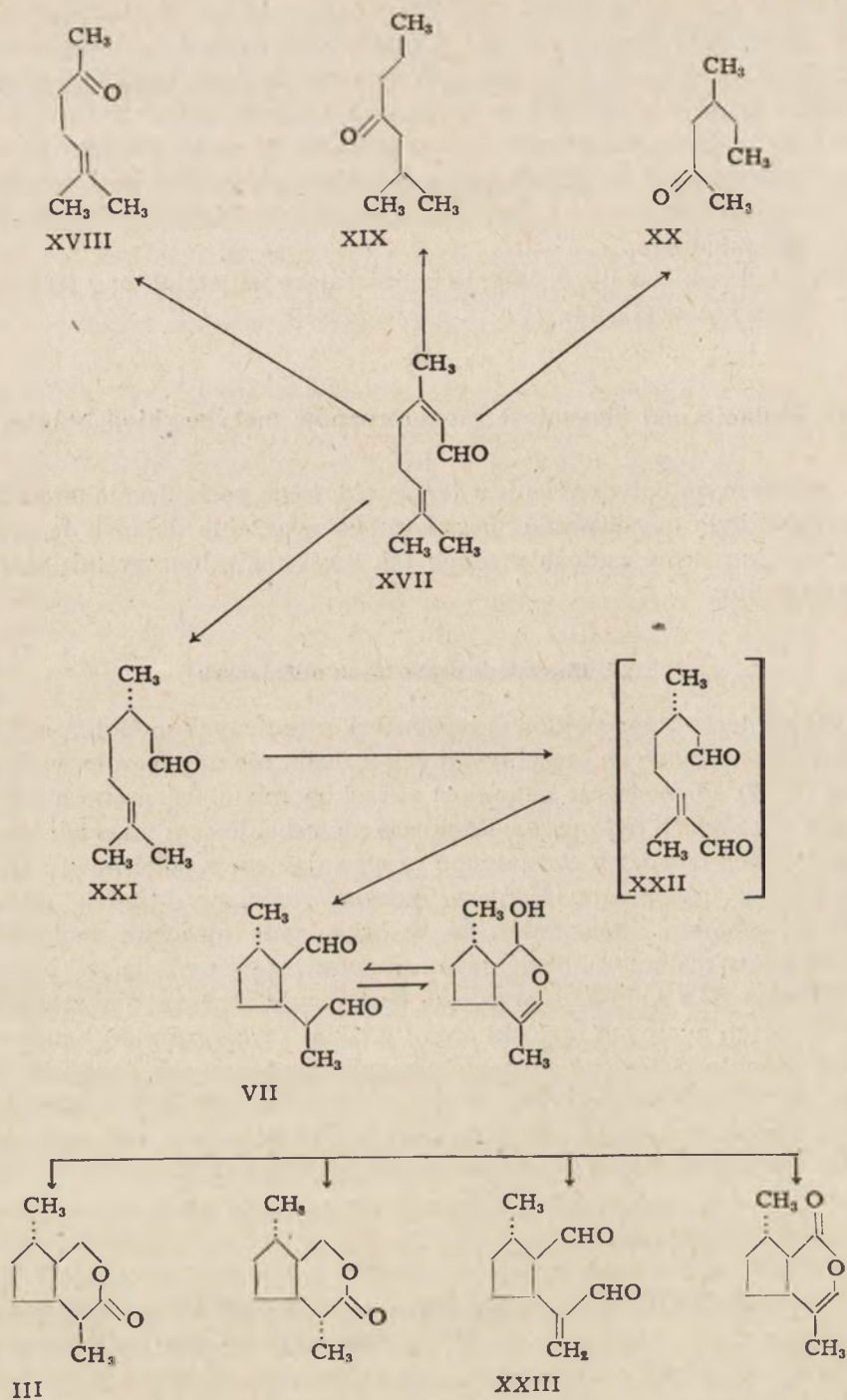
Ostatecznym potwierdzeniem terpenoidowego pochodzenia omawianych związków było uzyskiwanie specyficznego włączenia do nich terpenoidowych prekursorów radioaktywnych jak kwas mewalonowy lub pirofosforan geranylu.

1. Biosynteza pochodnych utlenionych

Wyjaśnienie izoprenoidowej biosyntezy utlenionych monoterpenu metylocyklopentanowych otrzymywanych z roślin nie nastroczało wielu trudności (6, 39). Pochodzenie natomiast związków monoterpenu występujących w owadach było przez długi czas niejasne. Początkowo ich obecność w gruczołach owadów tłumaczono przyswajaniem z pokarmu i nagromadzeniem w organizmie. Dopiero doświadczenia, w których podawano $2\text{-}^{14}\text{C}$ -mewalonian udowodniły, że w organizmie owadów zachodzi, podobnie jak w roślinnym, biosynteza terpenów tej grupy.

Badania Cavilla i wsp. (9) dostarczyły danych o występowaniu w gruczołach analnych mrówki argentyńskiej *Irydiomyrmex humilis* całej grupy monoterpenu, w której obok cyklopentanowych znajdują się też inne, wśród nich łańcuchowe: citral, L-citronellal oraz ketony: metyloheptenon, metyloheptanon i metyloheksanon. Robinson (27) opierając się na stwierdzonym fakcie występowania wymienionych związków w organizmach owadów zaproponował schemat ich wzajemnych powiązań biogenetycznych (schemat 1).

Związkiem podstawowym w schemacie Robinsona jest łańcuchowy aldehyd citral (XVII), zawierający dwa wiązania podwójne, z których jedno w położeniu α - β w stosunku do grupy karbonylowej. Z citralu drogą prostych przekształceń chemicznych, jak utlenianie, redukcja i odwrócenie reakcji aldolowej (przyłączenie cząsteczki wody do α - β nienasyconego wiązania i odłączenie aldehydu octowego) powstają ketony terpenowe: metyloheptenon (XVIII), metyloheptanon (XIX) i metyloheksanon (XX).



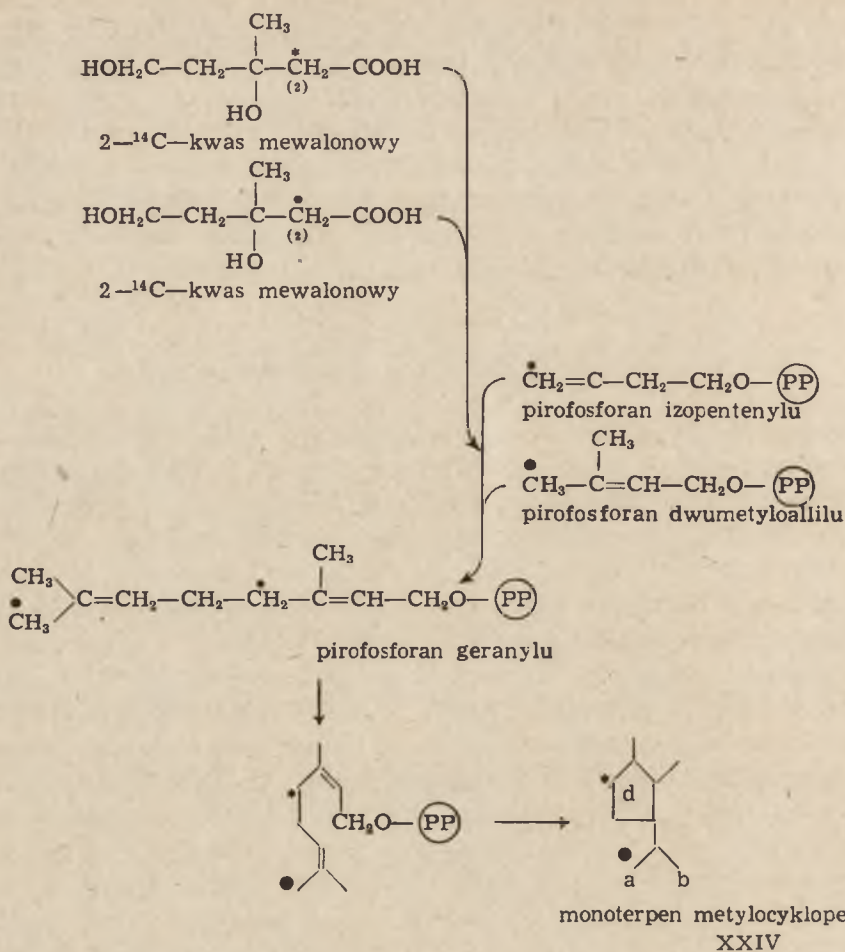
Schemat 1. Biosynteza monoterpenu w organizmach owadów według Robinsona (27)

Citral może również ulegać stereospecyficznej redukcji do L-citronellalu (XXI) z następnym utlenieniem końcowego węgla do grupy aldehydowej i z wytworzeniem związku pośredniego (XXII). Tego typu reakcje utleniania terpenów były już wykrywane u zwierząt. Dwualdehyd (XXII), powstały z L-citronellalu i zawierający α - β nienasycone wiązanie przy jednej z grup aldehydowych, może ulegać wewnętrznej kondensacji Michaela, dając irydiodial (VII), związek, który może być dalej przekształcany w irydiodiolaktony (III) lub dolichodial (XXIII).

2. Biosynteza alkaloidów i glukozydów — efekt randomizacji

Pierwsze badania nad biosyntezą monoterpeny metylocyklopentanowego, β -skytantyny (IX), przeprowadziła grupa Marini-Bettolo (21). Później szczegółowsze badania wykonano w laboratorium Auda (3). W pracach nad alkaloidami skytantyny Auda i współpracownicy podawali 2 - ^{14}C -DL-lizynę, 2 - ^{14}C -DL-mewalonian i L-N- ^{14}C -metylometioninę, wstrzykując je do łodygi rośliny. Po 80 godzinach hodowli w wyekstrahowanych i rozdzielonych związkach badano rozkład radioaktywności. W alkaloidach skytantyny znaleziono 0,56% radioaktywności pochodzącej z 2 - ^{14}C -DL-mewalonianu, 0% z 2 - ^{14}C -DL-lizyny i 1,04% z L-N- ^{14}C -metylometioniny. Dowodzi to, iż szkielet węglowy alkaloidów skytantyny powstaje z mewalonianu, a nie z lizyny. Ewentualność degradacji mewalonianu przed włączeniem można odrzucić, gdyż rozkład znakowania wskazuje na włączenie specyficzne dla biosyntezy jednostki izopentenyłowej. Stosując degradację chemiczną β -skytantyny (IX) uzyskanej po podaniu radioaktywnej L-N- ^{14}C -metylometioniny stwierdzono, że azot w ugrupowaniu N-CH₃ cząsteczki alkaloidu pochodzi z analogicznej grupy N-metylometioniny. Podobne doświadczenia, mające na celu ustalenie drogi powstawania w organizmach roślinnych werbenaliny (XIV), plumeridu (XIII), aktynidyny (X) i gencjopikrozydu (XVI) udowodniły, że powstają one również z prekursorów terpenowych.

Podczas badań nad biosyntezą β -skytantyny zaobserwowano po raz pierwszy w przypadku monoterpenów metylocyklopentanowych zjawisko tak zwanej randomizacji znakowania. Pod terminem tym rozumie się ogólnie rozkład znakowania w produktach biosyntezy z radioaktywnych prekursorów, pomiędzy atomy lub grupy zajmujące pozycje równoważne stereochemicznie (bardziej precyzyjne wydaje się tu określenie: równoważne z punktu widzenia reakcji enzymatycznej). W przypadku biosyntezy jednostki dziesięciowęglowej — prekursora monoterpenów, jak to wykazali między innymi Shah, Cleland i Porter (32) kondensacja dwóch jednostek pięciowęglowych i poprzedzająca ją izomeryzacja pirofosforanu izopentenyłu do pirofosforanu dwumetyloallilu są procesami stereospecyficznymi. Jak widać ze schematu 2 znakowanie pochodzące z 2 - ^{14}C -mewa-



Schemat 2. Biosynteza monoterpeny metylocyklopentanowej według S h a h a i wsp. (32)

lonianu powinno się ograniczać do tylko jednej z dwóch, bliźniaczych grup metylowych a i b oraz atomu węgla d, w pierścieniu cyklopentanowym (XXIV), tymczasem degradacja chemiczna β -skytantyny (IX) wyodrębnionej z 1,3-letnich roślin *Skythanthus acutus* po podaniu $2\text{-}^{14}\text{C}$ -mewalonianu wykazała, iż połowa podanej radioaktywności rozłożona jest równomiernie w atomach węgla dwóch końcowych grup metylowych C-3 i C-9. W β -skytantynie otrzymanej w analogiczny sposób z roślin 3-letnich randomizacja znakowania nie występuje. A u d a (3) postuluje, że przedstawiona wyżej różnica jest odbiciem istnienia różnych mechanizmów kontroli enzymatycznej tego samego procesu — biosyntezy β -skytantyny — w zależności od wieku rośliny. Być może, w roślinach młodych istnieje dodatkowy enzym warunkujący randomizację pośrednika izopentenylowego.

Podobne zjawisko zaobserwowali dla C-15 i C-3 plumeridu (XIII)

Yeowell i Schmid (39), badając biosyntezę tego związku w *Plumeria acutifolia*. Wysuwają oni interesującą hipotezę, że randomizacja znakowania w plumeridzie zachodzi już po zamknięciu pierścienia cyklopentanowego, lecz w momencie, gdy C-3 i C-15 istnieją jeszcze w postaci równoważnych grup aldehydowych. Powstawanie grupy karboksylowej w C-15 plumeridu na drodze utlenienia grupy aldehydowej, jak zakładają autorzy, wydaje się prawdopodobne.

Zjawisko randomizacji znakowania końcowej grupy metylowej występuje też w części izoprenoidowej niektórych alkaloidów (4).

Schmid i wsp. (39) badali również zjawisko randomizacji występujące w innym glukozydzie cyklopentanowym — werbenalinie (XIV). Randomizacja znakowania między C-6 a C-9 nie zachodzi w żadnym z badanych stadiów wzrostowych rośliny, zachodzi natomiast między C-3 a C-8 dla roślin jedno-, dwu- i trzymiesięcznych. W miarę starzenia się rośliny stopień randomizacji między C-3 a C-8 jest coraz mniejszy.

Ograniczoną randomizację znakowania między C-3 a C-8 stwierdzono również badając biosyntezę nepetalaktonu (I) w *Nepeta cataria* (26). W biosyntezie nepetalaktonu występuje jednak, niespotykana w przypadku plumeridu, skytantyny i werbenaliny, randomizacja między C-6 a C-9. Poprzednio opisane zjawisko wymiany znakowania między końcowymi grupami metylowymi C-3 i C-8 można tłumaczyć na przykład swobodną rotacją atomu C-4. Rozkład znakowania między C-6 a C-9 mógłby świadczyć o zachodzeniu randomizacji na poziomie pirofosforanu izopentenylu. Dość trudno jednak pogodzić ten fakt ze stwierdzoną (32) stereospecyficznością izomeryzacji pirofosforanu izopentenylu.

3. Ogólny schemat biosyntezy monoterpenów metylocyklopentanowych

Na podstawie analizy struktur i występowania różnych typów monoterpenów metylocyklopentanowych kilku autorów, między innymi C a v i l l (8) i E i s e n b r a u n (cyt. za W a l l e r e m (37)) starano się podać ogólny schemat ich biosyntezy i wzajemnych powiązań. Najbardziej kompletny schemat podaje Eisenbraun (cyt. za Wallerem (37)) (schemat 3).

Kluczowym związkiem w biosyntezie monoterpenów metylocyklopentanowych jest, według Eisenbrauna, aldehydopirofosforan metylocyklopentanowy (XXVI), powstający z pirofosforanu geranylu (XXV) na drodze stopniowego utleniania (przez alkohol do aldehydu), a następnie cyklizacji. Od etapu aldehydopirofosforanu metylocyklopentanowego (XXVI) schemat wyróżnia dwie zasadnicze drogi: jedna w kierunku tworzenia utlenionych monoterpenów metylocyklopentanowych i ich glikozydów i druga — w kierunku tworzenia alkaloidów metylocyklopentanowych. Utrwalenie struktury cyklopentanowej musi zachodzić już na etapie wspólnym dla obu dróg, o czym świadczy fakt, iż obie serie związków wyprowadzonych od aldehydopirofosforanu metylocyklopentanowego mają identyczne centra asymetrii 7 i 4a (XXVI).

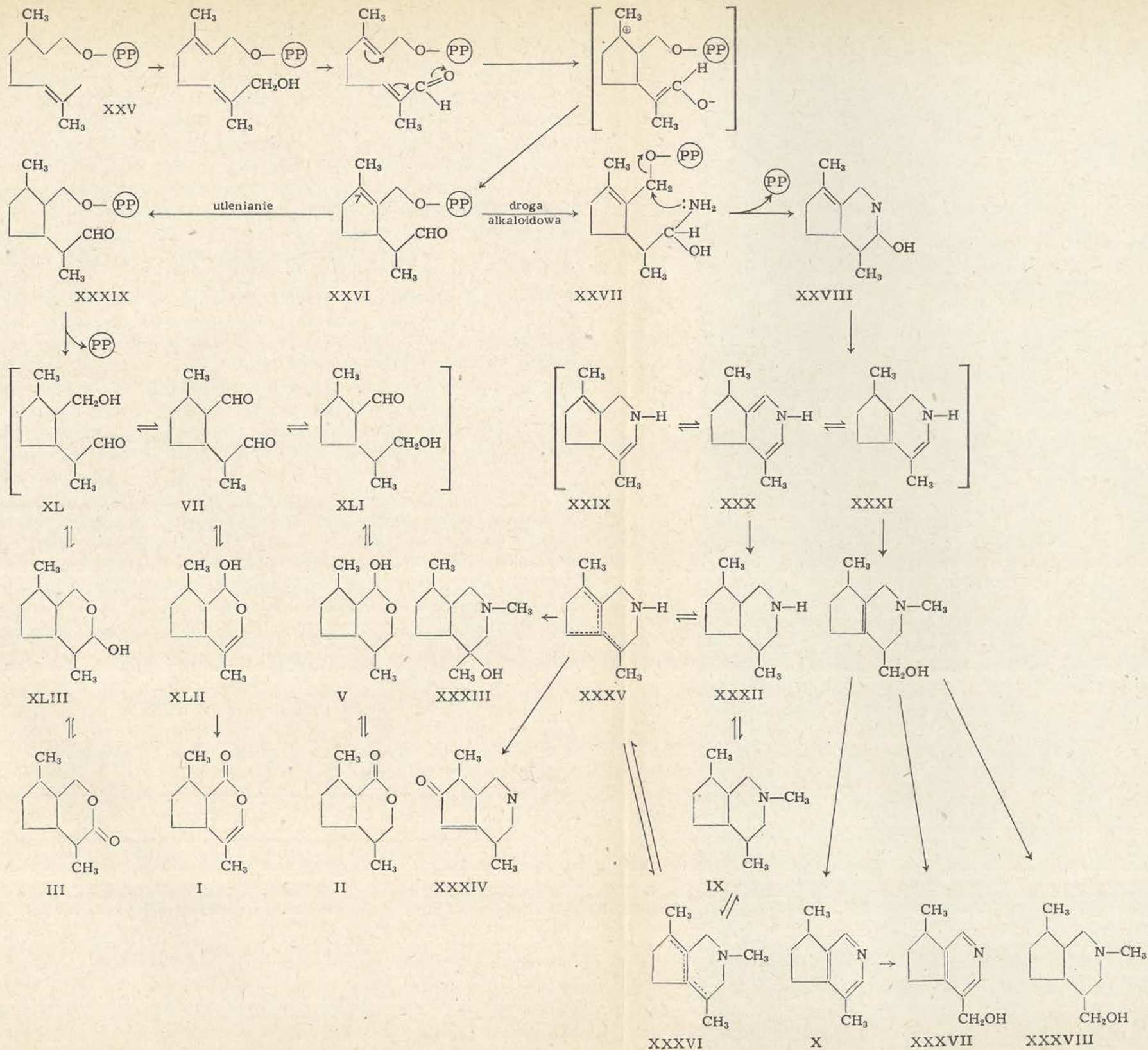
Pierwszy produkt drogi alkaloidowej (XXVII) powstawać może przez biologiczną transaminację aldehydopirofosforanu metylocyklopentanowego (XXVI). Struktura XXVII zawiera reaktywny w tym przekształceniu węgiel karbonylowy, zaś obecność allilowego, podwójnego wiązania ułatwia wewnątrzcząsteczkową, nukleofilową wymianę pirofosforanu przez grupę aminową. Powstający związek XXVIII ulega prawdopodobnie dehydratacji dając w wyniku mieszanie amin z dwoma wiązaniami podwójnymi XXIX, XXX i XXXI. Jest prawdopodobne, że równowaga istniejąca między związkami XXIX, XXX, i XXXI umożliwia częściową redukcję prowadzącą do utrwalenia konfiguracji w pozycjach 7 i 4a, a następnie powstanie struktur nor- α , nor- β i nor- δ -skytantyny (XXXII). Wydaje się też, że ze związku XXXI drogą enzymatycznego odwodorowania powstać może aktynidyna (X). Z chemicznego punktu widzenia istnienie struktury nor-skytantyny (XXXII) wydaje się świadczyć również o istnieniu związków pośrednich XXIX, XXX i XXXI, chociaż nie były one wykrywane. Eisenbraun uważa za prawdopodobne, że mogą być one pośrednikami nigdy nie uwalnianymi ze stałego kompleksu enzymatycznego i dlatego nie wykrywanymi. Dalsze związki na drodze alkaloidowej: hydroksyskytantyna (XXXIII), tekomanina (XXXIV), seria dehydroskytantyny (XXXVI) mogą powstawać w wyniku metylowania, utleniania i hydratacji nor-dehydroskytantyny (XXXV), zaś tekostadina (XXXVII) i tekostanina (XXXVIII) w wyniku hydroksylacji i metylowania związku XXXI.

Droga w kierunku utlenionych monoterpenów metylocyklopentanowych prowadzi przez związek XXXIX powstający w wyniku dehydrogenacji aldehydopirofosforanu metylocyklopentanowego (XXVI). Usunięcie pirofosforanu daje związek XL pozostający w równowadze z irydiodialem (VII) i związkiem XLI. Irydiodial (VII) pozostaje z kolei w równowadze ze swoją formą dwucykliczną (XLII), która, dzięki działaniu dehydrogenazy alkoholowej, może być łatwo utleniona do nepetalaktonu (I). W analogiczny sposób ze związków V i XLIII tworzone mogą być dwuhydronepetalakton (II) i irydimyrmecyna (III).

Z kluczowego pośrednika, aldehydopirofosforanu metylocyklopentanowego (XXVI), przez modyfikacje wskazanego schematu wyprowadzić można większość znanych struktur monoterpenów metylocyklopentanowych. Wyniki badań (21, 39) wskazują, że zarówno utlenianie, jak i powstawanie wiązań nienasyconych w grupie monoterpenów roślinnych zachodzi w węzłowych punktach zgodnie z podanym schematem.

IV. Pokrewieństwo metaboliczne między terpenami a alkaloidami

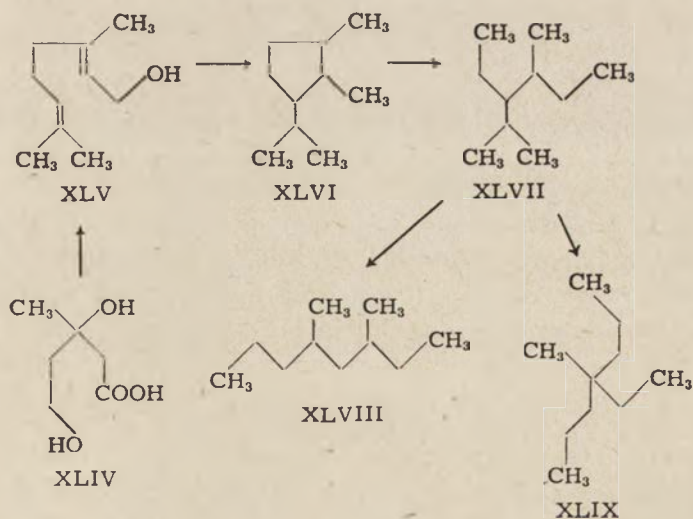
Terpeny, ogólnie rzecz biorąc, stanowią bardziej aniżeli alkaloidy określoną pod względem struktur i biosyntezy klasę związków naturalnych. Zasadniczo można je wywieść z kolejnych etapów kondensacji jed-



Schemat 3. Biosynteza monoterpenów metylcyklopentanowych według Eisenbrauna (cyt. za (37))

nostek izopentenyłowych. Cechy wspólne alkaloidów natomiast często ograniczają się jedynie do występowania w ich cząsteczkach atomów azotu. Podobnie, istnieje większe niż w przypadku terpenów zróżnicowanie w schematach biosyntezy poszczególnych alkaloidów (19, 25). Łączność między tymi dwoma klasami roślinnych produktów naturalnych była już od dość dawna przedmiotem zainteresowania (20, 31, 34, 38).

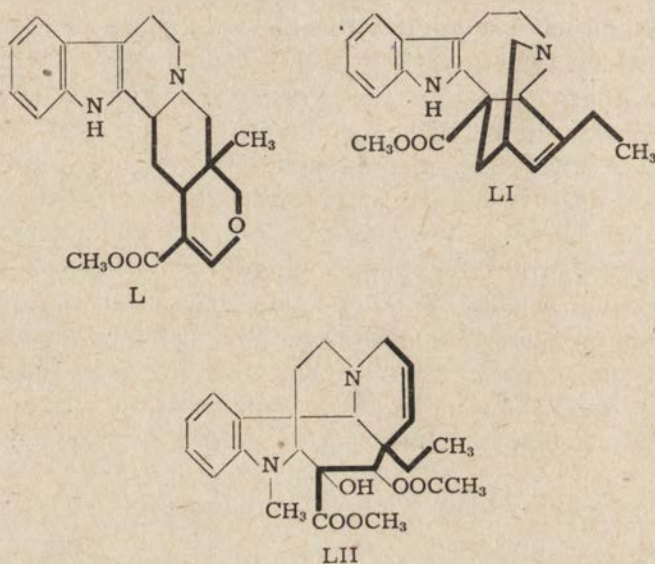
Pomijając stosunkowo mało poznaną grupę alkaloidów terpenoidowych, warto się zatrzymać nad rolą, jaką w biosyntezie jednej z bardziej rozpowszechnionych grup — alkaloidów indolowych, odgrywa jednostka monoterpenu. Z rozmaitych koncepcji biosyntezy nietryptofanowej części alkaloidów indolowych najbardziej obecnie udowodniona wydaje się tak zwana „koncepcja monoterpenu” podana przez Thomasa (34). W 1961 roku Thomas zauważył uderzające podobieństwo pomiędzy złożonymi alkaloidami indolowymi a szkieletem węglowym pewnych, nowo odkrytych alkaloidów i glikozydów o strukturze monoterpenu metylocyklopentanowych. Niezwykle istotne dla potwierdzenia koncepcji Thomasa było wykrycie związków o budowie monoterpenu metylocyklopentanowych w roślinach, w których występują alkaloidy indolowe, między innymi w *Skythanthus acutus* i w roślinach rodzaju *Strychnos*. Obecnie słuszność koncepcji o pochodzeniu nietryptofanowej części alkaloidów indolowych z monoterpenu o strukturze metylocyklopentanowej została już potwierdzona przez wielu badaczy. Battersby i wsp. (4) za jeden z kluczowych prekursorów nietryptofanowej części alkaloidów indolowych uważają glikozyd monoterpenu metylocyklopentanowego — loganinę (XV). Eksperymenty ze znakowaną loganiną udowodniły, że włącza się ona specyficznie do alkaloidów indolowych w *Vica rosea*. Okazało się też, że loga-



Schemat 4. Biosynteza części nietryptofanowej alkaloidów indolowych według T a y l o r a (33)

nina jest prekursorem wielu alkaloidów indolowych między innymi typu: windoliny, katarantyny i ajmalicyny. Na schemacie 4 przedstawiona jest proponowana droga biosyntetyczna nietryptofanowej części pewnych, typowych alkaloidów indolowych.

Schemat zaczyna się od cyklizacji geraniolu (XLIV) do cyklopentanoidu XLVI, w którym następuje rozerwanie pierścienia i przekształcenie w monoterpenoid XLVII. Przemiany związku XLVII dają struktury, których szkielety węglowe ułożone są jak w związkach XLVIII lub XLIX. Te trzy podstawowe monoterpenoidy mogą być z kolei włączane do alkaloidów indolowych jak pokazano obok pogrubionymi liniami. I tak związek XLVII włączałby się do szkieletu ajmalicyny (L) (*Corynanthe*), XLVIII — do ibogainy (LI) (*Iboga*) i XLIX — do windoliny (LII) (*Aspidosperma*).



Wydaje się, że oprócz loganiny również werbenalina (XIV) oraz genjopikrozyd (XVI) mogłyby być monoterpenoidowymi pośrednikami w biosyntezie alkaloidów indolowych.

Jest bardzo prawdopodobne, że przynajmniej w dwóch rodzinach wytwarzających alkaloidy indolowe: *Rubiaceae* (*Cinchona* i *Corynanthe*) i *Apocynaceae* (*Aspidosperma*, *Iboga*, *Vinca*) istnieje bezpośrednia łączność metaboliczna między tymi związkami a terpenami.

LITERATURA

1. Appel H. H., *Scientia* **130**, 1 (1966).
2. Arthur H. R., Johns S. R., Lamberton J. A., Loo S. N., *Aust. J. Chem.* **20**, 2505 (1967).
3. Auda H., Juneja H. R., Eisenbraun E. J., Waller G. R., Kays W. R., Appel H. H., *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 2476 (1967).

4. Battersby A. R., Brown R. T., Kapil R. S., Plunkett A. O., Taylor J. B., *Chem. Comm.* **2**, 47 (1966).
5. Battersby A. R., Brown R. T., Knight J. A., Martin J. A., Plunkett A. O., *Chem. Comm.* **2**, 346 (1966).
6. Battu R. G., Youngken H. W., *Lloydia* **29**, 360 (1966).
7. Casinovi G. G., Giovannozzi-Sermanni G., Marini-Bettolo G. B., *Gazz. Cim. Ital.* **94**, 1356 (1964).
8. Cavill G. W. K., Hinterberger H., *Aust. J. Chem.* **13**, 514 (1960).
9. Cavill G. W. K., Robertson Phyllis L., *Science* **149**, 1337 (1965).
10. Coscia C. J., Guarnaccia R., *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1280 (1967).
11. Djerassi C., Kutney J. P., Shamma M., *Tetrahedron* **18**, 183 (1962).
12. Eisner T., *Science* **146**, 1318 (1964).
13. Eisner T., *Science* **148**, 966 (1965).
14. Fraenkel G. S., *Science* **129**, 1466 (1959).
15. Fusco R., Trave R., Vercellone A., *Chimica e industria (Milan)* **37**, 251 (1966).
16. Horodysky A. G., Waller G. R., Eisenbraun E. J., *J. Biol. Chem.* **244**, 3110 (1969).
17. Hyeon, Suong Be; Isoe, Sacchihiko; Sakan Takeo, *Tetrahedron Letters* **51**, 5325 (1968).
18. Isoe Sacchihiko, Ono Teiichi, Hyeon Suong Be, Sakan Takeo, *Tetrahedron Letters* **51**, 5319 (1968).
19. Leete E., *Science* **147**, 1000 (1965).
20. Loew P., Goeggel H., Arigoni D., *Chem. Comm.* **2**, 347 (1966).
21. Marini-Bettolo G. B., *Ann. Ist. Super Sanita* **4**, 489 (1968).
22. McConnell J. F., Mathieson A. L., Schoenborn B. P., *Tetrahedron Letters* str. 445 (1962).
23. McElvain S. M., Bright R. D., Johnson P. R., *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 1558 (1941).
24. Meinwald J., Chadka M. S., Hurst J. J., Eisner T., *Tetrahedron Letters* str. 29 (1962).
25. Mothes K., Schutte H. R., *Biosynthese der Alkaloide*, Veb Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1969.
26. Regnier F. E., Waller G. R., Eisenbraun E. J., Auda H., *Phytochemistry* **7**, 221 (1968).
27. Robinson R., *Tetrahedron* **6**, 217 (1959).
28. Roth L. M., Eisner T., *Ann. Rev. Ent.* **7**, 107 (1962).
29. Sakan T., Fujino A., Murai F., Butsugan Y., Suzui A., *Bull. Chem. Soc. Japan* **32**, 315 (1959).
30. Sakan T., Fujino A., Murai F., Suzui A., Butsugan Y., Terashima Y., *Bull. Chem. Soc. Japan* **33**, 712 (1960).
31. Scott, Aastair J., *J. Am. Chem. Soc.* **21**, 91 (1969).
32. Shah D. D., Cleland W. W., Porter J. W., *J. Biol. Chem.* **240**, 1946 (1965).
33. Taylor W. I., *Science* **153**, 954 (1966).
34. Thomas R., *Tetrahedron Letters* str. 544 (1961).
35. Todd N. B. J., *Heredity* **53**, 54 (1962).
36. Torsell K., Wahlberg K., *Tetrahedron Letters* **8**, 445 (1966).
37. Waller G. R., *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, Pergamon Press, Londyn 1969, t. X, cz. 2.
38. Wenkert E. J., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 98 (1962).
39. Yeowell D. A., Schmid H., *Experientia* **20**, 250 (1964).

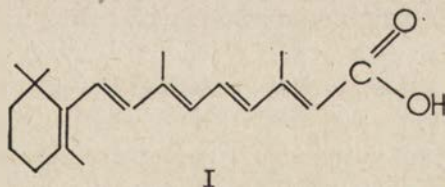
TERESA BARANKIEWICZ*, MAGDALENA MILER**

Funkcje i metabolizm kwasu retinowego***

Function and Metabolism of Retinoic Acid

The presented survey deals with physiological role of the retinoic acid. The special consideration is given to its interaction with vitamin A metabolism.

Od odkrycia witaminy A do chwili obecnej poznano już dość dobrze budowę chemiczną tej witaminy i jej pochodnych. Sądzono, że te różnorodne związki o właściwościach witaminy A spełniają odmienne funkcje w organizmie. Biochemiczną rolę witaminy A na poziomie molekularnym wyjaśniono jedynie w procesie widzenia (57, 63). W dalszym ciągu pozostaje natomiast nieznanym mechanizm biochemiczny, dzięki któremu witamina stymuluje wzrost, rozwój i rozmnażanie. Dlatego poszukuje się aktywnej formy witaminy A, która albo mogłaby odgrywać pośrednią rolę w metabolizmie, albo być specyficzną dla każdego z tych procesów. Istnieją poglądy, że forma alkoholowa witaminy A — retinol — nie jest formą aktywną w ogólnym metabolizmie ssaków i ptaków. Przypuszcza się, że aktywnym związkiem jest raczej albo sam kwas retinowy (I) albo jego pochodne.



* Mgr, Instytut Botaniki, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

** Mgr inż., Katedra Technologii i Higieny Żywnienia Człowieka, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

*** Nomenklatura według Komisji Nazewnictwa Biochemicznego IUPAC-IUB (26): retinol — alkohol witaminy A, retinal — retinen — aldehyd witaminy A, kwas retinowy — forma kwasowa witaminy A, retinoilo — β -glukuronid — β -glukuronid kwasu retinowego

Wykaz stosowanych skrótów: *all-trans* kwas retinowy (retinol, retinal) o wszystkich wiązaniach podwójnych w położeniu *trans*

I. Fizjologiczne działanie kwasu retinowego jako jednej z form witaminy A

Kwas retinowy i jego estry zostały wykryte w 1946 roku przez dwóch badaczy holenderskich Van Dorpa i Arensa (56) podczas przeprowadzania syntezy chemicznej retinolu. Badacze ci (55) w doświadczeniach na szczurach stwierdzili, że związek ten wykazuje stosunkowo wysoką aktywność biologiczną. Sól sodowa kwasu retinowego podana doustnie pobudzała w takim samym stopniu jak retinol wzrost szczurów zubożonych w witaminę A. Jednakże forma kwasowa witaminy A nie chroniła zwierząt przed zaburzeniami w procesie widzenia, a więc nie mogła spełniać roli retinalu, formy niezbędnej do prawidłowego przebiegu tego procesu (57). Nasunęło to wniosek, że w organizmie nie może zachodzić redukcja kwasu retinowego do retinalu (44, 55).

Dowling i Wald (10) potwierdzili, że kwas retinowy może spełniać podstawowe funkcje witaminy A w organizmie szczura, utrzymując zwierzęta w dobrym ogólnym stanie zdrowia i umożliwiając im normalny wzrost. Autorzy ci wykazali również, że forma kwasowa nie jest formą aktywną w tworzeniu pigmentów wzrokowych. U szczurów karmionych dietą zawierającą kwas retinowy obserwowano rozwijanie się ślepoty zmierzchowej, która w końcowej fazie prowadziła do całkowitej utraty wzroku. Dokładniejsze badania chorego narządu wzroku pozwoliły określić patologię zmian strukturalnych charakteryzującą się zmniejszonym stężeniem rodopsyny, utratą opsyny i rozpadem zewnętrznych części pręcików oka. Podawanie przez dłuższy okres czasu kwasu retinowego wywoływało kurczenie się wewnętrznych części pręcików i nieodwracalne zmniejszanie się w nich liczby komórek nerwowych, co w końcowym stadium zmian prowadziło do nieodwracalnej ślepoty.

Thompson i Howell (51) wykazali brak aktywności kwasu retinowego w procesach rozmnażania zwierząt. Szczury na diecie bez retinolu, a zawierającej kwas retinowy rosły dobrze, wyglądały zdrowo, ale stopniowo traciły wzrok i stawały się bezpłodne. U samic szczurów w trzecim tygodniu ciąży pojawiała się martwica łożyska, której towarzyszyła resorpcja płodu. Niedobór witaminy A u samców powodował zahamowanie spermatogenezy, które następowało po normalnym wytworzeniu spermatogonii i spermatocytów, przy czym stwierdzano również zmiany martwicze w jądrach i nasieniowodach (23). Podawanie samcom i samicom retinolu przywracało stan normalny. Retinol odgrywa zasadniczą rolę także w reprodukcji ptaków i nie może być zastąpiony przez kwas retinowy (52). W przeciwieństwie do samców szczurów, u kogutów na diecie zawierającej kwas retinowy obserwowano normalny przebieg spermatogenezy. Kury na takiej samej diecie niosły się dobrze, nie ustępując w produkcji jaj grupie kontrolnej, która otrzymywała retinol. Zarodki, które rozwijały się w jajach pochodzących od kur, otrzymujących wyłącznie kwas retino-

wy, początkowo rozwijały się normalnie, a zmiany pojawiały się dopiero po 48 godzinach inkubowania jaj. Efekt ten okazał się odwracalny, bo po podaniu tym samym kurom retinolu następował normalny rozwój zarodka. Autorzy przypuszczają, że kwas retinowy podawany kurom spełnia rolę witaminy A niezbędnej dla niesienia się kur, ale nie może zastąpić retinolu w prawidłowym rozwoju zarodka. Prawdopodobnie kwas retinowy nie jest przenoszony do jaja i zarodek ginie z braku witaminy A. Ponieważ deficyt witaminy A u rosnących zwierząt odbija się szczególnie ujemnie na pewnych tkankach jak nabłonek, kości i system nerwowy, brak retinolu w rozwijającym się zarodku jest wystarczającym powodem zahamowania jego rozwoju, a w końcowej fazie zamarcia (39). Według Krishna-murthy i wsp. (29) forma kwasowa witaminy A w dawkach do 100 μ g jest wystarczająca dla pobudzenia wzrostu, ale nie chroni kurcząt przed powstawaniem zmian patologicznych w oku i centralnym systemie nerwowym.

Pierwsze porównanie aktywności biologicznej kwasu retinowego i retinolu przeprowadzili Van Dorp i Arens (55), wykazując za pomocą testu wątrobowego, że obie te formy witaminy A mają prawie taką samą aktywność biologiczną. Natomiast Mahadevan i wsp. (33) są zdania, że kwas retinowy pobudza wzrost szczurów silniej niż retinol. Wydaje się jednak, że zagadnienie aktywności biologicznej kwasu retinowego nie jest dotychczas całkowicie wyjaśnione, na co zwracają uwagę Zile i De Luca (70). Autorzy ci stwierdzili, że kwas retinowy ma mniejszą aktywność biologiczną niż retinol, co tłumaczą szybszym metabolizmem i wydalaniem formy kwasowej. Byłoby to zgodne z danymi Hoppego (22), który stwierdził, że aktywność kwasu retinowego wynosiła około 61—67% aktywności retinolu. Na ogół uważa się, że różnice między kwasem retinowym i retinolem w zapobieganiu objawom niedoboru witaminy A są stosunkowo niewielkie, przy czym mogą być spowodowane różnym stopniem absorpcji i stabilności oraz nieco innym mechanizmem i szybkością transportu tych dwóch form w organizmie (49).

De Man i wsp. (5) w doświadczeniu na kurczętach i szczurach porównali aktywność biologiczną form *all-trans* kwasu retinowego i octanu retinolu, stwierdzając, że oba te związki wykazują na ogół zbliżoną aktywność.

Malathi i wsp. (34) badając zmiany ciężaru ciała szczurów zubożonych w witaminę A stwierdzili, że kwas retinowy podawany dootrzewnowo posiadał 141% aktywności octanu witaminy A, co może się wiązać z gorszym wykorzystaniem formy octanowej wprowadzonej tą drogą (49).

Thompson i Pitt (53) zwrócili uwagę, że toksyczność retinolu dla organizmu zwierzęcego jest wynikiem jego utleniania do kwasu retinowego. Autorzy ci sugerują, że kwas retinowy jest znacznie bardziej toksyczny niż retinal i retinol, a duży nadmiar tego kwasu powoduje ostre objawy hiperwitaminozy (54). Kwas retinowy jest co najmniej 500 razy

bardziej toksyczny niż retinol (52). Nawet 0,5 μg kwasu retinowego wstrzykniętego do jaja kurzego wstrzymuje rozwój zarodka. Jednak według H o p p e g o (22) kwas retinowy i retinol podawane w dużych dawkach są jednakowo toksyczne.

Różnorodność objawów patologicznych związanych z niedoborem witaminy A wskazywałaby, że witamina ta spełnia więcej niż jedną funkcję biologiczną. Nadal nie wyjaśniony jest sposób działania poszczególnych form witaminy A, których obecność w organizmie zapobiega powstawaniu szeregu zmian patologicznych, jak: zahamowanie wzrostu, rogowacenie nabłonka, uszkodzenie systemu nerwowego, zaburzenia w rozmnażaniu i wiele innych.

Uważa się obecnie, że retinol i kwas retinowy mogą odgrywać rolę niezbędnych kofaktorów szczególnie w dwóch systemach biochemicznych, mianowicie w syntezie mukopolisacharydów (40, 60) oraz w tworzeniu i metabolizmie hormonów sterydowych (25, 58).

II. Źródła kwasu retinowego w organizmie

Brak metod pozwalających na identyfikację kwasu retinowego w tkankach zwierząt był przyczyną wątpliwości co do naturalnego występowania tego związku (1, 29, 41, 44, 59). Jednak ostatnio udało się stwierdzić, że kwas retinowy pojawia się przejściowo w kilku tkankach wkrótce po podaniu w diecie lub drogą pozajelitową gotowej formy kwasowej, a także po podaniu retinalu, retinolu i karotenu (6, 12, 15, 24, 37).

Od dawna było wiadomo, że pewne tkanki ssaków mogą przekształcać β -karoten w retinal. Mechanizm tego procesu poznano dość dobrze, ale nie wyjaśniono należycie dalszych przemian powstałego retinalu (19, 21, 38). G o o d m a n i w s p. (21) stwierdzili, że rozerwanie cząsteczki β -karotenu następuje w miejscu podwójnego wiązania przy C_{15} — C_{15} , z wytworzeniem dwóch cząsteczek retinalu. Enzymy rozszczepiające to wiązanie występują w rozpuszczalnej frakcji śluzówki jelita oraz w wątrobie. Po podaniu β -karotenu *in vivo* wykryto w nabłonku jelitowym, limfie i wątrobie retinol i estry retinylowe, a także niewielkie ilości nie określonego bliżej związku o charakterze kwasu (7, 18, 24, 36, 50). Na podstawie badań nad metabolizmem β -karotenu C r a i n i w s p. (3) sugerowali, że β -karoten jest przekształcany nie w retinol, a w inne produkty, a Z a c h m a n i O l s o n (66) stwierdzili, że jednym z tych produktów może być kwas retinowy, o czym już wcześniej donosili inni autorzy (2).

C r a i n i w s p. (4) inkubowali β -karoten z frakcją rozpuszczalną nabłonka jelitowego i stwierdzili, że choć głównym produktem reakcji był retinal (90%), powstawały również niewielkie ilości kwasu retinowego. Dodanie NAD lub zredukowanego NAD do preparatu enzymatycznego

z nabłonka powodowało dziesięciokrotne zwiększenie ilości kwasu retinowego w mieszaninie inkubacyjnej. Również w doświadczeniach *in vivo* po podaniu szczurom β -karotenu znajdowano oznaczalne ilości kwasu retinowego w tkankach zwierząt. Dane te wskazują na obecność w nabłonku jelitowym szczura układu lub układów enzymatycznych zdolnych do degradacji β -karotenu do kwasu retinowego. Pierwszym etapem byłyby przemiana β -karotenu w retinal, a następnie utlenienie do kwasu retinowego na drodze bezpośredniej lub poprzez retinol, przy czym zarówno NAD, jak i zredukowany NAD stymulują ten proces. Crain i wsp. (4) przypuszczają, że wspomniane układy enzymatyczne mają własności podobne do oksydazy retinalu wyodrębnionej z wątroby szczura przez Mahadevana i wsp. (33).

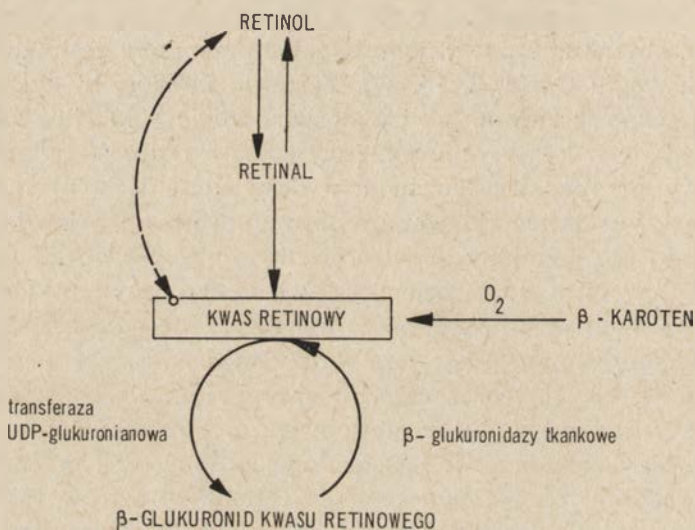
Podobne obserwacje poczyniono badając przemiany retinalu znakowanego ^{14}C na węglu C_{15} (4, 6, 15, 17). Zarówno *in vivo*, kiedy znakowany retinal podawano szczurom, jak i w doświadczeniach *in vitro* związek ten przekształcał się w kwas retinowy, przy czym wydajność tej reakcji była wyższa niż w przypadku β -karotenu: w doświadczeniach *in vivo* 24% podanej radioaktywności znajdowano w formie kwasowej w krwi żyły wrotnej, a wydajność przemiany *in vitro* oceniono na 80—90%. Na podstawie doświadczeń *in vitro* stwierdzono, że własności enzymu katalizującego przemianę retinalu w kwas retinowy nie różnią się od własności enzymu katalizującego przemianę β -karotenu w ten kwas.

Ostatnio (4, 13, 16) coraz częściej przypuszcza się, że znaczna część retinalu jest utleniana do kwasu retinowego w nabłonku jelitowym zwierząt, skąd jest wchłaniana do układu krwionośnego. Ta przemiana, obok innej, prowadzącej od retinalu poprzez retinol do estrów retinylowych, uważanej za główną, jest prawdopodobnie jedną z alternatywnych dróg przemian w warunkach fizjologicznych o dotychczas nieznanym znaczeniu (13, 16). Przypuszcza się, że przekształcenie retinalu w kwas retinowy jest procesem nieodwracalnym (67), co mogłoby wyjaśniać niemożność zastąpienia aldehydowej formy witaminy A przez formę kwasową w leczeniu zmian patologicznych występujących w narządach wzroku przy niedoborze witaminy A.

Fidge i wsp. (16) stwierdzili, że obydwie formy witaminy A, retinol i retinal, przekształcają się w kwas retinowy z prawie jednakową wydajnością (15—20%), co może nasuwać przypuszczenie, że również pewna część retinolu z pożywienia może być utleniona do kwasu w nabłonku jelitowym i wchłonięta do krwiobiegu. Nabłonek jelitowy nie jest jedynym poznanym miejscem powstawania kwasu retinowego w organizmie zwierząt. Także enzymy wątroby przekształcają zarówno retinal, jak i retinol w kwas retinowy (9, 14, 17, 33) (schemat 1). Wydaje się, że enzymem warunkującym to przekształcenie jest wątrobowa dehydrogenaza aldehydowa, którą za pomocą frakcjonowania można oddzielić od dehydrogenazy alkoholowej (33).

III. Identyfikacja β -glukuronidu kwasu retinowego

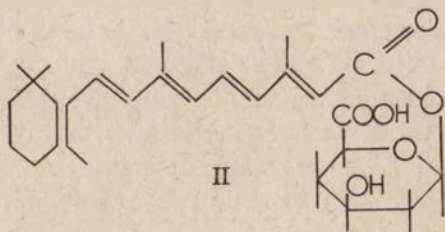
Przypuszcza się, że β -karoten, retinol i retinal, podane *per os*, mogą ulec nieodwracalnemu utlenieniu do kwasu retinowego przez enzymy śluzówki błony jelitowej, a w przypadku podania drogą poza jelitową — przez odpowiednie enzymy wątroby (9, 14, 17, 33) (schemat 1). Kwas retinowy, zarówno podany zwierzętom w postaci gotowej, jak i powstający w ich organizmie z innych form witaminy A, transportowany jest przez krew i krąży w układzie jelitowo-wątrobowym. Produkty przemian kwasu retinowego są mało poznane.



Schemat 1. Współzależności między różnymi formami witaminy A i kwasem retinowym

U kilku gatunków zwierząt stwierdzono bardzo szybkie znikanie znakowanego kwasu retinowego z krwi, wątroby, nerki i jelita po podaniu doustnym lub poza jelitowym; po 24 godz. znajdowano ten kwas już tylko w ilościach śladowych (10, 27, 29, 41, 44, 68). Radioaktywność pochodząca z podanego kwasu retinowego znajdowano głównie we frakcji białkowej analizowanych tkanek, ekstrahowanej rozpuszczalnikami polarnymi (28). Radioaktywny produkt, bardziej polarny niż kwas retinowy (12, 66), był wydalany głównie z żółcią (65, 66). Dunagin i wsp. (11) wyizolowali ten główny produkt metabolizmu kwasu retinowego i stwierdzili, że oczyszczony preparat zawierał jako główny składnik związek o niektórych właściwościach zbliżonych do kwasu retinowego. Na podstawie wyników badań struktury tego związku, przeprowadzanych metodami chemicznymi i fizycznymi oraz za pomocą inkubacji z β -glukuronidazą, autorzy ci przypuszczali, że głównym produktem metabolizmu kwasu retinowego występ-

pującym w żółci jest jego β -glukuronid (retinoilo- β -glukuronid) (II). Późniejsze dane (13) potwierdziły te sugestie.



Badania przeprowadzone metodą chromatografii jonowymiennej wykazały, że pochodne kwasu retinowego z żółci rozdzielają się na kilka frakcji (4, 35), z których frakcja polarnych związków- β -glukuronidowych wykazywała większą radioaktywność niż wolny kwas i jego pochodne estrowe.

IV. Miejsce syntezy β -glukuronidu kwasu retinowego

Szybkie znikanie kwasu retinowego z wątroby i innych tkanek (12, 15), obecność rozpuszczalnych w wodzie metabolitów tego związku w wątrobie i jelicie (29, 62), a także pojawianie się β -glukuronidów w żółci nasuwało przypuszczenie, że synteza tych pochodnych przebiega w wątrobie (65). Z a c h m a n i wsp. (64), a także Y a g i s h i t a i wsp. (62) zaobserwowali powstawanie tych pochodnych zarówno w wyizolowanej wątrobie, jak również *in vivo* po wstrzyknięciu znakowanego ^{14}C kwasu retinowego do żyły wrotnej szczura z podwiązanym przewodem żółciowym. Na tej podstawie autorzy wysunęli przypuszczenie, że głównym miejscem tworzenia β -glukuronidów kwasu retinowego jest wątroba. L i p p e l i O l s o n (32) otrzymali retinoilo- β -glukuronid inkubując kwas retinowy z mikrosomami wątroby szczura. L i p p e l (31) stwierdził, że enzym wątroby szczura warunkujący syntezę retinoilo- β -glukuronidu, a mianowicie transferaza przenosząca resztę kwasu glukuronowego z UDP-glukuronianu na resztę kwasu retinowego, jest podobny do innych enzymów syntetyzujących glukuronidy. Optymalne *pH* działania tego enzymu znajduje się w zakresie 7—8; szybkość tworzenia β -glukuronidu *in vitro* w temperaturze 37°C wynosi 0,5—5,0 μg na godzinę na miligram białka frakcji mikrosomalnej z wątroby. Jedynym produktem reakcji jest retinoilo- β -glukuronid.

W warunkach *in vivo* o szybkości tworzenia pochodnych kwasu retinowego w wątrobie można wnioskować na podstawie szybkości pojawiania się ich w żółci. Z a c h m a n i wsp. (67) badali szybkość wydalania metabolitów kwasu retinowego u kurcząt i świnek morskich. Już w 6 godzin od momentu dożylnego wstrzyknięcia zwierzętom znakowanego ^{14}C kwasu retinowego znajdowano w żółci aż 20—30% podanej radioaktywności. Temu

szybkiemu i ciągłemu wydalaniu towarzyszyło obniżenie ilości ^{14}C -kwasu retinowego w tkankach. Nath i Olson (35) badali szybkość wydalania pochodnych kwasu retinowego z żółcią u szczurów z niedoborem witaminy A, którym podano znakowany retinol. Autorzy ci stwierdzili, że metabolity te wydzielane są w sposób ciągły z szybkością $0,3\mu\text{g}$ na mililitr żółci. Prawdopodobnie zatem wydalanie β -glukuronidów kwasu retinowego z żółcią u różnych gatunków zwierząt jest normalnym procesem fizjologicznym w przypadku podawania kwasu retinowego, natomiast w przypadku podawania innych form witaminy A jedynie jedną z możliwych dróg metabolicznych (16).

Przemiana kwasu retinowego w pochodne β -glukuronidowe zachodzi nie tylko w wątrobie. Już Dunagin i wsp. (11) szukając miejsca powstawania pochodnych β -glukuronidowych zwrócili uwagę na ich obecność w jelitach zwierząt i przypuszczali, że w nabłonku jelita może zachodzić również synteza tych związków. Dane innych autorów (31, 64, 65, 66, 67) również wskazywały na tę możliwość, gdyż metabolity kwasu retinowego znaleziono w ścianach jelita i jego światle nawet u szczurów z podwiązanym przewodem żółciowym, co wskazywałoby, że β -glukuronid kwasu retinowego powstaje w nabłonku jelita. Lippel (31) wykrył w mikrosomach nabłonka jelitowego szczura transferazę glukuronylową działającą *in vitro* w takich samych warunkach jak enzym występujący w mikrosomach wątroby. Obecnie uważa się, że kwas retinowy może być przekształcany w β -glukuronid również w nabłonku jelita, skąd prawdopodobnie jest on przenoszony przez układ żyły wrotnej do wątroby.

V. Krążenie jelitowo-wątrobowe pochodnych kwasu retinowego

W ciągu ostatniego dziesięciolecia wykryto polarne pochodne retinolu w płazmie, moczu, kale, jelicie i wątrobie kurcząt i szczurów (20, 35, 42, 45, 59, 61). Stwierdzono także szybki metabolizm retinolu i wydalanie jego glukuronowych pochodnych z żółcią (28, 29), podobnie jak wielu innych związków: bilirubiny, witaminy K i szeregu pochodnych sterydowych (8, 48). Jednakże część tych metabolitów nie jest ponownie wchłaniana z jelit w przeciwieństwie do retinoilo- β -glukuronidu, który bierze udział w krążeniu jelitowo-wątrobowym (11, 25), podobnie jak kwasy i barwniki żółciowe oraz cholesterol (64). Wykrycie szybkiego łączenia się kwasu retinowego z kwasem glukuronowym w wątrobie, wydalania glukuronidów z żółcią i ich częściowej resorpcji z jelit (64, 65) rzuciło dużo światła na niektóre trudne do wyjaśnienia przedtem aspekty metabolizmu kwasu retinowego.

Według Natha i Olsona (35) podawane dootrzewnowo metabolity kwasu retinowego są wydalone w kale i moczu z szybkością podobną do wydalania z żółcią. Metabolity te pojawiają się najpierw w moczu jako

glukuronidy, a następnie w kale głównie jako wolne retiniiany. Według tych autorów odzyskanie podanych związków w moczu wynosiło 10%, natomiast w kale wahało się od 40 do 65% podanej dawki, w zależności od tego czy podawany był retinol czy kwas retinowy. Jest to zgodne z wcześniejszymi danymi, że kał jest główną drogą wydalania metabolitów witaminy A z organizmu, a większość radioaktywności pochodzącej z podanych związków występuje w kale w formie kwasu retinowego (59, 61). Zdaniem autorów tych prac, występujący w kale kwas retinowy powstaje prawdopodobnie podczas przechodzenia glukuronidu wraz z miazgą pokarmową wzdłuż jelit wskutek hydrolizy retinoilo- β -glukuronidu, która jest katalizowana przez β -glukuronidazę wytwarzaną przez mikroflorę jelitową.

Fizjologiczne znaczenie krążenia jelitowo-wątrobowego pochodnych różnych form witaminy A nie jest jeszcze w pełni wyjaśnione. Wprawdzie pochodne retinolu i kwasu retinowego w formie biologicznie aktywnych glukuronidów wydalają się głównie z żółcią (16, 35), jednak ponieważ wiele związków bierze udział w krążeniu jelitowo-wątrobowym bez wyraźnego znaczenia fizjologicznego, udział w nim pochodnych witaminy A nie koniecznie musi świadczyć o funkcjonalnym znaczeniu tego procesu.

VI. Aktywność biologiczna β -glukuronidów kwasu retinowego

Lakshmann i wsp. (30), a także Sundaresan i wsp. (47) wysuwali przypuszczenie, że istnieje „aktywna forma” witaminy A, która bierze bezpośredni udział w przemianach metabolicznych związanych z biologicznym działaniem zarówno alkoholowej, jak i aldehydowej formy tej witaminy. Gdy wykryto, że kwas retinowy wykazuje aktywność biologiczną podobną do aktywności witaminy A (35, 62), rozważano możliwość, że właśnie ta pochodna jest poszukiwaną „formą aktywną”. Ponieważ nie udało się wykryć podawanego zwierzętom kwasu retinowego w ich tkankach (1, 29, 41, 44, 59) przypuszczano, że kwas retinowy ulega w organizmie przekształceniu w związek aktywny metabolicznie (62, 65). Sugestie te potwierdzała obecność rozpuszczalnych w wodzie metabolitów kwasu retinowego w żółci (65, 66). Taki metabolit o aktywności biologicznej podobnej do aktywności witaminy A wyodrębniono zarówno po podaniu szczurom retinolu (62), jak i kwasu retinowego (43, 69). Dunagin i wsp. (11), którzy określili strukturę chemiczną tego metabolitu, próbowali wyjaśnić jego funkcję biologiczną. Według tych autorów β -glukuronid kwasu retinowego mógł być aktywną formą kwasu retinowego albo w postaci niezmienionej, albo po uwolnieniu kwasu retinowego przez β -glukuronidazę powszechnie występującą w tkankach ssaków (37).

Nath i Olson (35) w doświadczeniach na szczurach z niedoborem witaminy A określili aktywność biologiczną β -glukuronidu kwasu retinowego. Stwierdzili oni, że związek ten podany dootrzewnowo w dużych daw-

kach (27 μ g) wyraźnie pobudzał wzrost zwierząt. Według testu wzrostowego aktywność biologiczną β -glukuronidu oceniono na około 30—100% aktywności *all-trans* kwasu retinowego i *all-trans* retinolu.

VII. Inne drogi metabolizmu kwasu retinowego

Przemiany metaboliczne kwasu retinowego zachodzące w wątrobie i w jelicie prowadzą do powstania produktów z nienaruszonym łańcuchem izoprenoidowym, które Dunagin i wsp. (11) scharakteryzowali jako β -glukuronidy kwasu retinowego (retinoilo- β -glukuronidy).

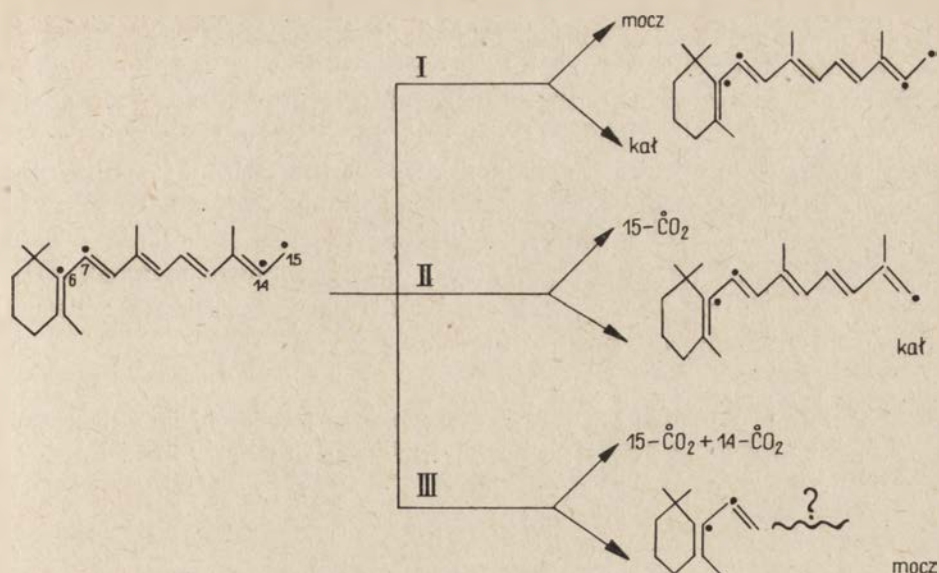
Nie wydaje się, aby przekształcenie do β -glukuronidów stanowiło jedyłą przemianę metaboliczną kwasu retinowego w organizmie zwierząt. Wprawdzie Lippel (31) nie znalazł metabolitów będących strukturalnymi modyfikacjami kwasu retinowego, jednak już wcześniej Dunagin, Zachman i Olson (13) donosili o możliwości niewielkich zmian w łańcuchu węglowym tego związku.

Zagadnieniem przemian metabolicznych kwasu retinowego, polegających na zmianach w jego strukturze chemicznej, zajmowali się Roberts i de Luca (42). Przeprowadzili oni doświadczenie na zwierzętach z niedoborem witaminy A, którym podawano kwas retinowy znakowany w pozycji C₁₅, C₁₄, C₆, i C₇. Na podstawie pomiarów radioaktywności w wydychanym z płuc CO₂, w moczu i w kale zwierząt doświadczalnych autorzy ci sugerują co najmniej trzy drogi przemian metabolicznych kwasu retinowego, z których dwie prowadzą do zmian długości łańcucha izoprenoidowego od strony grupy karboksylowej (schemat 2), a mianowicie:

- 1) przemiany rodnika kwasu retinowego zachodzące bez zmian w jego łańcuchu węglowym — około 2/3 podanego związku ulega temu przekształceniu (droga I),
- 2) dekarboksylacja węgla z pozycji C₁₅ (droga II),
- 3) eliminacja ¹⁴CO₂ zarówno z pozycji C₁₅ jak i C₁₄, przy czym degradacja nie przebiega dalej niż do C₇ (produkt zawierał znakowane atomy C₆ i C₇ (droga III).

Głównym produktem przemian zachodzących na drodze I są β -glukuronidy kwasu retinowego. Mechanizm usuwania węgla C₁₅ jako krańcowej grupy karboksylowej wydaje się oczywisty, natomiast sprawa sposobu eliminacji C₁₄ jako ¹⁴CO₂ pozostaje nierozwiązana. Istnieje kilka możliwości: kolejna dekarboksylacja C₁₅ i C₁₄, oddzielenie cząstki dwuwęglowej (C₁₄ i C₁₅) lub większego fragmentu węglowego, który jest następnie metabolizowany do CO₂. Wyjaśnienie, w jaki sposób następuje odłączenie C₁₄ w organizmie, wymaga dalszych prac.

Dzięki pracom Sundaresana i Therriaulta (46) nieco więcej wiadomo o szybkości procesów degradacji łańcucha i o ilościowym udziale poszczególnych dróg w metabolizmie rodnika kwasu retinowego. Szybkość



Schemat 2. Przepuszczalne drogi przemian kwasu retinowego (wg 42)

dekarboksylacji C₁₅ jest dużo większa niż C₁₄ i w cztery godziny po wstrzyknięciu szczurom znakowanego kwasu retinowego około 14% radioaktywności CO₂ pochodziło z C₁₅, 7% z C₁₄, a tylko 0,8% z C₇ i C₆. Dekarboksylacja węgla C₁₅ zachodzi zatem bardzo szybko i wydajnie w porównaniu z innymi przemianami.

O przemianach części pierścieniowej kwasu retinowego nie uzyskano dotychczas żadnych danych.

VIII. Uwagi końcowe

Dotychczas nie udało się w pełni wyjaśnić ani mechanizmu działania fizjologicznego witaminy A z wyjątkiem procesu widzenia, ani też przemian metabolicznych prowadzących do degradacji jej cząsteczki.

Odkrycie, że kwas retinowy pobudza wzrost u zwierząt z niedoborem witaminy A, a także stwierdzenie możliwości przekształcania w warunkach *in vivo* retinolu i retinalu w kwas retinowy, oraz niezwykła intensywność dalszych przemian, sugeruje udział tego kwasu w metabolizmie witaminy A. Otwarte pozostaje zagadnienie, czy kwas retinowy uczestniczy bezpośrednio w przemianach cząsteczki retinolu, czy też występuje na bocznym torze prowadzącym poprzez nieznanne jeszcze reakcje do związku z „aktywnością retinolu”. Obserwacje świadczące, że przemiany kwasu retinowego i octanu retinylu przebiegają w ten sam czy przynajmniej podobny sposób (tablica 1), a retinol przed degradacją łańcucha izoprenoidowego ulega utlenieniu do kwasu (42), przemawiają za pierwszą możliwością (sche-

mat 2) Natomiast fakt, że β -glukuronidy wykazują aktywność stymulatora wzrostu (35), popiera drugą możliwość.

Nieznany jest również mechanizm regulujący intensywność metabolizmu witaminy A i jej pochodnej kwasowej. Roberts i de Luca (42) sugerują, że w przypadku degradacji czynnik lub czynniki kontrolujące mogłyby działać w miejscu przekształcenia retinolu czy retinalu do kwasu retinowego. Regulacja mogłaby odbywać się poprzez sprzężenie zwrotne za pośrednictwem kwasu retinowego czy jakiegoś innego metabolitu, lub dzięki niskiej liczbie obrotów enzymu katalizującego przekształcenie różnych form witaminy A w kwas retinowy.

Tablica 1

Udział poszczególnych przemian kwasu retinowego w jego ogólnym metabolizmie. Dla porównania podano obok wartości dla octanu retinyłu (wg 42)

Droga przemian	% kwas retinowy	% octan retinyłu
I	62 — 65	67 — 69
II	18 — 20	9 — 12
III	18 — 20	17 — 19

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac dotyczących czynników regulujących intensywność wydzielania β -glukuronidowych pochodnych kwasu retinowego i innych form witaminy A.

Mimo, że od wielu lat prowadzi się badania metabolizmu kwasu retinowego, określenie roli tego kwasu w działaniu biologicznym i przemianach witaminy A w organizmie zwierząt wymaga dalszych badań.

LITERATURA

1. Arens J. F., van Dorp D. A., *Nature* **157**, 190 (1946).
2. Barna R. K., Barna A. B., *Nature* **197**, 594 (1963).
3. Crain F. D., Lotspeich F. D., Krause R. F., *Federation Proc.* **25**, 521 (1966).
4. Crain F. D., Lotspeich F. D., Krause R. F., *J. Lipid. Res.* **8**, 249 (1967).
5. De Man T. J., van Leeuwen J. R., Roborgh J. R., *Nature* **201**, 77 (1964).
6. Deshmukh D. S., Malathi P., Ganguly J., *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 120 (1965).
7. Deshmukh D. S., Murthy S. K., Mahadevan S., Ganguly J., *Biochem. J.* **96**, 377 (1965).
8. Diczfalusy E., Franksson C., Martinsen B., *Acta Endocrinol.* **38**, 59 (1961).
9. Dmitrowski A. A., *Biochimija* **26**, 109 (1961).
10. Dowling J. M., Wald G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **46**, 587 (1960).

11. Dunagin P. E., Meadows E. H., Olson J. A., *Science* **148**, 86 (1965).
12. Dunagin P. E., Zachman R. D., Olson J. A., *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 432 (1964).
13. Dunagin P. E., Zachman R. D., Olson J. A., *Biochim. Biophys. Acta* **124**, 71 (1966).
14. Elder T. B., Topper Y. J., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 430 (1962).
15. Emerick R. J., Zile M., De Luca H. F., *Biochem. J.* **102**, 606 (1967).
16. Fidge N. H., Shiratori T., Ganguly J., Goodmann D. S., *J. Lipid Res.* **9**, 103 (1968).
17. Futterman S., *J. Biol. Chem.* **237**, 677 (1962).
18. Glover J., Goodwin T. W., Morton R. A., *Biochem. J.* **43**, 109 (1948).
19. Goodman D. S., Huang H. S., *Science* **149**, 879 (1965).
20. Goodman D. S., Huang H. S., Shiratori T., *J. Lipid. Res.* **6**, 390 (1965).
21. Goodman D. S., Huang H. S., Shiratori T., *J. Biol. Chem.* **241**, 192 (1966).
22. Hoppe P., Thesis Tierarztl. Fak. Ludwig-Maximilian's Univ. Munich, 1966.
23. Howell J. Mc C., Thompson J. N., Pitt G. A. J., *J. Reprod. Fert.* **5**, 159 (1963).
24. Huang H. S., Goodman D. S., *J. Biol. Chem.* **240**, 2839 (1965).
25. Johnson B. C., Proc. 6th Internat. Congress Nutrition 1964.
26. IUPAC-IUP Commission on Biochemical Nomenclature, *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 5 (1965).
27. Jurkowitz L., *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 337 (1962).
28. Krishnamurthy S., Bieri J. G., *Federation Proc.* **21**, 475 (1962).
29. Krishnamurthy S., Bieri J. G., Andrews E. L., *J. Nutr.* **79**, 503 (1963).
30. Lakshman M. R., Jungalwala F. B., Cama H. R., *Biochem. J.* **95**, 27 (1965).
31. Lippel K., *Dissertation Abstr. (B)* **27**, 4282 B (1967).
32. Lippel K., Olson J. A., *Federation Proc.* **25**, 218 (1966).
33. Mabadevan S., Murthy S. K., Ganguly J., *Biochem. J.* **85**, 326 (1962).
34. Malathi P., Rao K. S., Sastri S. P., Ganguly J., *Biochem. J.* **87**, 305 (1963).
35. Nath K., Olson J. A., *J. Nutr.* **93**, 461 (1967).
36. Olson J. A., *J. Biol. Chem.* **236**, 344 (1961).
37. Olson J. A., *Pharmacological Rev.* **19**, 559 (1967).
38. Olson J. A., Hayaishi O., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 1364 (1965).
39. Pitt G. A. J., *Intern. Z. Vitaminforsch.* **36**, 249 (1966).
40. Rao K. S., Ganguly J., *Biochem. J.* **98**, 639 (1966).
41. Redfearn E. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **91**, 226 (1960).
42. Roberts A. B., De Luca H. F., *Biochem. J.* **102**, 600 (1967).
43. Rogers W. E., Chang M. L., Johnson B. C., *Federation Proc.* **22**, 433 (1963).
44. Sharman I. M., *Brit. J. Nutr.* **3**, viii (1949).
45. Sundaresan P. R., Therriault D. G., *Federation Proc.* **26**, 635 (1967).
46. Sundaresan P. R., Therriault D. G., *Biochim. Biophys. Acta* **158**, 92 (1968).
47. Sundaresan P. R., Wolf G., *Federation Proc.* **22**, 293 (1963).
48. Taylor J. D., Millar G. J., Jaques L. B., Spinks J. W. T., *Can. J. Biochem. Physiol.* **34**, 1143 (1956).
49. Thompson J. N., *Proc. Nutr. Soc.* **24**, 160 (1965).

50. Thompson S. Y., Braude P., Coates M. E., Cowie A. T., Ganguley J., Kon S. K., *Brit. J. Nutr.* **4**, 398 (1950).
51. Thompson J. N., Howell J. Mc C., Pitt G. A. J., *Proc. Roy. Soc., B* **159**, 510 (1964).
52. Thompson J. N., Howell J. Mc C., Pitt G. J. A., Houghton C. J., *Nature* **205**, 1006 (1965).
53. Thompson J. N., Pitt G. A. J., *Nature* **188**, 672 (1960).
54. Thompson J. N., Pitt G. A. J., *Biochem. J.* **79**, 33P (1961).
55. Van Dorp D., Arens J. F., *Nature* **158**, 60 (1946).
56. Van Dorp D., Arens J. F., *Rec. Trav. Chim.* **65**, 338 (1946).
57. Wald G., *Vitamins and Hormones* **18**, 417 (1960).
58. Wiss O., Gloor U., *Vitamins and Hormones* **18**, 185 (1960).
59. Wolf G., Johnson B. C., *Vitamins and Hormones* **18**, 403 (1960).
60. Wolf G., Johnson B. C., *Vitamins and Hormones* **18**, 439 (1960).
61. Wolf G., Kahn S. G., Johnson B. C., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1208 (1957).
62. Yagishita K., Sundaresan P. R., Wolf G., *Nature* **203**, 410 (1964).
63. Yoshikawa T., Wald C., *Nature* **197**, 1279 (1963).
64. Zachman R. D., Dunagin P. E., Olson J. A., *J. Lipid Res.* **7**, 3 (1966).
65. Zachman R. D., Olson J. A., *Nature* **201**, 1222 (1964).
66. Zachman R. D., Olson J. A., *J. Lipid Res.* **6**, 27 (1965).
67. Zachman R. D., Singer M., Olson J. A., *J. Nutrition* **88**, 137 (1966).
68. Zile M., De Luca H. F., *Federation Proc.* **23**, 294 (1964).
69. Zile M., De Luca H. F., *Biochem. J.* **97**, 180 (1965).
70. Zile M., De Luca H. F., *J. Nutr.* **94**, 302 (1968).

LILIANA KONARSKA *

β -Glukuronidaza

β -Glucuronidase

The occurrence and characteristics of β -glucuronidase and its role in mammalian organisms are reviewed. The diagnostic usefulness of the enzyme assay is briefly discussed.

I. Wstęp

β -Glukuronidaza (glukuronohydrolaza β -D-glukuronidów EC 3.2.1.31) należy do β -glikozydaz. Katalizuje ona hydrolizę β -D-glukuronidów (kwasów β -D-glukopyranozydouronowych) powstających w wyniku połączenia kwasu β -D-glukuronowego z całym szeregiem związków, zarówno egzogicznych i endogennych, zawierających grupy hydroksylowe, karboksylowe, aminowe, iminowe lub tiolowe (52, 56, 199). Do związków tych należą między innymi tyroksyna, kortykosterydy, estrogeny, testosteron, aldosteron, katecholaminy oraz bilirubina (14, 118), wiele leków i trucizn. Zestawienie ich podają Smith i Williams (199) oraz Dohrmann (52).

β -Glukuronidy powstają w wątrobie z kwasu UDP-glukuronowego (52, 55, 57, 94, 204) i odpowiednich aglikonów. Proces ten uważany jest za jeden z mechanizmów detoksykacyjnych, ponieważ wiele związków, fizjologicznie występujących w organizmie, a także wprowadzonych z zewnątrz traci swoją aktywność biologiczną czy też własności toksyczne po połączeniu z kwasem glukuronowym. Poza tym w postaci glukuronidów związki te są lepiej rozpuszczalne w wodzie co sprzyja ich usuwaniu z organizmu (1).

Aktywność β -glukuronidazy (β -GR) u ssaków podlega kontroli hormonalnej. Rola enzymu u ssaków może polegać między innymi na uwalnianiu aktywnych hormonów sterydowych z ich glukuronidów oraz na uwalnianiu aktywnych aglikonów z powstających w organizmie glukuronidowych połączeń (199) różnych leków (większość z nich w postaci glukuronidów jest farmakologicznie nieczynna). β -GR może także brać udział w katabolizmie mukopolisacharydów oraz w dostarczaniu kwasu glukuronowego do syntezy kwasu askorbinowego.

Zmiany aktywności β -GR, które obserwuje się w różnych stanach fizjo-

* Mgr, Katedra Chemii Ogólnej, Akademia Medyczna, Warszawa

logicznych i patologicznych, stały się przyczyną intensywnych badań nad tym enzymem. Obecnie β -GR jest jedną z najlepiej poznanych glikozydaz (137).

II. Metody oznaczania aktywności β -glukuronidazy

Pierwsze metody badania aktywności β -GR polegały na oznaczaniu nierozłożonego substratu lub uwalnianego przez enzym kwasu glukuronowego. Obecnie stosuje się spektrofotometryczne oznaczanie aglikonu uwalnianego z substratu podczas hydrolizy enzymatycznej (65, 136).

Najczęściej stosowanym substratem jest mono- β -glukuronid fenolftaleiny, uzyskiwany z moczu królików, którym wstrzyknięto podskórnie fosforan fenolftaleiny (49, 60, 62, 170). Substrat ten ma wysokie powinowactwo do enzymu i jest gwałtownie hydrolizowany nawet przez nieoczyszczone preparaty enzymatyczne. Aktywność β -GR oznacza się najczęściej metodą Fishmana i wsp. (75), polegającą na pomiarze kolorymetrycznym ilości fenolftaleiny uwolnionej z substratu. Aktywność β -GR wyraża się w jednostkach Fishmana (zwanych inaczej jednostkami fenolftaleinowymi) odpowiadających ilości mikrogramów fenolftaleiny uwolnionej z jej β -glukuronidu w ciągu 1 godziny w przeliczeniu na 1g świeżej tkanki. Oznaczenie wykonuje się w temperaturze 37°C przy optymalnym stężeniu substratu i pH . Metoda ta pozwala oznaczyć 10 μ g aglikonu. Ujemną jej stroną jest wrażliwość barwy roztworu na niewielkie zmiany pH oraz adsorpcja fenolftaleiny przez osady białkowe.

Obok β -glukuronidu fenolftaleiny najczęściej stosowanym substratem jest syntetyczny β -glukuronid *p*-nitrofenolu (111, 168). Barwa roztworu *p*-nitrofenolu nie wykazuje istotnej zależności od pH . Do oznaczania aktywności β -GR metodami kolorymetrycznymi stosuje się również jako substraty β -glukuronidy: fenolu (136), *p*-chlorofenolu (201) i 8-hydroksychinolini (184).

W metodzie fluorymetrycznej jako substrat stosuje się β -glukuronid 4-metylo-7-hydroksykumaryny (130, 160, 224), którego preparatyka jest stosunkowo prosta (156). Metoda ta jest około stokrotnie czulsza od kolorymetrycznej (z β -glukuronidem fenolftaleiny jako substratem) i dlatego znajduje szczególne zastosowanie do oznaczania aktywności β -GR w moczu i krwi (224). Przydatność jej w znacznym stopniu ogranicza jednak wysoka wartość próby kontrolnej. Levey i wsp. (130) przypuszczają, że uwalniany aglikon jest niestabilny, co nie zostało potwierdzone przez innych autorów (122), należy jednak podkreślić, że nie stosowano identycznych warunków oznaczania. Veriety i wsp. (210) podają, że do oznaczeń fluorymetrycznych można stosować 1-naftylo- β -glukuronid jako substrat.

We wszystkich tych metodach preparaty enzymatyczne o wysokiej aktywności właściwej muszą być stabilizowane przez dodanie do badanej

próby roztworu albuminy lub DNA (65, 140), ponieważ wykazują spadek aktywności po rozcieńczeniu.

Aktywność β -GR oznacza się również metodami histochemicznymi (4, 22, 64, 68, 77, 86, 97, 180), które jednak, nawet przy najlepszej technice barwienia, nie pozwalają na oznaczenie całkowitej aktywności enzymu w badanym materiale.

III. Występowanie

β -GR występuje powszechnie w świecie zwierzęcym. Znajduje się ona we wszystkich tkankach i płynach ustrojowych ssaków. Szczególnie wysoką aktywnością β -GR odznaczają się wątroba, nerki, śledziona, najądrza i tkanka rakowa (72). Natomiast w tkance mózgowej, we krwi i moczu aktywność jest zazwyczaj niska. Wyjątek stanowi mocz szczura charakteryzujący się bardzo wysoką aktywnością enzymu. Niską aktywność β -GR we krwi tłumaczyć można zjawiskiem asocjacji enzymu z elementami morfotycznymi (224), np. leukocytami (75, 189, 224) czy płytkami krwi (51).

Poziom β -GR w tkankach ssaków poszczególnych gatunków różni się bardzo znacznie. Na przykład w wątrobie szczura jest on bardzo wysoki (20 000 jednostek fenoltaleinowych na gram świeżej tkanki), natomiast u świni bardzo niski (200 jednostek) (36). Tkanki myszy wykazują średni poziom enzymu, przy czym jest on determinowany dziedzicznie. Wyodrębniono szczepy bogate i ubogie w ten enzym (1, 28). „Wysoki” poziom β -GR u myszy uzależniony jest od pojedynczego dominującego genu (119, 172, 173). Większość hodowanych laboratoryjnie myszy wykazuje aktywność tego enzymu w wątrobie rzędu 2500 jednostek.

Tkanki człowieka charakteryzują się średnim poziomem β -GR, przy czym największą aktywność wykazuje endometrium, a następnie kolejno wątroba, nerki, śledziona, jelita, najądrza, nadnercza, ślinianki i łożysko. Wysoką aktywność obserwuje się również w leukocytach (75).

W gruczole napletkowym samicy szczura (*clitoral gland*) aktywność β -GR jest niezwykle duża (około 2 000 000 jednostek) w stosunku do innych tkanek. Ciekawe, że ten narząd u myszy ma aktywność niższą w porównaniu z innymi tkankami. Aktywność β -GR gruczołu napletkowego u samców i samic szczura pozostaje pod kontrolą hormonów sterydowych (12, 76, 175).

U ssaków β -GR wykryto również w przewodzie pokarmowym (39, 102, 106; 113), gdzie prawdopodobnie może spełniać rolę enzymu trawiennego. Według Williamsa i wsp. (221) β -GR odgrywa prawdopodobnie ważną rolę w jelitowo-wątrobowym krążeniu leków i kontroli ich działania. W związku z tym interesującym zjawiskiem jest występowanie w normalnej żółci 1,4-laktonu kwasu glukocukrowego (VII), silnego inhibitora enzymu (159).

β -GR występuje również u bezkręgowców. Soki trawienne niektórych mięczaków (*Helix pomatia*, *Patella vulgata*) oraz szarańczaków zawierają enzym o aktywnościach rzędu 100 000 jednostek fenoltaleinowych. Enzym ten występuje u niektórych mikroorganizmów jako adaptacyjny lub konstytucyjny, a także jako wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowy. Na uwagę zasługuje wysoki poziom β -GR w makrofagach. Rozmnażanie się ich może powodować wzrost aktywności enzymatycznej komórek (32, 41, 208, 218).

W świecie roślin (126, 216) β -GR występuje tylko sporadycznie i to w niewielkich ilościach (np. w *Scutellaria baicalensis*, *Scutellaria epilobifolia*). Wyczerpujące zestawienie aktywności β -GR w tkankach zwierzęcych i roślinnych podają Levvy i Conchie (128).

IV. Otrzymywanie

Początkowo β -GR otrzymywano ze śledziony (82, 92, 171) i wątroby (11, 78, 191, 198) wołu lub cielęcia (9, 11, 92). Tkanki te nie odznaczają się zbyt wysoką aktywnością enzymu, są jednak materiałem łatwo dostępnym w dużych ilościach.

Preparaty o bardzo wysokiej aktywności otrzymuje się (140) z gruczołu napletkowego samicy szczura. Materiał ten jest wprawdzie trudny do zdobycia w większych ilościach (z jednego osobnika uzyskuje się około 100 mg tkanki gruczołowej), ale jest najbogatszym z dotychczas znanych źródeł enzymu. Levvy i wsp. (140) z preparatu z gruczołu napletkowego o aktywności właściwej 18 000 jednostek fenoltaleinowych na mg białka uzyskiwali frakcję o aktywności ponad 455 000 jednostek. Snaith i Levvy (200) oczyszczając β -GR z gruczołu napletkowego szczura na *Sephadex G-100* uzyskali preparat o aktywności 620 000 jednostek.

W latach 1952—58 ukazało się wiele prac na temat występowania β -GR w soku z przewodu pokarmowego mięczaków (46, 47, 48, 98, 99, 196, 203), który jest kilkakrotnie bogatszym źródłem enzymu niż inne dotąd stosowane. Enzym z *Patella vulgata* (145), a szczególnie z powszechnie występującego u nas winniczka *Helix pomatia* (174) znalazł szerokie zastosowanie, między innymi do hydrolizy glukuronidów hormonów sterydowych występujących w moczu, przy czym stosowano zarówno sok (23, 24, 87, 88, 174), jak i oczyszczone preparaty enzymu (196). Alfson i Yaylor (2) otrzymali z soku żołądkowego *Helix pomatia* β -GR w postaci krystalicznej, która wykazywała jednak niższą aktywność właściwą (rzędu 106 000 jednostek) od preparatu enzymatycznego z gruczołu napletkowego samicy szczura. β -GR otrzymuje się również z mięśnia sercowego wołu (187), z niektórych szczepów bakterii *Escherichia coli* lub *Bacillus coli* (92) oraz z mikroorganizmów zwacza owcy (145).

V. Lokalizacja β -glukuronidazy w komórkach ssaków

Rozmieszczenie β -GR w komórce badano w tkankach myszy i szczura. Różne typy subkomórkowych cząstek oddzielano przez wirowanie aż do otrzymania końcowego, optycznie klarownego supernatantu. W otrzymanych frakcjach oznaczano aktywność enzymu wykonując jednocześnie obserwacje mikroskopowe. Okazało się, że w komórkach wątroby i nerek β -GR występuje głównie we frakcji mitochondriów i mikrosomów, a w niewielkich ilościach we frakcji jądrowej i rozpuszczalnej (115, 212). W komórkach śledziony i tkanki rakowej stosunkowo znaczną aktywność β -GR wykryto we frakcji rozpuszczalnej, która odpowiada pozbawionej ziarnistości cytoplazmie. Ilość enzymu w cytoplazmie może wzrastać (prawdopodobnie na skutek uwalniania się z lizosomów) podczas uszkodzenia komórki lub zaburzeń w jej funkcjach. β -GR w lizosomach wykryli De D u v e i wsp. (5, 6, 41, 42, 192) oraz S h i b k o i wsp. (193), co zostało potwierdzone przez innych autorów (67, 188). F i s h m a n i wsp. (67) znaleźli β -GR w retikulum endoplazmatycznym.

Enzym w cytoplazmatycznych ziarnistościach nie jest w pełni dostępny dla substratu i dlatego niecałkowicie aktywny. Nie można jednak wykluczyć powolnej dyfuzji substratu do wnętrza ziarnistości. Homogenizacja tkanki w środowisku wodnym na skutek zmian osmotycznych w mitochondriach i mikrosomach powoduje przejście enzymu w ponad 50% do roztworu (214), pozostały zaś w rozbitych ziarnistościach enzym staje się dostępny dla substratu i w pełni aktywny. W wodnym odpowiednio rozcieńczonym homogenacie można bezpośrednio oznaczać całkowitą aktywność enzymatyczną tkanki, przy założeniu, że nie zawiera ona endogennych inhibitorów. Homogenaty izotoniczne i hypotoniczne wykazują całkowitą aktywność β -GR po rozbiciu ziarnistości cytoplazmatycznych w sposób mechaniczny lub przez działanie niejonowymi substancjami powierzchniowo czynnymi (np. *Triton X-100*), jak również po inkubacji w buforze octanowym o *pH* 5,2. W *pH* 5,2 następuje aglutynacja nierozpuszczalnego materiału, z którego powoli uwalnia się enzym. Rozcieńczanie wodą roztworów izotonicznych prowadzi również do powolnego uwalniania się enzymu do środowiska.

VI. Zmiany aktywności β -glukuronidazy w tkankach i płynach ustrojowych ssaków i ich znaczenie w diagnostyce lekarskiej

Badania nad zmianami aktywności β -GR pod wpływem różnych czynników w stanach fizjologicznych i patologicznych przeprowadzano zarówno u zwierząt doświadczalnych, jak i u ludzi. Znamienny wzrost aktywności enzymu w nerkach i wątrobie myszy, utrzymujący się przez kilka dni, zaobserwowano po podaniu środków toksycznych, jak chloroform, cztero-

chlorek węgla lub mentol (43, 131, 195). U kota stwierdzono prawie 40-krotny wzrost aktywności enzymu w nerwie kulszowym po jego uszkodzeniu i podczas zwyrodnienia tłuszczowego (90). U myszy zmienia się aktywność β -GR wraz z wiekiem, przy czym w wątrobie u osobników młodych jest ona znacznie wyższa niż u dorosłych (104).

Wiadomo obecnie, że na aktywność β -GR *in vivo* mają znaczny wpływ hormony sterydowe (52, 66, 113, 115, 182). Aktywność tego enzymu w macicy myszy znacznie się zmniejsza po wycięciu jajników, a po podaniu estrogenów zwiększa. Wpływ hormonów sterydowych na aktywność β -GR nie ogranicza się tylko do narządów płciowych (34). Wpływ estrogenów (30, 31, 71, 102) przejawia się także w zmianach aktywności enzymu we krwi i błonie śluzowej macicy u kobiet podczas cyklu miesięcznego. W okresie pierwszych 15—20 dni aktywność wzrasta, po czym znowu obniża się (71, 72). W czasie ciąży stwierdza się znaczny wzrost poziomu enzymu we krwi obwodowej, który po porodzie wraca szybko do normy (103, 178). Podając estrogeny można utrzymać podwyższony poziom β -GR również po porodzie (73). Szczególnie duże aktywności β -GR we krwi obserwowano u kobiet w stanach przedrzucawkowych, co wykorzystuje się w diagnostyce do wczesnego rozpoznawania tego schorzenia. β -Gluconidazę zawiera również wydzielina pochwy; aktywność tego enzymu nie jest wysoka w okresie pełnej dojrzałości płciowej aż do okresu klimakterium, po którym wzrasta niekiedy trzykrotnie (72), w przeciwieństwie do tkanki macicy i pochwy, w których aktywność enzymu maleje. Wzrost ten wywołany jest prawdopodobnie brakiem estrogenów, ponieważ podawanie tych hormonów obniża aktywność enzymu (71). Charakterystyczne jest, że podawanie estrogenów nie hamuje wzrostu aktywności β -GR wywołanego zmianami nowotworowymi (102, 120, 121, 169, 217). Tkanka nowotworowa charakteryzuje się wyjątkowo wysoką aktywnością β -GR, podczas gdy aktywność innych enzymów jest na ogół obniżona. Dokładne dane dotyczące interpretacji wyników oznaczania poziomu β -GR w diagnostyce stanów nowotworowych narządów rodnych podaje Sterkowiec (202).

Wzrost aktywności β -GR obserwuje się również w płynie mózgowo-rdzeniowym w przypadku nowotworów złośliwych ośrodkowego układu nerwowego oraz w soku żołądka w przypadku raka tego narządu (202). Aktywność β -GR wzrasta również w moczu chorych na raka pęcherza (15, 17), jakkolwiek nie stwierdzano tego we wszystkich przypadkach (16, 123), prawdopodobnie na skutek tego, że w moczu występuje na ogół inhibitor enzymu (123). B o y l a n d i wsp. (15, 18) zwiększeniu aktywności β -GR w moczu przypisują znaczenie patogenetyczne w powstawaniu raka pęcherza moczowego.

Aktywność enzymu wzrasta także w płynach wysiękowych opłucnowych i brzusznych, gdzie przenikające leukocyty ulegając leukolizie zwiększają poziom enzymu (202).

Zmiany aktywności β -GR obserwuje się w różnych schorzeniach wątroby. Pineda i wsp. (177) podają, że w ostrych schorzeniach wątroby aktywność β -GR w surowicy krwi wyraźnie wzrasta i utrzymuje się dłużej na wyższym poziomie niż aktywność aminotransferaz i bilirubina. Wyniki te nie zostały w pełni potwierdzone przez innych autorów (100). Wzrost aktywności β -GR obserwuje się również w przypadku nowotworów złośliwych (222) i marskości wątroby. Pineda i wsp. (177) sugerują, że zmiany aktywności β -GR odzwierciedlają stan czynnościowy komórek wątrobowych oraz stopień ich dezorganizacji.

Maroggi i Wegmann (144) oraz Rafałowicz (181) stwierdzili wyższy poziom kwasu glukuronowego we krwi chorych na cukrzycę. Zambotti i wsp. (226) zaobserwowali wzrost aktywności β -GR w wątrobie szczurów z cukrzycą alloxanową, co Goldbarg i wsp. (81) oraz Dohrmann (50) tłumaczą adaptacyjnym zwiększeniem syntezy β -GR, wywołanym przez nagromadzenie się nieprawidłowych metabolitów ulegających sprzężaniu z kwasem glukuronowym. Możliwe więc, że wzrost ilości substratów (glukuronidów) powoduje wzrost syntezy enzymu. Według Rogali (186) wzrost aktywności β -GR w surowicy chorych na cukrzycę należy wiązać ze zwiększonym metabolizmem kwasu glukuronowego.

VII. Działanie β -glukuronidazy

1. Mechanizm działania

Preparaty enzymatyczne β -GR, otrzymywane z różnorodnego materiału biologicznego, uwalniają z różnych substratów aglikon i kwas glukuronowy w ilościach równoważnych. Punkt równowagi reakcji przesunięty jest wybitnie w stronę hydrolizy (130, 138, 147, 155, 211).

Rozszczepienie wiązania glikozydowego w β -glukuronidach na drodze hydrolizy enzymatycznej, jak i kwaśnej badano stosując wodę znakowaną ^{18}O oraz mentylo- i benzoilo- β -glukuronidy (58).

Kwas glukuronowy uwalniany po wyczerpującej hydrolizie oznaczano różnymi metodami. Miwa (164) identyfikował go jako sól potasową i cynchonidynową. Inni autorzy stosowali dokładniejszą metodę polegającą na utlenianiu do kwasu D-glukocukrowego i identyfikacji jego pochodnych (83, 124, 143, 146, 147). Do identyfikacji kwasu glukuronowego stosowano również chromatografię bibułową (130, 147, 184).

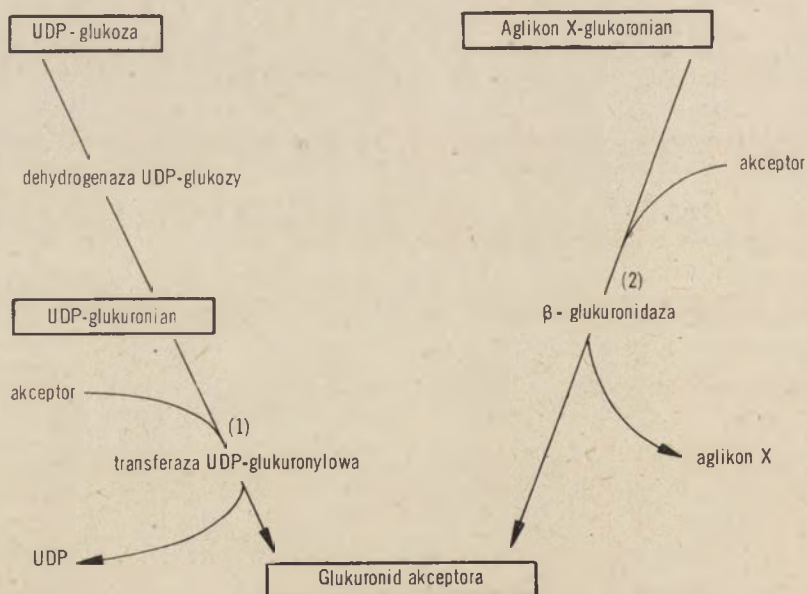
β -GR może katalizować reakcję transglikozydacji polegającą na przeniesieniu cząsteczki kwasu D-glukuronowego z β -glukuronidów na odpowiednie akceptory (52, 69). Fishmani i Green (69, 70) stwierdzili, że w pewnych warunkach β -GR przenosi resztę kwasu glukuronowego z aromatycznych i alicyklicznych β -glukuronidów na proste alifatyczne alkoholo-

le i glikole, np. glikol etylenowy i propylenowy. Reakcja ta, hamowana przez roztwory kwasu glukocukrowego (inhibitora β -GR), wymagała stężeń akceptora rzędu 2—3M (15—20% w/v glikolu) dla przeniesienia około 10% kwasu glukuronowego donora. Próby przeniesienia reszty glukuronylowej na fenole lub alicykliczne alkohole jako akceptory nie dały rezultatów. Zarówno glikol etylenowy, jak i propylenowy nie tworzą β -glukuronidów *in vivo* (79, 80).

Większą wydajność przeniesienia reszty glukuronylowej na proste alkohole przez β -GR, uzyskano w późniejszych badaniach, stosując jako donora acyloglukuronid (229), szczególnie gdy używano preparatu enzymu bakteryjnego. Jednak i w tym przypadku wymagane były wysokie stężenia akceptora.

Cohen (29) obserwował, że glikol propylenowy zwiększa hydrolizę β -glukuronidu pregnandiolu w moczu przez handlowy preparat β -GR ssaków. Sugerowano, że ma tu miejsce mechanizm przeniesienia. Wydaje się jednak, że glikol propylenowy może zachowywać się podobnie jak aceton, chloroform i inne rozpuszczalniki organiczne, które czasami aktywują enzym.

Wszystkie dotychczasowe dane na temat reakcji transglikozydacji przy udziale β -GR (schemat 1, reakcja 2) świadczą, że jej wydajność jako jednej z możliwych dróg biosyntezy jest nieporównanie niższa od tej, w której jako donor reszty glukuronylowej bierze udział kwas UDP-glukuronowy (schemat 1, reakcja 1). Stwierdzono ponadto, że 1,4-lakton kwasu glukocukrowego (VII), silny inhibitor β -GR, nie hamuje syntezy glukuronid-



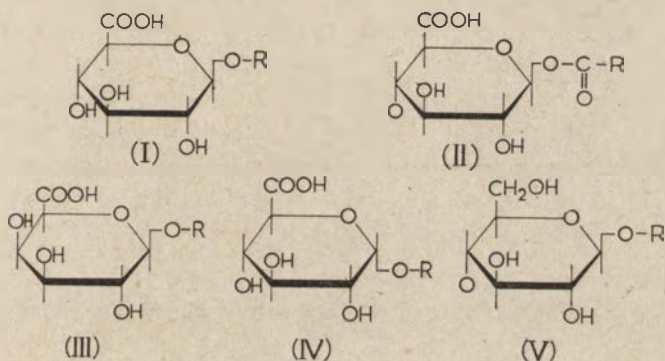
Schemat 1. Drogi syntezy glukuronidów u ssaków (52)

dów katalizowanej przez preparaty tkankowe tego enzymu w warunkach fizjologicznych (118).

Jest więc mało prawdopodobne aby β -GR mogła działać jako transferaza *in vivo*, przynajmniej w związku z syntezą β -glukuronidów najczęściej spotykanych w moczu. Synteza glukuronidów zachodzi więc prawdopodobnie wyłącznie poprzez kwas UDP-glukuronowy z udziałem odpowiedniej transferazy (glukuronylotransferaza UDP-glukuronian:akceptor nieswoisty) katalizującej reakcję przeniesienia reszty glukuronylowej z UDP-glukuronianu na odpowiedni aglikon (52, 55, 56, 57).

2. Specyficzność

β -GR hydrolizuje wszystkie naturalne, eterowo (I) lub estrowo (II) związane kwasy β -D-glukopyranozydouronowe, jak również syntetyczne kwasy β -D-galaktopyranozydouronowe (III), nie wykryte dotychczas w przyrodzie. Enzym nie działa na kwasy α -D-glukopyranozydouronowe (IV), jak również na β -D-glukopyranozydy (V).



Nie jest wyjaśnione czy enzym hydrolizuje kwasy β -D-glukofuranozydouronowe. Twierdzenie jakoby naturalny substrat β -GR, *p*-aminobenzoilo- β -glukuronid, miał strukturę furanozową (167), obalili Kato i wsp. (107, 108). β -Glikozydy glukofuranozourono-6,3-laktonu (VI) nie są atakowane przez enzym, a otwarcie pierścienia laktonowego w tego typu związkach prowadzi do ich rozkładu. Wprawdzie syntetyczny kwas 2-naftylo- β -D-glukofuranozydouronowy może być substratem dla β -GR (109, 110), lecz ma on niższe powinowactwo do enzymu od odpowiadającego mu kwasu glukopyranozydouronowego.

Badania nad hamowaniem β -GR przez aldonolaktony, odpowiadające pod względem konfiguracji substratom, dostarczyły wielu cennych spostrzeżeń dotyczących specyficzności enzymu (38). β -GR jest hamowana nie tylko przez 1,4-lakton kwasu glukocukrowego (VII), lecz również przez gotowane roztwory kwasu galaktocukrowego (IX), zawierające niezidentyfikowane jego laktony. Jest to zrozumiałe w świetle tego, że enzym hy-

drolizuje także β -galakturonidy. Oba inhibitory mogą hamować reakcję z obydwojoma typami substratów, co wskazuje na identyczność aktywności β -glukuronidazowej i β -galakturonidazowej enzymu. Preparaty β -GR z gruczołu napletkowego samicy szczura i z *Patella vulgata* mają obie aktywności bardzo wysokie i stabilne przy identycznych wartościach pH (140, 157). Oczyszczanie zwiększa aktywność β -galakturonidazową: stosunek aktywności β -glukuronidazowej do aktywności β -galakturonidazowej enzymu z gruczołu napletkowego w pH 4,5 wynosi 3,1 po częściowym oczyszczeniu, a 1,4 po całkowitym oczyszczeniu enzymu.

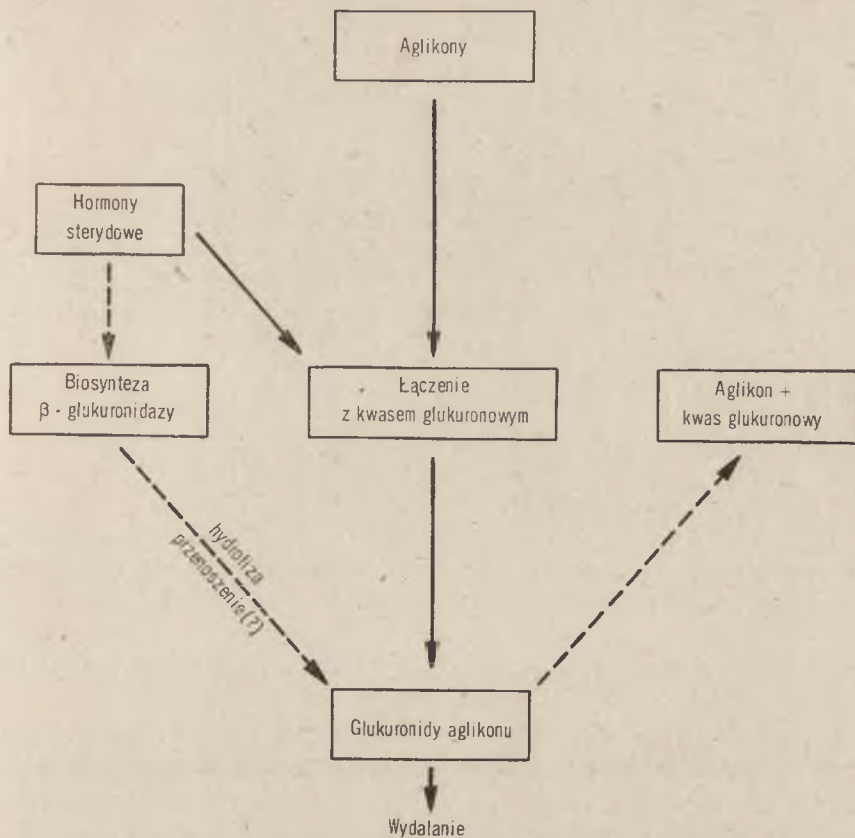
Mimo tej dwojakiej aktywności enzymu nazwanie go β -glukuronidazą jest właściwe, ponieważ jedynie β -glukuronidy znane są jako naturalnie występujące substraty tego enzymu.

W przeciwieństwie do preparatów enzymatycznych z tkanek ssaków, preparaty z małży *Patella vulgata* hydrolizują syntetyczne α -glukuronidy i α -galakturonidy (157). W odróżnieniu od β -GR enzymy katalizujące te reakcje są stabilne w innych pH i temperaturze oraz nie są hamowane przez 1,4-lakton kwasu glukocukrowego i lakton kwasu galaktocukrowego. Ekstrakty ze ślimaków nie wykazują aktywności α -glukuronidazy (209). Śladową aktywność α -glukuronidazy wykryto również w populacji mikroorganizmów z płynu żwacza owcy, w pewnych grzybach żyjących w symbiozie z korzeniami drzew oraz w zawartości jelita grubego szczura. Handlowy preparat pektynazy z grzybów, enzymu katalizującego hydrolityczny rozkład substancji pektynowych (kwasy wielogalakturnonowe) do kwasu galakturonowego i dwugalakturnonowego (176) wykazuje również niewielką aktywność α -glukuronidazy.

3. Udział β -glukuronidazy w metabolizmie hormonów płciowych

Hormony płciowe, które łączą się z kwasem glukuronowym dając glukuronidy, mają wpływ na aktywność β -GR (52, 66, 127, 182). Podawane w dawkach nawet nie przekraczających zakresu fizjologicznego, powodują znamienny wzrost aktywności β -GR w surowicy krwi i w różnych narządach. Pod wpływem żeńskich hormonów płciowych zwiększa się aktywność β -GR w wątrobie, śledzionie, macicy i surowicy krwi (52), podczas gdy testosteron powoduje szczególnie wzrost β -GR w nerce. Powyższe dane oraz zmiany aktywności β -GR po wycięciu jajników, w czasie cyklu miesięcznego, klimakterium i ciąży mogą świadczyć o tym, że enzym ten posiada specjalną funkcję w metabolizmie hormonów płciowych.

Według D o h r m a n n a (52) w organizmie zwiększeniu ilości glukuronidów może zapobiegać wzmożenie (pod wpływem hormonów płciowych) biosyntezy β -GR (schemat 2). Proces ten może stanowić mechanizm kontrolny regulujący stężenie hormonów i leków w różnych tkankach. Według D o h r m a n n a (52) oznaczanie aktywności β -GR może być przydatne „do określenia puli hormonów sterydowych w organizmie”.



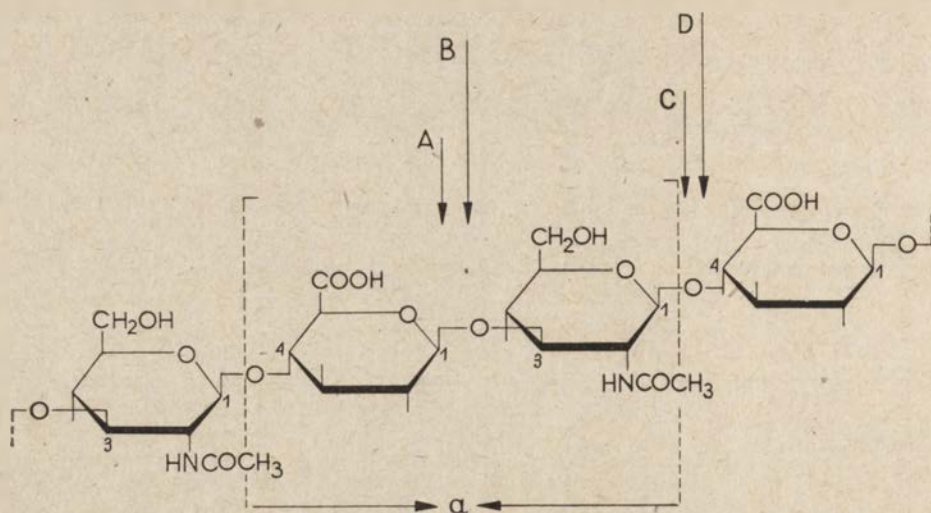
Schemat 2. Udział β -glukuronidazy w metabolizmie kwasu glukuronowego (52)

4. Udział β -glukuronidazy w katabolizmie mukopolisacharydów

Fizjologiczną rolę β -GR w katabolizmie mukopolisacharydów (35, 213, 230) określają prace Karla Meyera i wsp. (89, 141, 142, 161, 220) nad strukturą kwasu hialuronowego i chondroityny oraz ich rozkładem przez niektóre enzymy ssaków.

Przyjmuje się (96, 220), że kwas hialuronowy występujący u ssaków w tkankach pochodzenia mezodermalnego zbudowany jest z ułożonych na przemian reszt kwasu glukuronowego i N-acetylo-D-glukozyaminy, połączonych wiązaniami 1,3 i 1,4- β -glikozydowymi (schemat 3). Jest on liniowym polimerem, w którym podstawową powtarzającą się jednostką jest dwucukrowiec: kwas hialobiuronowy (206). Dwucukrowcowe jednostki połączone są wiązaniem β -1,4 (142).

Siarczany chondroityny A i C o podobnym typie cząsteczki jak kwas hialuronowy zawierają reszty kwasu D-glukuronowego i N-acetylo-D-galaktozoaminy. Siarczan chondroityny B zbudowany jest z reszt kwasu



Schemat 3. Budowa kwasu hialuronowego (a — jednostka dwucukrowcowa) oraz miejsce działania: A — β -glukuronidazy, B — hialuronidazy pijawki, C — β -N-acetyloglukozoaminidazy, D — hialuronidazy z jader

L-iduronowego i N-acetylo-D-galaktozoaminy na przemian połączonych wiązaniami typu β -.

Ani kwas hialuronowy, ani siarczan chondroityny nie są atakowane przez β -GR. Enzym ten przy współdziałaniu β -N-acetyloglukozoaminidazy rozkłada dopiero oligosacharydy powstające w wyniku częściowej depolimeryzacji kwasu hialuronowego i chondroityny przez hialuronidazę. Surowe preparaty hialuronidazy z jader zawierają zarówno β -GR, jak i β -N-acetyloglukozoaminidazę (162). Jądrowa hialuronidaza rozkłada kwas hialuronowy hydrolizując wiązania glikozydowe, łączące grupy redukujące N-acetyloglukozoaminy, i uwalnia oligosacharydy o różnej długości łańcucha. Na te związki działają od nieredukującego końca cząsteczki na przemian najpierw β -GR a potem β -N-acetyloglukozoaminidaza (142, 219). Kwas hialobiuronowy powstający podczas enzymatycznego rozkładu kwasu hialuronowego przez jądrową hialuronidazę (uważany za β -glukuronid N-acetyloglukozoaminy), jest odporny na działanie β -GR i dlatego może występować w moczu.

Incubowane w podobnych warunkach siarczany oligosacharydów, powstające z siarczanów chondroityny A i C, dają jako jedyny zidentyfikowany produkt, kwas glukuronowy. Siarczan chondroityny B nie jest hydrolizowany przez hialuronidazę z jader, a pochodne oligosacharydy nie są atakowane przez β -GR.

Oligosacharydy, powstające z kwasu hialuronowego pod działaniem hialuronidazy z pijawki, są atakowane najpierw przez β -N-acetyloglukozoaminidazę, a następnie przez β -GR, a zatem w kolejności odwrotnej (141) niż oligosacharydy powstające pod wpływem hialuronidazy z jader. Hia-

luronidaza z pijawki różni się od hialuronidazy z jąder nie tylko miejscem działania na łańcuch kwasu hialuronowego, lecz również tym, że nie działa na siarczany chondroityny A i C (230).

VIII. Własności β -glukuronidazy

β -GR należy do globulin. Jej ciężar cząsteczkowy wynosi ponad 200 000 (tablica 1), a punkt izoelektryczny znajduje się w pH 5—6 (65, 198). Energia aktywacji w reakcji hydrolizy β -glukuronidu fenolftaleiny przez β -GR wynosi 14 600 kal/mol (65, 187).

Tablica 1.

Ciężar cząsteczkowy β -glukuronidazy z różnych źródeł

Źródło enzymu	Ciężar cząsteczkowy	Literatura
Mózg królika	266 000	(101)
Serce wołu	287 000—292 000	(187)
Wątroba wołu	280 000	(179)
Nerka szczura	210 000	(183)
Wątroba człowieka	218 000	(166)

1. Zależność aktywności i stabilności β -glukuronidazy od pH

Preparaty β -GR ssaków w buforze octanowym lub cytrynianowym w warunkach zbliżonych do wysycenia enzymu substratem wykazują optymalne działanie przy różnych wartościach pH (tablica 2) w zależności od tego z jakiego materiału biologicznego otrzymywano enzym. Wartość optymalnego pH zależy również od stopnia oczyszczenia enzymu oraz warunków oznaczania (138). Reszta cukrowa w substracie (β -glukuronid lub β -galakturonid), ma znaczny wpływ na optymalne pH działania enzymu, natomiast charakter aglikonu wywiera niewielki wpływ, ponieważ tylko w bardzo małym stopniu wpływa na jonizację β -glukuronidu (185). Preparaty otrzymane z tkanek zwierząt nienależących do ssaków wykazują optymalne działanie przy pH poniżej 6 niezależnie od charakteru aglikonu (138), a preparaty bakteryjne w pobliżu obojętnego pH (tablica 2).

Mills i wsp. (163, 198) stwierdzili, że β -GR ze śledziony i wątroby wołu działa optymalnie w coraz bardziej alkalicznym pH w miarę zwiększania stężenia substratu (z 0,25 do 4,0 mM β -glukuronidu fenolftaleiny), podobnie jak enzym z mięczaków. Dla wyjaśnienia tych wyników Cox (40) sugeruje, że tylko niezjonizowany substrat może być atakowany przez enzym.

Kwas ftalowy i niektóre inne kwasy aromatyczne w stosunkowo wysokim stężeniu (około 10mM) powodują przesunięcie optymalnego pH dla

Tablica 2.

Wartości optymalnego pH działania β -glukuronidazy z różnego materiału biologicznego

Źródło enzymu	Substrat	Optymalne pH	Literatura
Mocz człowieka	A	4,5 lub 5,0	19
Wątroba myszy ^{a)}	A	4,5 i 5,2	112, 194
Gruczoł napletkowy szczura	A	4,5 i 5,0—5,2	59, 140
Gruczoł napletkowy szczura	B	4,5	140
Gruczoł napletkowy szczura	C	3,9	140
Mięsień sercowy wołu	A	5,2	187
<i>Xenopus laevis</i> (zarodek)	D	4,5	13
<i>Helix pomatia</i> (przewód pokarmowy)	A	4,4—1,8	98
<i>Patella vulgata</i> (worek trzewiowy)	A	3,8	130
<i>Cellana tramoserica</i> (worek trzewiowy)	A	4,2—4,4	40
<i>Scutellaria baicalensis</i> (korzeń)	A	3,8—4,6	126
<i>Escherichia coli</i>	A	6,2	21, 197
<i>Streptococci</i>	A	5,5—7,0	95
Mikroorganizmy ze żwacza owcy	A	6,5—6,6	145

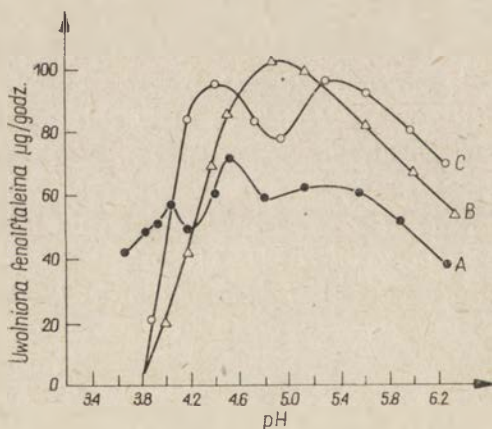
a) Preparat enzymatyczny nieoczyszczony

Substraty: A — β -glukuronid fenolfталeiny

B — fenylo- β -glukuronid

C — fenylo- β -galakturonid

D — glukuronid 8-hydroksychinolinny

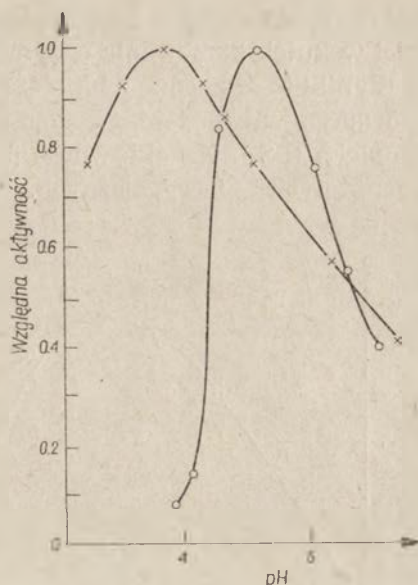


Rys. 1. Wpływ DNA i buforu ftalanowego na zależność aktywności oczyszczonej β -glukuronidazy z wątroby wołu od pH

A — kontrola w 0,1M buforze octanowym,
B — 0,1M bufor octanowy plus 0,06% DNA,
C — 0,1M bufor ftalanowy (198)

β -GR ssaków (198) w kierunku wyższych wartości (rysunek 1); kwas ftalowy (130) wykazuje taki sam wpływ na enzym z *Patella vulgata* (rysunek 2).

Optymalne pH działania β -GR zależy od rodzaju i stężenia buforu. Wyczerpujące zestawienie optymalnych wartości pH dla β -GR z różnych źródeł można znaleźć w przeglądowym artykule Levvy i Marsha (138), a świeższe dane o hydrolizie β -glukuronidów sterydów podają W a -



Rys. 2. Hydroliza 1,25 mM β -glukuronidu fenoltaleiny przez β -glukuronidazę z *Patella vulgata* przy różnych wartościach pH w: (x) — 0,05 M buforze octanowym i (o) — 0,25 M buforze fталanowym

Optymalną aktywność w każdym buforze przyjęto za 1,0 (130)

kabayashi i Fishman (211) oraz Kushinsky i Otternass (117).

Preparaty β -GR ssaków są stabilne w zakresie pH od 5,0 do 8,0, preparaty z mięczaków mają nieznacznie szerszy zakres stabilności (47, 130), a preparaty enzymatyczne z flory bakteryjnej zwłaszcza są stabilne tylko w optymalnym pH (106).

2. Izoenzymy

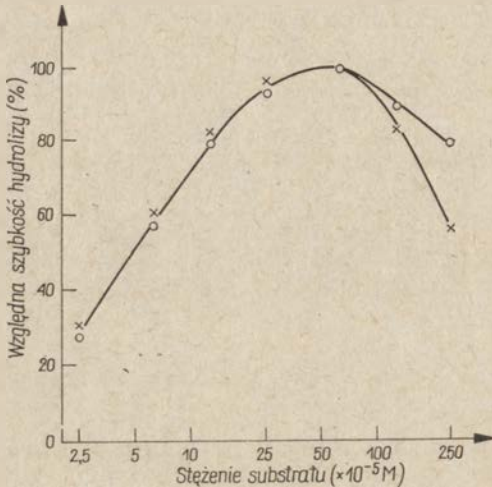
W 1953 roku Mills i wsp. (163) otrzymali trzy różne frakcje β -GR z wątroby i śledziony wołu o optymalnym pH działania: 3,4, 4,5 i 5,2. Na podstawie danych o wpływie różnych inhibitorów i różnych stężeń substratu na szybkość hydrolizy enzymatycznej oraz wartości energii aktywacji przypuszczali oni, że białka tych trzech frakcji mogą być niezależnymi enzymami. Za pomocą chromatografii na DEAE-celulozie (165, 190) rozdzielono β -GR z wątroby szczura na frakcje, odpowiadające enzymowi zlokalizowanemu w mitochondriach, mikrosomach i frakcji rozpuszczalnej (190). Yamamura i wsp. (228), uzyskali trzy izoenzymy β -GR z wątroby szczura przez rozdział na kolumnie z DEAE-celulozy, natomiast przez elektroforezę na bloku skrobiowym uzyskali rozdział β -GR z wątroby człowieka, szczura i myszy na 2—4 izoenzymy.

IX. Substancje wpływające na aktywność β -glukuronidazy

Aktywność β -GR w znacznym stopniu zależy od stężenia substratu (rysunek 3). Oczyszczony preparat β -GR z gruczołu napletkowego samicy szczura wykazuje największą aktywność przy stężeniu 0,63mM β -gluku-

ronidu fenolfaleiny, a przy wyższych stężeniach następuje spadek aktywności wskutek hamowania enzymu przez nadmiar substratu (140).

Wyniki te są zgodne z hipotezą, według której enzym łączy się z niejonizowanym substratem, tworząc zarówno aktywny (ES) jak i nieaktywny kompleks (ES₂). Na aktywność β-GR ma wpływ bardzo wiele związków organicznych i nieorganicznych.



Rys. 3. Wpływ stężenia substratu na szybkość hydrolizy β-glukuronidu fenolfaleiny przy pH 4,5 w 0,05 M buforze octanowym, przez oczyszczoną β-glukuronidazę z gruczołu napletkowego szczura
(o) — w obecności 0,01% albuminy, (x) — bez albuminy (140)

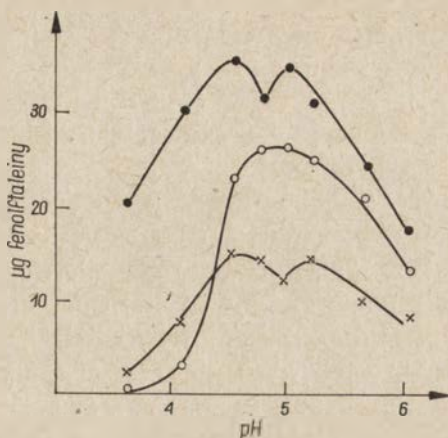
1. Wpływ niektórych związków organicznych na aktywność enzymu

Wiele związków, zarówno o wysokim jak i niskim ciężarze cząsteczkowym, aktywuje, hamuje lub inaktywuje β-GR, przy czym niektóre z nich (np. kwas ftalowy) powodują również zmiany w przebiegu krzywej zależności aktywności od pH (163, 215).

W niskich stężeniach β-GR ssaków jest aktywowana lub stabilizowana przez cały szereg związków o wysokim ciężarze cząsteczkowym, jak albumina, DNA, chitozan i niektóre dwuaminy oraz przez zinaktywowany działaniem temperatury enzym (8, 198). Prawdopodobnie substancje te chronią enzym przed jonami metali ciężkich oraz przed powierzchniową denaturacją. Niektóre preparaty β-GR są aktywowane już w stanie nieoczyszczonym, inne dopiero po oczyszczeniu (9, 11). Omawiane zjawisko przebiega różnie dla różnych aktywatorów (rysunek 4).

Albumina nie zmienia wartości pH optymalnych dla działania enzymu, a wpływ jej jest taki sam, czy substratem jest β-glukuronid czy też β-galakturonid. DNA nie tylko mniej skutecznie ochrania enzym, ale podobnie jak kwas ftalowy, zmienia optymalne pH działania enzymu na bardziej alkaliczne. Jak już wspomniano, DNA hamuje ponadto β-galakturonidazową aktywność β-GR przy wszystkich wartościach pH. W związku z tym albumina lepiej nadaje się do stabilizowania enzymu niż DNA.

Rys. 4. Hydroliza 0,63 mM β -glukuronidu fenoltaleiny przy różnych wartościach pH w 0,05 M buforze octanowym przez oczyszczony preparat β -glukuronidazy z gruczołu napełkowego szczura (x) — kontrola, (o) — w obecności 0,03% DNA, (●) — w obecności 0,01% albuminy (140)



Romeo i De Bernard (187) podają, że 0,1M bufor cytrynianowy wyraźnie hamuje aktywność β -GR, zwłaszcza przy niskich wartościach pH. Podobne doniesienia o słabym działaniu hamującym kwasu cytrynowego i niektórych kwasów organicznych ukazały się już wcześniej (163, 183, 187, 225). Prawdopodobnie hamowanie to polega na konkurencji między grupami karboksylowymi tych kwasów i substratu (59, 187). Enzym z *Patella vulgata* (mięczak) nie jest hamowany przez nadmiar substratu i nie jest aktywowany przez kwas ftalowy (rysunek 2).

Kwaśne mukopolisacharydy jak heparyna, siarczan chondroityny (215) i kwas hialuronowy (7) hamują niespecyficznie β -GR (45), prawie w 100%, ich działanie nie daje się odwrócić *Tritonem X-100*.

Do niespecyficznych inhibitorów β -GR należą również kwaśne żywice jonowymiennie (10) oraz anionowe detergenty (np. *Teepol XL*), które powodują szybko nieodwracalną inaktywację (214).

Cholesterol, β -karoten i retinol już w bardzo niskich stężeniach hamują aktywność oczyszczonych preparatów β -GR. Cholesterol w stężeniu 0,2mM hamuje enzym w 86%, a 0,1mM β -karoten (w 5% etanolu) — w 53%. Inhibicję tę zmniejsza o 10—20% albumina w stężeniu 0,05% (187). Tappel i Dillard (207) przypuszczają, że wpływ cholesterolu i retinolu na β -GR polega na rozbijaniu cząsteczki enzymu na nieaktywne jednostki.

Kushinsky i wsp. (116) badając aktywność β -GR w roztworach NaCl lub buforze o różnych stężeniach stwierdzili, że siła jonowa mieszaniny reakcyjnej ma znaczny wpływ na aktywność enzymu, zależny od pochodzenia β -GR. Na przykład aktywność β -GR z *Patella vulgata* i *Escherichia coli* maleje wraz ze wzrostem siły jonowej. Autorzy sugerują, że rozbieżność danych o aktywności niektórych preparatów β -GR i działaniu niektórych substancji jako aktywatorów i niespecyficznych inhibitorów enzymu może wynikać z różnic w sile jonowej stosowanych mieszanin reakcyjnych.

2. Wpływ jonów metali ciężkich na aktywność β -glukuronidazy

Aktywność β -GR ssaków *in vitro* nie zmienia się pod wpływem wielu pospolitych inhibitorów jak: fluorki, cyjanki, azydki, jodoctan i dwunitrofenol (138, 191, 223).

Wpływ jonów Ag^+ , Hg^{2+} i Cu^{2+} na aktywność β -GR badano na oczyszczonych preparatach enzymatycznych z wątroby wołu (191), myszy i szczura (134, 135), z gruczołu napletkowego szczura (59), z *Patella vulgata* (130), *Helix pomatia* (98) i *Escherichia coli* (54). Oczyszczony enzym jest hamowany silniej przez jony Ag^+ i Hg^{2+} niż przez jony Cu^{2+} , przy czym jednocześnie obserwuje się zmianę optymalnego pH działania w kierunku niższych wartości (59). Hamujące działanie Cu^{2+} potęgują związki o własnościach redukujących (59). Na preparatach β -GR wykazano (59, 135), że działanie jonów Cu^{2+} zależy od ich redukcji do Cu^+ . Wydaje się, że zmienność wyników doświadczeń nad hamowaniem β -GR przez kwas askorbinowy można wyjaśnić obecnością śladów Cu^{2+} (59, 138).

Działanie jonów metali jest procesem złożonym. Fernley (59) w doświadczeniach nad wpływem Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , *p*-chlorortęciobenzoesanu i wodorotlenku fenylortęciowego na aktywność β -GR obserwował trzy zjawiska: 1) współzawodnictwo o enzym między substratem i inhibitorem w przypadku *p*-chlorortęciobenzoesanu i jonów Ag^+ , Hg^{2+} i Cu^{2+} , co sugeruje obecność grup $-\text{SH}$ w centrum aktywnym enzymu; 2) tworzenie kompleksu ES_2 w przypadku wodorotlenku fenylortęciowego i jonów Hg^{2+} , Ag^+ i Cu^{2+} ; 3) wiązanie się z kompleksem ES jonów Hg^{2+} i Ag^+ , które nie wiążą się z samym enzymem czy substratem. Jony Hg^{2+} i Ag^+ jakościowo w podobny sposób hamują aktywność β -GR.

Ciekawym zagadnieniem jest kinetyka inhibicji β -GR przez jony metali ciężkich (59). Przy niskich stężeniach substratu procent hamowania przez jony Hg^{2+} maleje wraz ze wzrostem stężenia substratu. Przy wyższych stężeniach substratu stopień inhibicji wzrasta wraz ze wzrostem stężenia substratu, przy czym w obecności jonów rtęci hamowanie przez nadmiar substratu zaznacza się wyraźniej. Jony rtęci zwiększają stałą K_m dla aktywnego kompleksu ES oraz obniżają wartość stałej K_2 (stała dysocjacji nieaktywnego kompleksu enzym-substrat ES_2 w przypadku inhibicji spowodowanej nadmiarem substratu).

Wodorotlenek fenylortęciowy ($\text{C}_6\text{H}_5\text{HgOH}$) przy niskich stężeniach substratu nie ma wpływu na aktywność enzymu. Związek ten w wysokim stężeniu zwiększa hamowanie β -GR przez nadmiar substratu (K_2 zmniejsza się). Związek ten działa inaczej niż *p*-chlorortęciobenzoesan, który hamuje β -GR kompetycyjnie, a jego działanie łatwo ulega odwróceniu przez cysteinę, natomiast cystyna i kwas etylenodwuaminoczeroctowy nie znoszą inhibicji (59). Przyjmuje się, że działanie *p*-chlorortęciobenzoesanu ogranicza się do ugrupowania $-\text{SH}$ w centrum aktywnym enzymu (59), nato-

miast wodorotlenek fenylortęciowy, znany również jako czynnik blokujący grupy -SH (27), reaguje tylko z grupą karboksylową substratu.

Levvy i Conchie (128) uważają, że przy niskich stężeniach substratu Hg^{2+} i organiczne związki rtęci reagują z enzymem powodując jego inhibicję. Substrat w wyższych stężeniach wypiera Hg^{2+} dając aktywny kompleks ES. Dalszy wzrost stężenia substratu prowadzi do wiązania metalu przez substrat, prawdopodobnie przez wolną grupę karboksylową w reszcie kwasu glukuronowego. Powstający glukuronian rtęci reagując z enzymem daje nieaktywny kompleks $ES_2Me(Me-metal)$.

Bardzo możliwe, że inhibicja β -GR przez nadmiar substratu jest uzależniona od obecności śladów metali ciężkich. Wzrastające stężenie substratu ułatwia tworzenie kompleksu metal-enzym-substrat, o czym świadczą krzywe szybkości hydrolizy przez oczyszczoną β -GR w obecności jonów Hg^{2+} (59). Hamowanie przez jony Hg^{2+} wzrasta stopniowo z upływem czasu, przy czym jest ono wyraźniejsze dla wyższych stężeń substratu. Preinkubacja samego enzymu lub substratu z jonami Hg^{2+} nie daje takich wyników. Inhibicję przez jony Hg^{2+} odwraca EDTA (59).

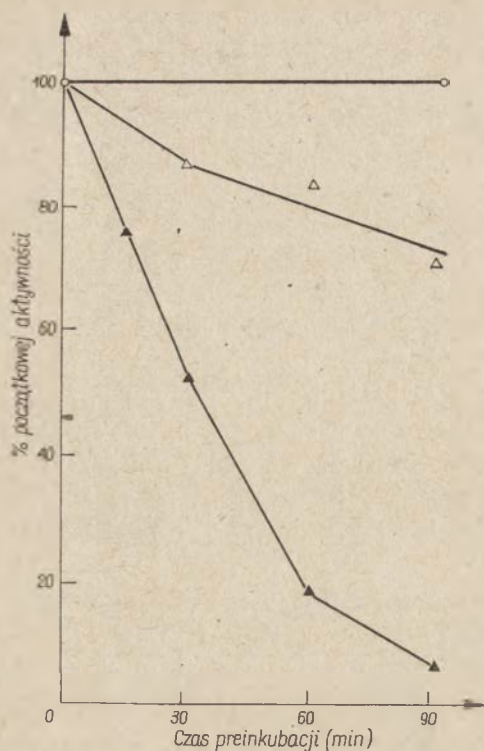
Oprócz doświadczeń z *p*-chlorortęciobenzoesanem informacji o strukturze enzymu dostarczają doświadczenia (59) z siarczynami i kwaśnymi siarczynami, które rozszczepiają wiązania dwusiarczkowe według reakcji (26, 27):



Kwaśny siarczyn hamuje aktywność β -GR (rysunek 5), a efekt ten potęgują jony Cu^{2+} (10 μ M). Wprawdzie same jony Cu^{2+} hamują aktywność enzymu, lecz wpływ ten można pominąć, ponieważ przy *pH* 5,2 (warunki doświadczenia) powodują one około 10% inhibicji przy stężeniu 1mM. Ponieważ EDTA przeciwdziała inaktywacji enzymu przez kwaśny siarczyn niezależnie od tego czy do środowiska reakcyjnego wprowadzono jony Cu^{2+} można przypuszczać, że nawet śladowe ilości miedzi w wodzie destylowanej lub odczynnikach mogą katalizować reakcję z kwaśnym siarczynem. Hamowanie enzymu przez kwaśny siarczyn katalizują również jony Hg^{2+} i Ag^+ . Hamujące działanie kwaśnego siarczynu na β -GR w znacznym stopniu ograniczane jest przez substrat (59). Na podstawie tych danych Ferney (59) wysuwa przypuszczenie, że w centrum aktywnym enzymu obok grup -SH mogą występować grupy dwusiarczkowe.

3. Endogenne tkankowe inhibitory β -glukuronidazy o nieokreślonej strukturze

Stwierdzono, że wodne homogenaty tkanek szczura wykazują małą całkowitą aktywność β -GR przy wysokich stężeniach tkanki (215). Aktywność ta wzrasta w miarę rozcieńczenia homogenatu, nie osiągając jednak wartości granicznej. Zjawisko to tłumaczy się obecnością w tkankach szczura niezidentyfikowanego, termostabilnego i nie dającego się oddializować



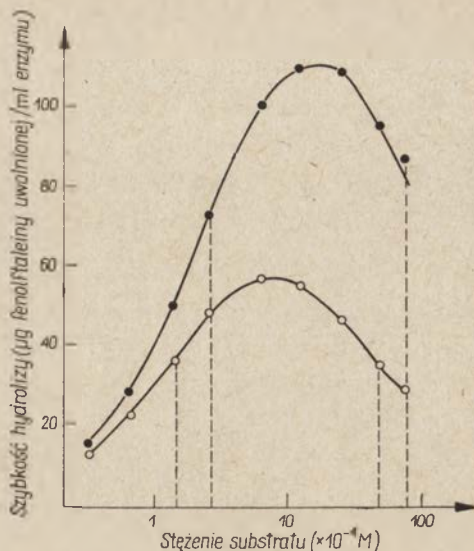
Rys. 5. Wpływ kwaśnego siarczanu sodu, dodawanego podczas preinkubacji, na aktywność β -glukuronidazy z gruczolu napletkowego szczura w obecności 0,01% albuminy i jonów Cu^{2+} (O) — enzym i albumina, (Δ) — enzym, albumina i 1mM kwaśny siarczyn, (\blacktriangle) — enzym, albumina, kwaśny siarczyn i $10\mu\text{M}$ CuSO_4 (59)

inhibitora, który można usunąć z homogenatu przez wirowanie po uprzednim zbuforowaniu do pH 5,2. Dlatego też preparaty, które przeszły przez pierwszy zwykły etap oczyszczania, wolne są od tego inhibitora. Właściwości omawianego czynnika bada się w zagotowanych homogenatach tkanek, w których działaniem wysokiej temperatury zniszczono aktywność β -GR.

Tkanki myszy wykazują dużo niższą aktywność β -GR niż tkanki szczura, a całkowita aktywność homogenatu z tkanek myszy nie zależy od rozcieńczenia. Po termicznej inaktywacji β -GR homogenaty z tkanek myszy hamują enzym szczura (215). Warto podkreślić, że endogenny inhibitor w bardzo nieznacznym stopniu wpływa na aktywność enzymu z tkanek myszy.

Obecność endogennych inhibitorów β -GR stwierdzono również w osoczu krwi (63) i tkankach psa (61) oraz w preparatach z *Helix pomatia* (98) i surowicy człowieka (53).

Wpływ inhibitora nie zależy od pH , a *Triton X-100* znosi jego działanie. Przypuszcza się (215), że inhibitor łączy się z kompleksem enzym-substrat. Wskazuje na to wzrost inhibicji wraz ze wzrostem stężenia substratu (rysunek 6), oraz wzrost powinowactwa substratu do enzymu przy tworzeniu się zarówno aktywnego kompleksu ES jak i nieaktywnego kompleksu ES_2 (inhibicja spowodowana nadmiarem substratu). Fizjologiczna rola endogennego inhibitora nie jest jeszcze wyjaśniona.



Rys. 6. Wpływ stężenia substratu na szybkość hydrolizy β -glukuronidu fenolfaleiny przez wolną od inhibitora β -glukuronidazę szczura

(○) — w obecności 0,125% gotowanego homogenatu wątroby szczura, (●) — kontrola (215)

X. Specyficzne inhibitory

1. Budowa strukturalna inhibitora a jego wpływ na aktywność β -glukuronidazy

Zgodnie z ogólnie przyjętą zasadą, podaną przez Horikoshi (91), laktony wywodzące się z części cukrowej danego glikozydu wykazują hamujący wpływ na β -glikozydazę, która hydrolizuje ten glikozyd. Aldonolaktony, które są silnymi inhibitorami kompetycyjnymi β -glikozydaz (38), muszą być identyczne pod względem długości łańcucha, podstawników i konfiguracji z resztą cukrową substratu. W niektórych przypadkach hamują one także odpowiednie α -glikozydazy.

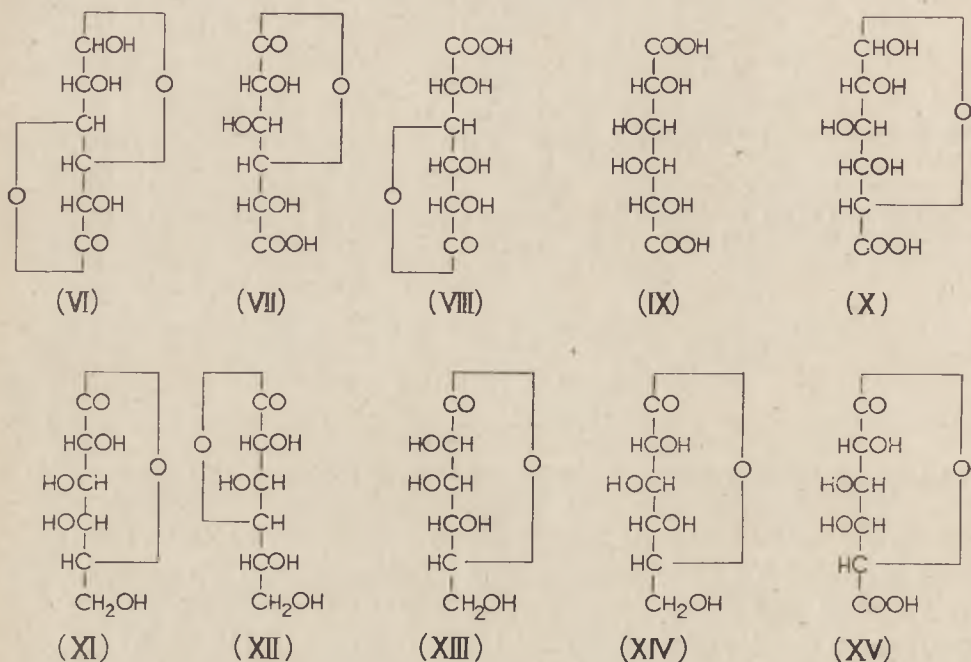
Badając wpływ kwasu cukrowego i jego pochodnych na aktywność β -GR, Levy i wsp. (125, 132) wykryli pierwszy inhibitor tego enzymu — 1,4-lakton kwasu glukocukrowego (VII). Spośród dotychczas poznanych jest on jednym z najsilniejszych inhibitorów β -GR.

1,4-Lakton kwasu glukocukrowego nie działa na inne glikozydazy (także na α -glukuronidazę), a β -GR nie jest hamowana przez laktony innych kwasów cukrowych z wyjątkiem laktonu kwasu D-galaktocukrowego (IX).

Początkowo sądzono (105), że kwas glukocukrowy hamuje enzym. Obecnie wiadomo, że inhibicję powodują śladowe ilości 1,4-laktonu (125) powstające w roztworach kwasu glukocukrowego w zwykle stosowanych do oznaczania enzymu warunkach (nieznacznie kwaśne pH). Tworzenie się 1,4-laktonu osiąga stan równowagi po 30 minutowym gotowaniu roztworu kwasu glukocukrowego w kwaśnym pH. Lakton ten w stężeniu $2,5 \times 10^{-6}$ M hamuje aktywność β -glukuronidaz z różnych źródeł w około

50%. Aktywności β -GR nie hamuje 6,3-lakton kwasu glukocukrowego (1,4-lakton kwasu L-gulocukrowego, VIII), który powstaje obok 1,4-laktonu w roztworach kwasu glukocukrowego.

β -GR hamowana jest kompetycyjnie przez kwas glukuronowy (X) oraz w mniejszym stopniu przez kwas galakturonowy. Nie wydaje się jednak aby reakcja ta była prostym odwróceniem hydrolizy, ponieważ typowe aglikony nie są inhibitorami. Glukuronolakton (6,3-lakton kwasu D-glu-



kofuranozouronowego, VI) nie hamuje β -GR (201). Interesujący jest fakt, że enzym otrzymany z mikroorganizmów żyjących w zważu owiec nie jest hamowany przez kwas galakturonowy ani jego lakton (155).

Niedawno stwierdzono, że 1,5-laktony odpowiednich cukrów (np. w przypadku α - i β -mannozydazy — manno-1,5-lakton, XIII, a α - i β -glukozydazy — glukono-1,5-lakton, XIV) są silniejszymi inhibitorami glikozydaz niż 1,4-laktony (33, 38, 129, 138, 139). Obecnie niektóre nietrwałe aldono-1,5-laktony otrzymuje się przez utlenianie cukrów pyranozowych gazowym tlenem w słabo kwaśnym pH , w obecności platyny jako katalizatora (37). Otrzymany w ten sposób 1,5-lakton kwasu glukocukrowego, 2—3 razy silniej hamuje β -GR niż krystaliczny 1,4-lakton. Możliwe, że gotowany roztwór glukocukrzanu zawiera obok 1,4-laktonu pewne ilości 1,5-laktonu. Otrzymany przez utlenianie kwasu galakturonowego w obecności platyny 1,5-lakton kwasu D-galaktocukrowego (XV) dwukrotnie silniej hamował aktywność β -GR niż 1,4-lakton kwasu glukocukrowego. Ponieważ kwas galaktocukrowy jest mezo-związkiem, jego roztwór może

zawierać mieszaninę laktonów i być może tylko D-1,5-lakton jest inhibitorem. Jak wiadomo gotowane roztwory galaktocukrzanu są stosunkowo słabymi inhibitorami w porównaniu z analogicznymi roztworami glukocukrzanu.

Badano farmakologiczne własności 1,4-laktonu kwasu glukocukrowego jako czynnika hamującego aktywność β -GR *in vivo* (114). Stwierdzono, że hamuje on wzrost guzów nowotworowych u myszy, przy czym jednocześnie obserwowano zmniejszenie śmiertelności zwierząt (25). Związek ten podawano doustnie pacjentom z objawami nowotworu pęcherza moczowego (18). Proponowano także stosowanie 1,4-laktonu w żółtaczce noworodków (3, 20). Jako alternatywne metody hamowania aktywności β -GR *in vivo* proponowano (84, 85) podawanie 1,4-6,3-dwulaktonu kwasu glukocukrowego (XVI) oraz jego dwu-O-acetylo pochodnej (93), których działanie jako inhibitorów enzymu zależy oczywiście od przemiany w 1,4-lakton kwasu glukocukrowego w organizmie.

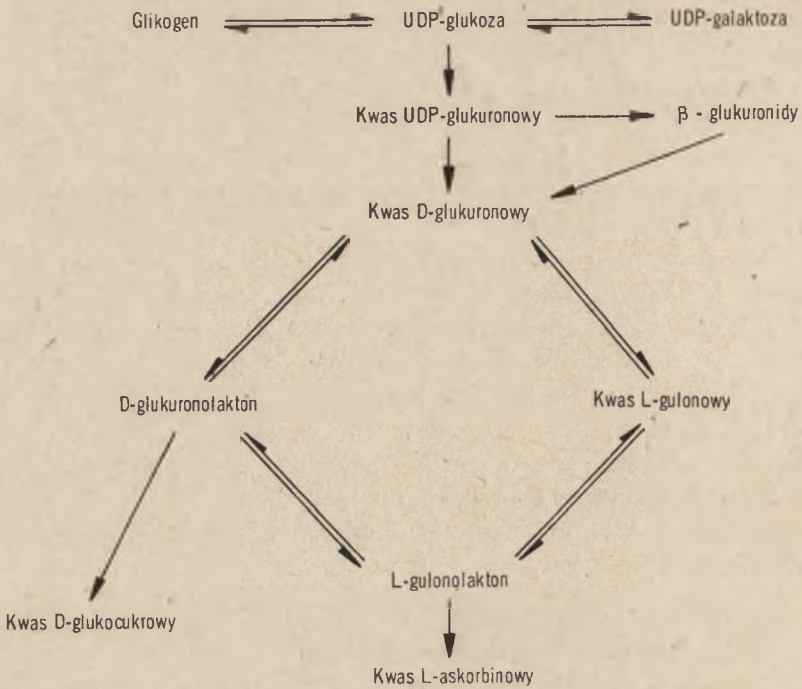
Warto podkreślić, że kwas glukocukrowy oraz jego 1,4-lakton są u ssaków zwykłymi metabolitami.

2. Biosynteza specyficznego inhibitora β -glukuronidazy

Metabolizm kwasu glukuronowego (powstającego w organizmie z glikogenu i glukozy poprzez UDP-glukozę oraz degradacji β -glukuronidów przy udziale β -GR) prowadzi do powstawania kwasu glukocukrowego, który jest endogennym źródłem silnego inhibitora β -GR jakim jest jego lakton (schemat 4). Powstawanie inhibitora β -GR z jednego z jej produktów działania można uważać za mechanizm „ujemnego sprzężenia zwrotnego”.

Marshall (150) wykazał, że mocza ssaków różnych gatunków zawiera dializujący i termostabilny czynnik, który w środowisku kwaśnym staje się specyficznym inhibitorem β -GR. Maksymalne działanie wykazuje on po zakwaszeniu moczu do pH 2 w 100°C, lecz jest ono wyraźne również w warunkach stosowanych do oznaczania aktywności β -GR. Występowanie tego inhibitora w znacznym stopniu komplikuje oznaczanie tego enzymu w moczu i stosowanie go do uwalniania sterydów z glukuronidów wydzielanych w moczu (133). Prawdopodobnie czynnikiem częściowo warunkującym hamowanie β -GR przez mocza ssaków jest kwas glukocukrowy lub jeden z jego laktonów (149, 150).

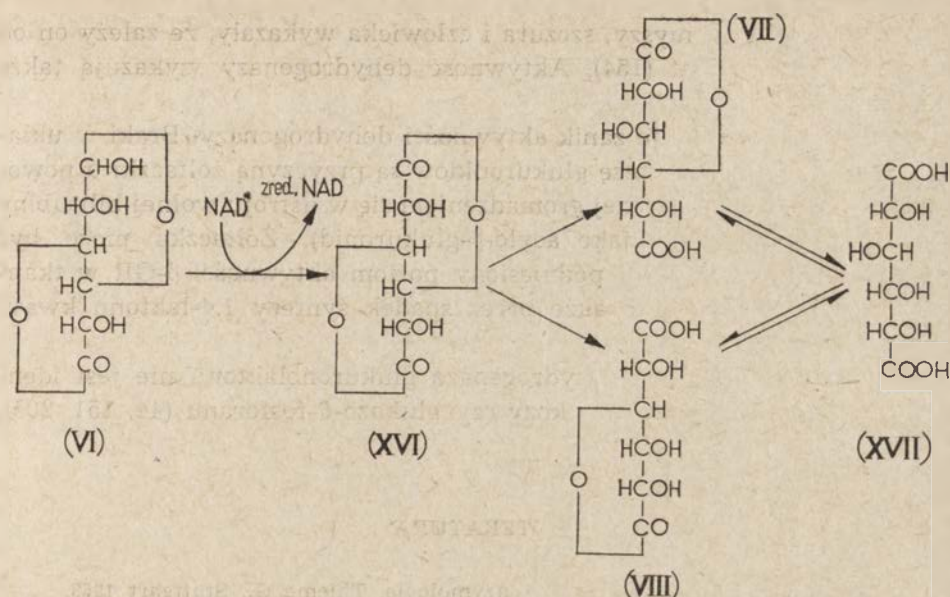
Zdrowy dorosły człowiek wydziela 10mg kwasu D-glukocukrowego w dobowej ilości moczu. Wartość ta wzrasta około 100-krotnie (150) w ciągu 24 godzin po doustnym podaniu 5 g glukuronolaktonu (VI), a po trzech dobach poziom kwasu D-glukocukrowego wraca do normy. Wzrost poziomu tego związku obserwowano również w moczu szczura i świnki morskiej. U szczura był on dużo niższy niż u innych ssaków, co tłumaczy się możliwością konkurencji dwóch dróg metabolicznych o D-glukuronolakton (50), który u tego zwierzęcia może także służyć do syntezy kwasu askorbino-



Schemat 4. Drogi metabolizmu kwasu glukuronowego (151)

wego (schemat 4). Średnio dobową ilość wydzielanego z moczem kwasu glukocukrowego u kobiet jest o 20% niższa niż u mężczyzn, lecz zostaje podwojona podczas ciąży i utrzymuje się na podwyższonym poziomie kilka dni po porodzie (148, 150). Zjawisko to wyjaśniają badania przeprowadzone na myszach. Stwierdzono, że aktywność dehydrogenazy, katalizującej utlenianie glukuronolaktonu (VI) do kwasu glukocukrowego (XVII, schemat 5) w wątrobie myszy, wzrasta podczas ciąży dwukrotnie (154). Być może w ten sposób utrzymywany jest podwyższony poziom hormonów sterydowych w krążeniu ogólnym w stanie sprzężonym i nieaktywnym.

Enzymem, który *in vivo* katalizuje reakcje powstawania kwasu glukocukrowego lub jego laktonu z D-glukuronolaktonu (schemat 5), jest wykryta w wątrobie ssaków dehydrogenaza D-glukuronolaktonu (151). Enzym ten współdziała z NAD^+ i występuje w cytoplazmie komórki (151, 152). Substratem dla dehydrogenazy jest glukuronolakton, natomiast kwas glukuronowy reaguje prawdopodobnie tylko po laktonizacji (151). Enzym ten jest niekompetycyjnie hamowany przez proste, pierwszorzędowe alkohole alifatyczne (inhibicja wzrasta w miarę zmniejszania się rozpuszczalności tych związków w wodzie) oraz przez barbiturany i inne środki uspokajające. *In vivo*, środki uspokajające wzmagają wydzielanie kwasu glukocukrowego (158), podobnie jak kwasu glukuronowego i askorbino-



Schemat 5. Powstawanie kwasu glukocukrowego (XVII) z glukuronolaktonu (VI) *in vivo* u ssaków (153)

Utlenianie glukuronolaktonu (VI) przez NAD^+ jest procesem nieodwracalnym, w którego wyniku, jako pierwszy produkt postulowanego (151, 153) ciągu reakcji (schemat 5), powstaje 1,4-6,3-dwulakton kwasu glukocukrowego (XVI). Związek ten jest nietrwały i w środowisku wodnym ulega mutarotacji do dwóch monolaktonów kwasu glukocukrowego; hamującego β -GR 1,4-laktonu (VII) i niehamującego 6,3-laktonu (VIII).

Postulowany ciąg reakcji przedstawiony na schemacie 5 poparły wyniki doświadczeń z dehydrogenazą wątroby ludzkiej (153). Produkt działania tego enzymu hamuje β -GR bez uprzedniego traktowania kwasem. Na podstawie tych danych oczywisty staje się spadek aktywności β -GR w krwi człowieka, obserwowany po podaniu glukuronolaktonu (74). U myszy produktem działania dehydrogenazy glukuronolaktonu jest związek, który hamuje aktywność β -GR dopiero po traktowaniu kwasem (153). Nadal nie wyjaśniono w jaki sposób 1,4-lakton powstaje *in vivo* u tego ssaka. Nie wiadomo czy glukuronolakton przechodzi bezpośrednio w kwas glukocukrowy czy w jego 6,3-lakton oraz czy preparat enzymatyczny zawiera 1,4-laktonazę. W obecności homogenatu z wątroby myszy z 1,4-6,3-dwulaktonu kwasu glukocukrowego powstaje bowiem dużo więcej 1,4-laktonu niż skutek spontanicznego rozkładu dwulaktonu. Tego działania nie wykazuje homogenat z wątroby ludzkiej (153). Po podaniu glukuronolaktonu myszom wykrywano w wątrobie znaczne ilości kwasu glukocukrowego, przy czym również i w tym przypadku ilość tego kwasu w formie 1,4-laktonu była większa niż w stanie równowagi (153).

Doświadczenia nad poziomem aktywności dehydrogenazy glukurono-

laktonu w wątrobie myszy, szczura i człowieka wykazały, że zależy on od wieku i płci zwierząt (154). Aktywność dehydrogenazy wykazują także tkanki nerek i jąder.

Rak tkanki powoduje zanik aktywności dehydrogenazy. Braki w układzie warunkującym syntezę glukuronidów są przyczyną żółtaczki u noworodków (227), spowodowanej gromadzeniem się w ustroju wolnej bilirubiny (normalnie wydzielanej jako acylo- β -glukuronid). Żółtaczka może być wywołana nie tylko przez podniesiony poziom aktywności β -GR w tkankach u dzieci (104), lecz także przez spadek syntezy 1,4-laktonu kwasu glukocukrowego.

Należy podkreślić, że dehydrogenaza glukuronolaktonu nie jest identyczna z dehydrogenazą D-glukozy czy glukozo-6-fosforanu (44, 151, 205).

LITERATURA

1. Abderhalden R., *Klinische Enzymologie*, Thieme G., Stuttgart 1958.
2. Alfsen A., Jayle M. F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 2143 (1958).
3. Anke W. K., Fenichel R., Barness L. A., *A. M. A. J. Diseases Children* **98**, 559 (1959).
4. Ballantyne B., Bright B., *J. Anat.* **106**, 184 (1970).
5. Beaufay H., Bendall D. S., Baudhuin P., Wattiaux R., De Duve C., *Biochem. J.* **73**, 628 (1959).
6. Beaufay H., Jacques P., Sellinger O. Z., Berthet J., De Duve C., *Biochem. J.* **92**, 184 (1964).
7. Becker B., Friedenwald J. S., *Arch. Biochem.* **22**, 101 (1949).
8. Bernfeld P., Bernfeld H. C., Nisselbaum J. S., Fishman W. H., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4872 (1954).
9. Bernfeld P., Fishman W. H., *J. Biol. Chem.* **202**, 757 (1953).
10. Bernfeld P., Jacobson S., Bernfeld H. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **69**, 198 (1957).
11. Bernfeld P., Nisselbaum J. S., Fishman W. H., *J. Biol. Chem.* **202**, 763 (1953).
12. Beyler A. L., Szego C. M., *Endocrinology* **54**, 334 (1954).
13. Billet F., *Biochem. J.* **67**, 463 (1957).
14. Billing B. H., Cole P. G., Lathe G. H., *Biochem. J.* **65**, 774 (1957).
15. Boyland E., *Brit. Med. Bull.* **14**, 153 (1958).
16. Boyland E., *The Biochemistry of Bladder Cancer*, str. 50. Thomas, Springfield, Illinois, 1963.
17. Boyland E., Wallace D. M., Williams D. C., *Brit. J. Cancer* **9**, 62 (1955).
18. Boyland E., Williams D. C., *Biochem. J.* **64**, 578 (1956).
19. Boyland E., Williams K., *Biochem. J.* **76**, 388 (1960).
20. Brodersen R., Hermann L. S., *Lancet* **1**, 1242 (1963).
21. Buchler H. J., Katzman P. A., Doisy E. A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **76**, 672 (1951).
22. Burton J. F., Pearse A. G. E., *Brit. J. Exptl. Pathol.* **33**, 87 (1952).
23. Bush J. E., Malesh V. B., *J. Endocrinol.* **18**, 1 (1959).
24. Bush J. E., Willoughby M., *Biochem. J.* **67**, 689 (1957).

25. Carr A. J., *Nature* **198**, 1104 (1963).
26. Cecil R., Loening U. E., *Biochem. J.* **76**, 146 (1960).
27. Cecil R., Mc Phee J. R., *Advan. Protein Chem.* **14**, 225 (1959).
28. Cohen S. L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **77**, 558 (1951).
29. Cohen S. L., *Can. J. Biochem. Physiol.* **42**, 127 (1964).
30. Cohen S. L., Huseby R. A., *Cancer Res.* **11**, 52 (1951).
31. Cohen S. L., Huseby R. A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **76**, 304 (1951).
32. Cohn Z. A., Hirsh J. G., Wiener E., Ciba Found. Symp. Lysosomes, str. 126, 1963.
33. Conchie J., *Biochem. J.* **58**, 552 (1954).
34. Conchie J., Findley J., *J. Endocrinol.* **18**, 132 (1959).
35. Conchie J., Findlay J., Levvy G. A., *Biochem. J.* **71**, 318 (1959).
36. Conchie J., Findlay J., Levvy G. A., *Nature* **183**, 615 (1959).
37. Conchie J., Hay A. J., Levvy G. A., *Biochem. J.* **89**, 103P (1963).
38. Conchie J., Levvy G. A., *Biochem. J.* **65**, 389 (1957).
39. Conchie J., Macdonald D. C., *Nature* **184**, 1233 (1959).
40. Cox R. J., *Biochem. J.* **71**, 763 (1959).
41. De Duve C., Ciba Found. Symp. Lysosomes, str. 1, 1963.
42. De Duve C., Pressmab B. C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmans F., *Biochem. J.* **60**, 604 (1955).
43. Dianzani M. U., Ciba Found. Symp. Lysosomes, str. 335, 1963.
44. Dickens F., Glock G. E., *Biochem. J.* **50**, 81 (1951).
45. Dixon M., Webb E. C., *Enzymes*, red. Longmans, Green, New York 1958, str. 62.
46. Dogson K. S., Lewis J. I., *Biochem. J.* **55**, 253 (1953).
47. Dogson K. S., Spencer B., *Biochem. J.* **55**, 315 (1953).
48. Dogson K. S., Spencer B., *Biochem. J.* **55**, 436 (1953).
49. Dohrmann R., *Deutsch. Arch. Klin. Med.* **206**, 322 (1960).
50. Dohrmann R., VIIIth Internatl. Congr. of Internal Med., 5—6 Sept. 1962, tom II, Wollheim E., Schlegel B.; Thieme G., Stuttgart 1963, str. 652.
51. Dohrmann R., Klepser R., *Klin. Wochschr.* **38**, 595 (1960).
52. Dohrmann R. E., *Arzneim. Forsch. Drug Res.* **18**, 854 (1968).
53. Dohrmann R. E., Uhles H. J., *Klin. Wochschr.* **41**, 527 (1963).
54. Doyle M. L., Katzman P. A., Doisy E. A., *J. Biol. Chem.* **217**, 921 (1955).
55. Dutton G. J., Report of the 10th Anniversary Symposium on Glucuronic Acid. Tokyo 1964, str. 37.
56. Dutton G. J., Illing H. P. A., *Biochem. J.* **112**, 16P (1969).
57. Dutton G. J., Storey J. D. E., *Biochem. J.* **57**, 275 (1954).
58. Eisenberg F., Jr., *Federation Proc.* **18**, 221 (1959).
59. Fernley H. N., *Biochem. J.* **82**, 500 (1962).
60. Fishman W. H., *The Enzymes*, red. J. B. Sumner i K. Myrback, Academic Press, New York 1950, str. 635.
61. Fishman W. H., *Ciba Found. Colloq. Endocrinol.* **1**, 229 (1952).
62. Fishman W. H., w *Methods in Enzymology*, tom III, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1955, str. 55.
63. Fishman W. H., Altman K. J., Springer B., *Federation Proc.* **7**, 154 (1948).
64. Fishman W. H., Backer J. R., *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 570 (1956).
65. Fishman W. H., Bernfeld P., w *Methods in Enzymology*, tom I, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1955, str. 262.
66. Fishman W. H., Farmelant M. H., *Endocrinol.* **52**, 536 (1953).
67. Fishman W. H., Goldman S. S., De Lellis R., *Nature* **213**, 457 (1967).

68. Fishman W. H., Goldman S. S., Green S., *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 239 (1964).
69. Fishman W. H., Green S., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 880 (1956).
70. Fishman W. H., Green S., *J. Biol. Chem.* **225**, 435 (1957).
71. Fishman W. H., Kadson S. C., Bonner C. D., Fishman L. W., Homburger F., *J. Clin. Endocrinol.* **11**, 1425 (1951).
72. Fishman W. H., Kadson S. C., Homburger F., *J. Am. Med. Assoc.* **143**, 350 (1950).
73. Fishman W. H., Odell L. D., Gill J. E., Christensen R. A., *Am. J. Obstet. Gynecol.* **59**, 414 (1950).
74. Fishman W. H., Smith M., Thompson D. B., Bonner C. D., Kadson C. D., Homburger F., *J. Clin. Invest.* **30**, 685 (1951).
75. Fishman W. H., Springer B., Brunetti R., *J. Biol. Chem.* **173**, 449 (1948).
76. Freeman J. J., Hilf R., Iovino A. J., Michel I., *Endocrinol.* **74**, 990 (1964).
77. Friedenwald J. S., Becker B., *J. Cellular Compt. Physiol.* **31**, 303 (1948).
78. Fukushima D. K., Leeds N. S., *J. Biol. Chem.* **212**, 449 (1955).
79. Gessner P. K., Parke D. V., Williams R. T., *Biochem. J.* **74**, 1 (1960).
80. Gessner P. K., Parke D. V., Williams R. T., *Biochem. J.* **79**, 482 (1961).
81. Goldbarg J. A., Pineda E. P., Banks B. M., Rutenburg A. M., *Gastroenterology* **36**, 193 (1959).
82. Graham A. F., *Biochem. J.* **40**, 603 (1946).
83. Grant J. K., Marrian G. F., *Biochem. J.* **47**, 1 (1950).
84. Harigaya S., *J. Biochem. (Tokyo)* **56**, 392 (1964).
85. Harigaya S., *J. Biochem. (Tokyo)* **56**, 400 (1964).
86. Hayashi M., Nakajima Y., Fishman W. H., *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 293 (1964).
87. Henry R., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 886 (1952).
88. Henry R., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 897 (1952).
89. Hoffman P., Linker A., Meyer K., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 184 (1958).
90. Hollinger D. M., Rossiter R. J., *Biochem. J.* **52**, 659 (1952).
91. Horikoshi K., *J. Biochem. (Tokyo)* **35**, 39 (1942).
92. Horvitt B. N., *Rec. Progr. Hormone Res.* **9**, 356 (1954).
93. Iida R., Nagata S., Kakimoto M., Akaike H., Watanabe H., Shioya A., *Japan J. Pharmacol.* **15**, 88 (1965).
94. Isselbacher K. J., Axelrod J., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1070 (1955).
95. Jacox R. F., *J. Bacteriol.* **65**, 700 (1953).
96. Jaenloz R. W., Stoffyn P. J., *Federation Proc.* **21**, 81 (1962).
97. Janigan D. T., Pearse A. G. E., *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 719 (1962).
98. Jarrige P., Henry R., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 872 (1952).
99. Jayle M. F., *Clin. Chim. Acta* **4**, 276 (1959).
100. Jędrychowski A., Drożdż H., *Diagn. Lab.* **5**, 367 (1969).
101. Junganwala F. B., Robins E., *J. Biol. Chem.* **243**, 4258 (1968).
102. Kadson S. C., Homburger F., Yorshis E., Fishman W. H., *Surg. Gynecol. Obstet.* **97**, 579 (1953).
103. Kadson S. C., Romano P., Hatzimichael A., *Obstet. Gynecol.* **15**, 367 (1960).
104. Karunairatnam M. C., Kerr L. M. H., Levvy G. A., *Biochem. J.* **45**, 496 (1949).
105. Karunairatnam M. C., Levvy G. A., *Biochem. J.* **44**, 599 (1949).

106. Karunairatnam M. C., Levvy G. A., *Biochem. J.* **49**, 210 (1951).
107. Kato K., Yoshida K., Tsukamoto H., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **10**, 1238 (1962).
108. Kato K., Yoshida K., Tsukamoto H., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **10**, 1242 (1962).
109. Kato K., Yoshida K., Tsukamoto H., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **12**, 664 (1964).
110. Kato K., Yoshida K., Tsukamoto H., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **12**, 670 (1964).
111. Kato K., Yoshida K., Tsukamoto H., Nobunaga M., Masuya T., Sawada T., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **8**, 239 (1960).
112. Kerr L. M. H., Levvy G. A., *Biochem. J.* **48**, 209 (1951).
113. Kilkowska K., *Endokr. Pol.* **20**, 555 (1969).
114. Kiyomoto A., Harigaya S., Oshima S., Morita T., *Biochem. Pharmacol.* **12**, 105 (1963).
115. Krawczyński J., Diagnostyka Enzymologiczna w Medycynie Praktycznej, PZWL, Warszawa 1965.
116. Kushinsky S., Chen V. L., Otterness I., *Nature* **214**, 142 (1967).
117. Kushinsky S., Otternass I., *Steroids* **3**, 311 (1964).
118. Lathe G. H., Walker M., *Biochem. J.* **70**, 705 (1958).
119. Law L. W., Morrow A. G., Greenspan E. M., *J. Nat. Cancer Inst.* **12**, 909 (1952).
120. Lawson J. G., *J. Obstet. Gynecol. Brit. Empire* **66**, 946 (1959).
121. Lawson J. G., *J. Obstet. Gynaecol. Brit. Empire* **67**, 305 (1960).
122. Leaback D. H., Walker P. G., *Biochem. J.* **78**, 151 (1961).
123. Levis F. J. W., Plaice C. H. J., *Brit. J. Cancer* **14**, 106 (1960).
124. Levvy G. A., *Biochem. J.* **42**, 2 (1948).
125. Levvy G. A., *Biochem. J.* **52**, 464 (1952).
126. Levvy G. A., *Biochem. J.* **58**, 462 (1954).
127. Levvy G. A., *Vitamins and Hormones* **14**, 267 (1956).
128. Levvy G. A., Conchie J., Glucuronic Acid Free and Combined, red. G. J. Dutton, Academic Press, New York i Londyn 1966, str. 301.
129. Levvy G. A., Hay A. J., Conchie J., *Biochem. J.* **91**, 378 (1964).
130. Levvy G. A., Hay A. J., Marsh C. A., *Biochem. J.* **65**, 203 (1957).
131. Levvy G. A., Kerr L. M. H., Campbell J. G., *Biochem. J.* **42**, 462 (1948).
132. Levvy G. A., Marsh C. A., *Biochem. J.* **52**, 690 (1952).
133. Levvy G. A., Marsh C. A., *Science* **119**, 337 (1954).
134. Levvy G. A., Marsh C. A., *Biochem. J.* **66**, 21P (1957).
135. Levvy G. A., Marsh C. A., *Nature* **180**, 197 (1957).
136. Levvy G. A., Marsh C. A., *Advan. Carbohydrate Chem.* **14**, 381 (1959).
137. Levvy G. A., Marsh C. A., The Enzymes, tom IV, red. P. D. Boyer, H. Lardy i K. Myrback, Academic Press, New York i Londyn 1960, str. 397.
138. Levvy G. A., Mc Allan A., *Biochem. J.* **87**, 361 (1963).
139. Levvy G. A., Mc Allan A., Hay A. J., *Biochem. J.* **82**, 225 (1962).
140. Levvy G. A., Mc Allan A., Marsh C. A., *Biochem. J.* **69**, 22 (1958).
141. Linker A., Meyer K., Hoffman P., *J. Biol. Chem.* **235**, 924 (1960).
142. Linker A., Meyer K., Weissmann B., *J. Biol. Chem.* **213**, 237 (1955).
143. Lohmar R., Dimler R. J., Moore S., Link K. P., *J. Biol. Chem.* **143**, 551 (1942).
144. Marogg J., Wegmann T., *Deutsche Med. Wschr.* **84**, 1526 (1959).
145. Marsh C. A., *Biochem. J.* **58**, 609 (1954).
146. Marsh C. A., *Biochem. J.* **59**, 58 (1955).

147. Marsh C. A., *Biochem. J.* **59**, 375 (1955).
148. Marsh C. A., *J. Physiol. (London)* **164**, 7P (1962).
149. Marsh C. A., *Nature* **194**, 974 (1962).
150. Marsh C. A., *Biochem. J.* **86**, 77 (1963).
151. Marsh C. A., *Biochem. J.* **87**, 82 (1963).
152. Marsh C. A., *Biochem. J.* **89**, 108 (1963).
153. Marsh C. A., *Biochem. J.* **99**, 22 (1966).
154. Marsh C. A., Carr A. J., *Clin. Sci.* **28**, 209 (1965).
155. Marsh C. A., Levvy G. A., *Biochem. J.* **63**, 9 (1956).
156. Marsh C. A., Levvy G. A., *Nature* **178**, 589 (1956).
157. Marsh C. A., Levvy G. A., *Biochem. J.* **68**, 610 (1958).
158. Marsh C. A., Reid L. M., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 726 (1963).
159. Matsushiro T., *Tohoku J. Exptl. Med.* **85**, 330 (1965).
160. Mead J. A. R., Smith J. N., Williams R. T., *Biochem. J.* **61**, 569 (1955).
161. Meyer K., *Federation Proc.* **17**, 1075 (1958).
162. Meyer K., Linker A., Rapport M. M., *J. Biol. Chem.* **192**, 275 (1951).
163. Mills G. T., Paul J., Smith E. E. B., *Biochem. J.* **53**, 232 (1953).
164. Miwa T., *Acta Phytochim. (Japan)* **8**, 231 (1935).
165. Moore B. M., Loe R. H., *J. Biol. Chem.* **235**, 1359 (1960).
166. Musa B. U., Doe R. P., Seal U. S., *J. Biol. Chem.* **240**, 2811 (1965).
167. Nakao T., Nakao M., Nakajima T., *J. Biochem. (Tokyo)* **45**, 207 (1958).
168. Nimmo-Smith R. H., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 166 (1961).
169. Odell L. D., Burt J. C., *J. Am. Med. Assoc.* **142**, 226 (1950).
170. Orłowski M., *Enzymologia Kliniczna*, red. E. Szczeklik, PZWL, Warszawa 1963, str. 202 i 490.
171. Oshima G., *J. Biochem. (Tokyo)* **23**, 305 (1936).
172. Paigen K., *Exptl. Cell Res.* **25**, 286 (1961).
173. Paigen K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 1641 (1961).
174. Paszko Z., *Przeździecki Z., Post. Hig. Med. Dośw.* **17**, 361 (1963).
175. Patterson J. F., Cheney M., Fishman W. H., *Endocrinol.* **75**, 273 (1964).
176. Phaff H. J., Demain A. L., *J. Biol. Chem.* **218**, 875 (1956).
177. Pineda E. P., Goldbarg J. A., Banks B. M., Rutenberg A. M., *Gastroenterology* **36**, 202 (1959).
178. Plaice C. H. J., *J. Clin. Pathol.* **14**, 661 (1961).
179. Plapp B. V., Cole R. D., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 193 (1966).
180. Pugh D., Walker P. G., *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 105 (1961).
181. Rafałowicz A., *Endokr. Pol.* **4**, 455 (1964).
182. Ritton G., Fishman W. H., *Endocrinol.* **52**, 692 (1953).
183. Robinson D., Price R. G., Dance N., *Biochem. J.* **102**, 525 (1967).
184. Robinson D., Smith J. N., Williams R. T., *Biochem. J.* **53**, 125 (1953).
185. Robinson D., Smith J. N., Williams R. T., *Biochem. J.* **55**, 151 (1953).
186. Rogala H., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **37**, 55 (1966).
187. Rómeo D., De Bernard B., *Biochim. Biophys. Acta* **159**, 194 (1968).
188. Romeo D., Stangi N., Sottocasa G. L., Pugiarello M. C., de Bernard B., Vittur F., *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 64 (1966).
189. Rossiter R. J., Wong E., *Can. J. Res.* **E28**, 69 (1950).
190. Sadahiro R., Takanashi S., Kawada M., *J. Biochem. (Tokyo)* **58**, 104 (1965).
191. Sarkav N. K., Summer J. B., *Arch. Biochem.* **27**, 453 (1950).
192. Sellinger O. Z., Beaufay H., Jacques P., Doyen A., De Duve C., *Biochem. J.* **74**, 450 (1960).

193. Shibko S., Caldwell K. A., Sawant P. L., Tappel A. L., *J. Cell Comp. Physiol.* **61**, 85 (1963).
194. Sie H. H., Fishman W. H., *Cancer Res.* **13**, 590 (1953).
195. Slater T. F., Greenbaum A. L., Wang D. Y., *Ciba Found. Symp. Lysosomes 1963*, str. 311.
196. Slith S. R., *Biochem. J.* **63**, 705 (1956).
197. Smith E. E. B., Mills G. T., *Biochem. J.* **47**, xiix (1950).
198. Smith E. E. B., Mills G. T., *Biochem. J.* **54**, 164 (1953).
199. Smith R. L., Williams R. T., *Glucuronic Acid Free and Combined*, red. G. J. Dutton, Academic Press, New York 1966, str. 457.
200. Snaith S. M., Levvy G. A., *Biochim. Biophys. Acta* **146**, 599 (1967).
201. Spencer B., Williams R. T., *Biochem. J.* **48**, 537 (1951).
202. Sterkowicz S., *Interpretacja Badań Biochemicznych*, PZWL, Warszawa 1964.
203. Stern M. J. A., *J. Endocrinol.* **16**, 180 (1957).
204. Storey I. D. E., Dutton G. J., *Biochem. J.* **59**, 270 (1955).
205. Strecker H. J., Korkes S., *J. Biol. Chem.* **196**, 769 (1952).
206. Sutherland E. W., Wosilait W. D., *J. Biol. Chem.* **218**, 459 (1956).
207. Tappel A. L., Dillard C. J., *J. Biol. Chem.* **242**, 2463 (1967).
208. Tappel A. L., Sawant P. L., Shibko S., *Ciba Found. Symp. Lysosomes 1963*, str. 78.
209. Utusi M., Huzi K., Matumoto S., Nagaoka T., *Tohoku J. Exptl. Med.* **50**, 175 (1949).
210. Veriety M. A., Caper R., Brown W. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 386 (1964).
211. Wakabayashi M., Fishman W. H., *J. Biol. Chem.* **236**, 996 (1961).
212. Walker P. G., *Biochem. J.* **51**, 223 (1952).
213. Walker P. G., *Biochem. Soc. Symp.* (Cambridge Engl.) **20**, 109 (1961).
214. Walker P. G., Levvy G. A., *Biochem. J.* **49**, 620 (1951).
215. Walker P. G., Levvy G. A., *Biochem. J.* **54**, 56 (1953).
216. Watkin J. E., *doniesienie osobiste*, 1966.
217. Watkins D. K., Lawson J. G., *Clin. Chim. Acta* **8**, 646 (1963).
218. Weber R., *Ciba Found. Symp. Lysosomes 1963*, str. 282.
219. Weissmann B., Hadjiioannou S., Tornheim J., *J. Biol. Chem.* **239**, 59 (1964).
220. Weissmann B., Meyer K., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 1753 (1954).
221. Williams R. T., Millburn P., Smith R. L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **123**, 110 (1965).
222. Wolfson S. K., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **96**, 231 (1957).
223. Wong E., Rossiter R. J., *Can. J. Med. Sci.* **29**, 195 (1951).
224. Woolen J. W., Walker P. G., *Proc. Assoc. Clin. Biochemists* **2**, 14 (1962).
225. Woolen J. W., Walker P. G., *Clin. Chim. Acta* **12**, 659 (1965).
226. Zambotti W., De Bernard B., Lorenzi G., *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **24**, 508 (1954).
227. Zuelzer W. W., Brown A. K., *Am. J. Diseases Children* **101**, 87 (1961).
228. Yamamura Y., Aoki T., Okochi T., Takahashi Y., Ito F., *Clin. Chem.* **9**, 479 (1963).
229. Yoshida K., Kato K., Tsukamoto H., *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)* **12**, 656 (1964).
230. Yuki H., Fishman W. H., *J. Biol. Chem.* **238**, 1877 (1963).

Komunikat

Zarząd Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej oddział w Poznaniu uprzejmie donosi, że w dniach 1 i 2 października 1971 r. odbędzie się w Poznaniu Krajowe Sympozjum na temat:

„Metabolizm składników morfotycznych krwi”

Program obejmuje referaty i doniesienia z zakresu metabolizmu krwinki czerwonej, białej i płytkowej.

Ostateczne terminy zgłoszenia:

1. Uczestnictwo i tytuł doniesienia — 1 marca 1971 r.
2. Streszczenie doniesienia — 15 kwietnia 1971 r.
3. Rezerwacja hotelu — 1 czerwca 1971 r.

Adres: Komitet Organizacyjny: Prof. dr Józef Chmiel, Zakład Biochemii Instytutu Chemii i Analityki Akademii Medycznej, Poznań, ul. Grunwaldzka 6

MARIA M. JELEŃSKA *

Kowalencyjne wiązania krzyżowe w kolagenie

The Covalent Cross-Links in Collagen

The actual views on character of covalent cross-links and their significance for the maintenance of collagen structure are discussed.

Kolagen jest białkiem tkanki łącznej stanowiącym u kręgowców około 30% wszystkich białek tkankowych. W jego hydrolizatach całkowitych znaleziono bardzo dużą zawartość kwasów piroolidynowych (około 25%) i glicyny (około 30%). W skład kolagenu kręgowców wchodzi też rzadko spotykana w białkach hydroksylizyna, natomiast nie stwierdzono w nim obecności tryptofanu i cysteiny. W wyniku badań nad budową kolagenu, których przegląd ukazał się w *Postęпах Biochemii* (72) ustalono, że podstawową jednostką strukturalną kolagenu jest tropokolagen zbudowany z trzech lewoskrętnych łańcuchów polipeptydowych skreślonych wokół siebie w prawoskrętny superheliks. Dwa z tych łańcuchów tzw. α_1 mają bardzo zbliżony skład aminokwasowy, zaś trzeci łańcuch α_2 różni się od nich znacznie budową pierwszorzędową.

W świeżo zsyntetyzowanym kolagenie poszczególne łańcuchy są połączone między sobą wyłącznie wiązaniami wodorowymi. Natomiast w czasie „dojrzwiania” i starzenia się kolagenu powstają w nim różnego typu kowalencyjne wiązania krzyżowe zarówno wewnątrz jak i międzycząsteczkowe (30, 43, 45, 47, 52, 70, 78). O obecności tych wiązań świadczą wyizolowane z kolagenu dimery β i trimery γ powstałe z dwóch lub trzech łańcuchów α , przy czym liczba wypisana przy symbolu wskazuje, z których łańcuchów α są one zbudowane.

Z powodu braku cysteiny nie ma w kolagenie kręgowców mostków dwusiarczkowych występujących w większości innych białek. Posiada on natomiast wiązania aldolowe (powstałe na drodze kondensacji aldolowej), wiązania aldiminowe (typu zasady Schiffa), oraz γ -glutamylowe wiązania

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

Wykaz stosowanych skrótów: KRS — kolagen rozpuszczalny w solach, KRK — kolagen rozpuszczalny w kwasach, Hse — homoseryna, FDNB — 1-fluoro-2,4-dwunitrobenzen

peptydowe. Wiązania krzyżowe występujące w kolagenie omówione były w kilku pracach przeglądowych (4, 7, 41, 59, 72). W ostatnim roku ukażało się jednak sporo prac znacznie rozszerzających i wyjaśniających problem powstawania wiązań krzyżowych. Omówienie niniejsze dotyczy głównie postępu dokonanego w ostatnim okresie.

I. Krzyżowe wiązania kowalencyjne wewnątrzcząsteczkowe

Zarówno liczba jak i rodzaj wiązań krzyżowych występujących w kolagenie zależą od źródła kolagenu oraz wieku zwierzęcia. I tak np.: kolagen ze ścięgien Achillesa zawiera więcej wiązań krzyżowych niż kolagen ze skóry, a kolagen ze starego zwierzęcia więcej niż kolagen z młodego osobnika.

1. Wiązania krzyżowe wewnątrzłańcuchowe

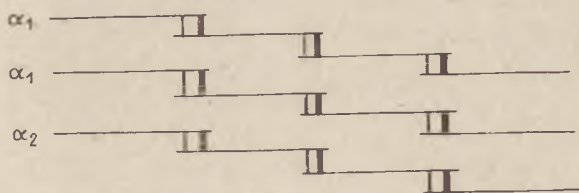
Do wiązań, które występują we wszystkich typach kolagenu kręgowców należą wiązania wewnątrzłańcuchowe. Są to rzadko spotykane w innych białkach wiązania peptydowe γ -karboksylowe (34, 36, 38, 77).

Obecność wiązania peptydowego γ -karboksylowego można stwierdzić oznaczając zawartość kwasu glutaminowego z wolną grupą α -karboksylową. Fran z bla u i wsp. (34) estryfikowali wolne grupy karboksylowe w kolagenie a następnie przeprowadzali je w kwasy hydroksamowe. Te z kolei po reakcji z FDNB i przegrupowaniu Lossena oraz hydrolizie dawały w przypadku kwasu glutaminowego związanego wiązaniem γ -glutamylowym, semialdehyd kwasu bursztynowego. Ilość powstałych reszt semialdehydu kwasu bursztynowego wskazywała, że co najmniej 30% reszt kwasu glutaminowego w ichtiokolu i 13% w kolagenie ze skóry cielejącej występuje w postaci związanej peptydowo przez grupę γ -karboksylową.

Teoretycznie możliwe jest również istnienie w łańcuchach kolagenu wiązań peptydowych z udziałem ϵ -aminowej grupy lizyny. M e c h a n i c i L e v y (51) wyizolowali nawet z kolagenu ścięgien Achillesa wołu trójpeptyd N ϵ -lizynowy, a mianowicie N ϵ -(glicylo- α -glutamyl) lizynę, którego budowę udowodnili przez jego degradację oraz syntezę. Wyniki te nie zostały jeszcze potwierdzone przez innych, jednak należy liczyć się z tym, że kilka lizyn w cząsteczce tropokolagenu może być związanych wiązaniem ϵ -peptydowym (18, 73).

Do niedawna przypuszczano, że oprócz wyżej wspomnianych wiązań w łańcuchu polipeptydowym kolagenu są obecne wiązania estrowe. Wiązania te można znaleźć w wielu białkach i peptydach. Najczęściej są to wiązania poprzeczne między dwoma łańcuchami polipeptydowymi, lub też na C-końcu łańcucha peptydowego. Gallop i wsp. (39) zaobserwowali, że pod wpływem hydrazyny lub hydroksylaminy (w warunkach,

które powodują rozerwanie wiązań estrowych), masa cząsteczkowa kolagenu zmniejsza się z około 300 000 do blisko 25 000, co przypisali rozerwaniu 6 wiązań estrowych w łańcuchu α . Na tej podstawie Gall op (36) zaproponował podjednostkowy model cząsteczki tropokolagenu (model 4 : 4 : 4), który przedstawiono na rysunku 1.

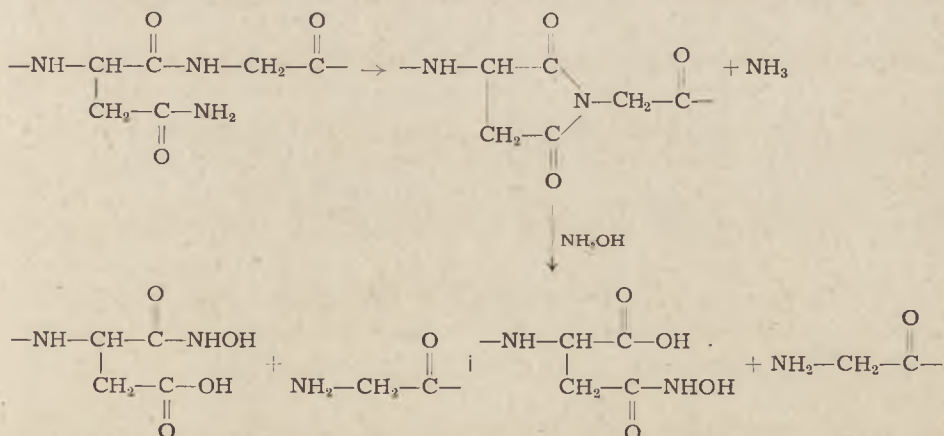


Rys. 1. Podjednostkowy model cząsteczki tropokolagenu według Gallopa (36)

W modelu tym każdy łańcuch α składa się z 4 podjednostek powiązanych dwiema parami wiązań estrowych, z których jedno jest tworzone przez α a drugie przez β -karboksylową grupę kwasu asparaginowego (20). Donor grup -OH w tych wiązaniach estrowych nie został ustalony.

Opierając się na takim podjednostkowym modelu cząsteczki tropokolagenu Gall op (36) wysunął hipotezę, że wiązania międzyłańcuchowe w kolagenie powstają na drodze transestryfikacji. Hipoteza ta jednak nie została potwierdzona doświadczalnie: u zwierząt latorycznych nie znaleziono wiązań międzyłańcuchowych w kolagenie mimo, że są w nim jak przypuszczano, wiązania estrowe wewnątrzłańcuchowe.

W świetle najnowszych badań Bornsteina (22) występowanie wiązań estrowych w kolagenie staje pod znakiem zapytania. Bornstein udowadnia, że traktowanie kolagenu hydroksylaminą nie prowadzi do rozerwania wiązań estrowych lecz cyklicznych imidów utworzonych w łańcuchu polipeptydowym przez reszty asparaginy. W wyniku tej reakcji następuje pęknięcie łańcucha polipeptydowego. (Schemat 1).



Schemat 1. Proponowana struktura wiązań rozrywanych przez hydroksylaminę (22)

Jak widać z przedstawionych tu wyników nadal brak przekonujących dowodów na występowanie wewnątrzłańcuchowych wiązań estrowych.

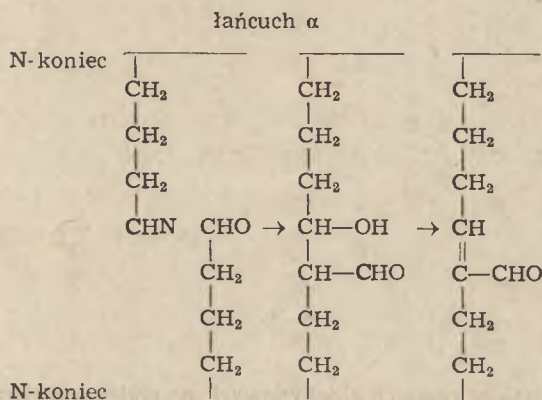
2. Wiązania krzyżowe międzylańcuchowe

O obecności wiązań krzyżowych międzylańcuchowych świadczy m.in. wyizolowanie z cząsteczki tropokolagenu dimerów β , które, jak wykazano, powstają z dwóch łańcuchów α_1 (β_{11}) lub łańcuchów α_1 i α_2 (β_{12}) (48).

W 1962 roku powstała koncepcja ewentualnego udziału aldehydów w wiązaniach krzyżowych (45). Obecność aldehydów w kolagenie wykazano już wcześniej, lecz rola ich nie była jasna. Pewne wskazania co do udziału aldehydów w tworzeniu wiązań krzyżowych przyniosły wyniki uzyskane przez Rojkinda, Blumenfeld i Gallopa (62, 63). Autorzy ci wyizolowali z kolagenu trawionego kolagenazą bakteryjną (peptydaza A z *Clostridium*) peptyd zbudowany z 30 reszt aminokwasowych i zawierający jedną grupę aldehydową. Badając produkt reakcji tej grupy aldehydowej z 2,4-dwunitrofenylohydrazyną ustalili, że jest to w istocie β -hydroksyaldehyd, który łatwo ulega dehydratacji do α,β -nienasyconego aldehydu. Badany peptyd, w którym stwierdzono obecność aldehydu miał zablokowaną grupę N-końcową, co pozwoliło autorom przypuszczać, że był on enzymatycznie odszczepiony z N-końca cząsteczki tropokolagenu.

Jaśniejszy pogląd na rolę aldehydów w kolagenie przyniosły prace Bornsteina i wsp. (24, 27). Frakcjonowali oni na CM-celulozie zdenaturowany kolagen rozpuszczalny w obojętnych roztworach soli (KRS) oraz rozpuszczalny w kwasach (KRK). KRS jest to kolagen świeżo zsyntetyzowany i dlatego jego cząsteczki tropokolagenu zbudowane są głównie z łańcuchów α , natomiast KRK jest to nieco starszy kolagen zawierający w cząsteczce tropokolagenu obok łańcuchów α także dimery β i trimery γ . Bornstein i wsp. (24, 27) rozrywali za pomocą cyjanobromu wiązania metionylowe w łańcuchach α z KRS oraz α i β z KRK. Po takim traktowaniu z łańcuchów α KRS wyizolowali oni krótki peptyd, w którym piątą pozycję od N-końca zajmowała lizyna. Natomiast z łańcuchów α KRK otrzymali oni peptyd, w którym na piątej pozycji od N-końca zamiast lizyny znaleźli δ -semialdehyd kwasu α -aminoadypinowego; jak stwierdzono w badaniach izotopowych powstał on z lizyny (24). Po podaniu zwierzętom ^{14}C -lizyny zarówno lizyna w N-końcowym peptydzie z KRS jak i δ -semialdehyd w analogicznym peptydzie z KRK są radioaktywne. Nasunęło to przypuszczenie, że przejście lizyny w δ -semialdehyd kwasu α -aminoadypinowego miało miejsce w czasie dojrzewania kolagenu (stopniowe przekształcenie KRS w KRK). Przy rozszczepieniu cyjanobromem dimerów β (z KRK) Bornstein i wsp. (27) uzyskali peptyd, który nie zawierał ani lizyny ani δ -semialdehydu kwasu α -aminoadypinowego, natomiast posiadał α, β -nienasycony aldehyd. Ponieważ dimer β powstaje

w wyniku wytworzenia wiązania między dwoma łańcuchami α autorzy ci przypuszczają, że wiązanie to może powstać na drodze kondensacji aldolowej dwóch δ -semialdehydów kwasu α -aminoadypinowego obecnych w sąsiednich łańcuchach. Tłumaczyłoby to obecność α,β -nienasyconego aldehydu w dimerze β z KRK (Schemat 2).



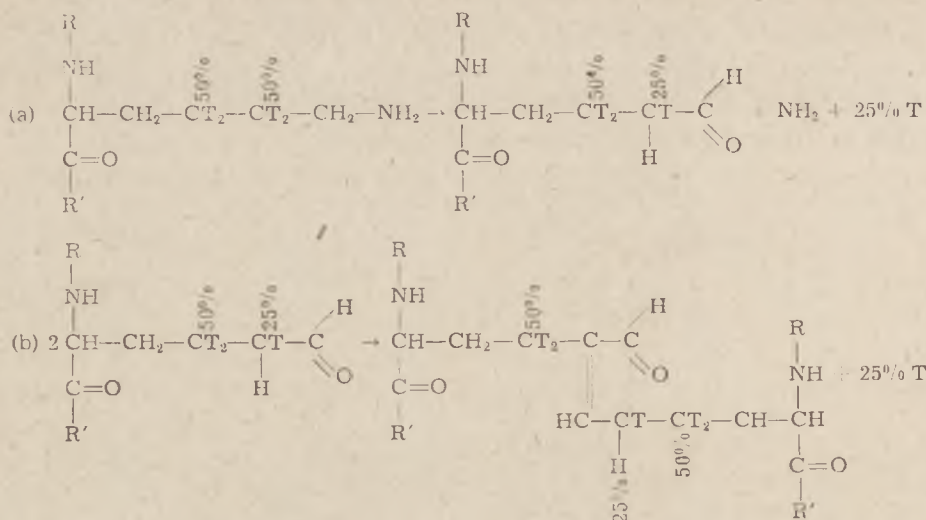
Schemat 2. Powstawanie wiązania krzyżowego w reakcji kondensacji aldolowej

W najnowszych pracach poświęconych zagadnieniu wiązań krzyżowych w kolagenie spotyka się dalsze dowody na powstawanie wiązań aldolowych (44, 58, 65, 66). Rojkin d i wsp. (66) po trawieniu kolagenu ze skóry szczura kolagenazą bakteryjną wyizolowali peptyd, który zawierał α,β -nienasycony aldehyd. Skład aminokwasowy tego peptydu był bardzo podobny do składu peptydu wyodrębnionego przez Bornsteina i wsp. (24, 27) z kolagenu ze skóry szczurów traktowanego cyjanobromem. Stosując ¹⁴C-lizynę Rojkin d i wsp. (66) wykazali, że była ona wyjściowym substratem w biosyntezie α,β -nienasyconego aldehydu, co jest zgodne z zaproponowanym przez Bornsteina i wsp. (27) mechanizmem powstawania wiązań krzyżowych na drodze kondensacji aldolowej.

Hipotezę tę potwierdziły również wyniki badań bilansowych trytu przy przemianie ³H-lizyny w pochodną aldehydową. Przyjmując aktywność właściwą radioaktywnej lizyny wbudowanej w kolagen za 100% Rojkin d i wsp. (66) stwierdzili, że radioaktywność właściwa α,β -nienasyconego aldehydu pochodzącego z lizyny wynosi około 125%, a więc zgodnie z przebiegiem kondensacji aldolowej przedstawionym na schemacie 3.

Produkt tej kondensacji wyizolowano w 1969 roku zarówno z elastyny (47, 67), jak i z kolagenu (44, 58, 65). W przypadku kolagenu produkt kondensacji aldolowej wyizolowano z całej cząsteczki tropokolagenu (58), z dimerów β_{12} (44), jak również peptydów uzyskanych po trawieniu kolagenu kolagenazą bakteryjną (65) lub odszczepionych cyjanobromem (44).

Przedstawione prace dowodzą istnienia wiązania aldolowego w czą-

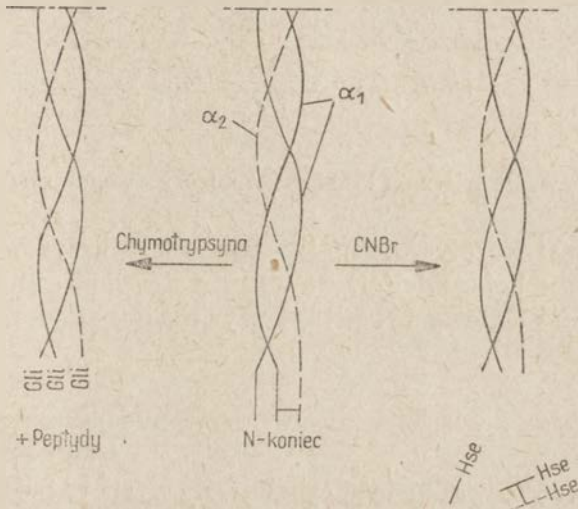


Schemat 3. Bilans trytu w resztach aldehydowych po podaniu zwierzętom 4,5-³H-lizy-
ny: a) powstawanie aldehydu, b) kondensacja aldolowa (66)

steczce tropokolagenu. O lokalizacji tego wiązania na 5 pozycji od N-końca łańcucha α mówiły wspomniane wyżej wyniki badań Bornsteina i wsp. (24, 27). W dalszej pracy ci sami autorzy stwierdzili, że skład i sekwencja aminokwasów w peptydzie zawierającym wiązania aldolowe różnią się od typowego składu i sekwencji aminokwasów kolagenu. Ponadto peptyd ten nie ma budowy spiralnej. Brak struktury spiralnej przy N-końcu cząsteczki tropokolagenu tłumaczy łatwy dostęp niektórych enzymów proteolitycznych do tej części cząsteczki. Bornstein i wsp. (23) posługując się rozdziałem elektroforetycznym na żelu poliakrylamidowym stwierdzili, że po odszczepieniu omawianych peptydów chymotrypsyną lub cyjanobromem z cząsteczki tropokolagenu, która miała wiązanie krzyżowe wewnątrzłańcuchowe, pozostaje kolagen, w którym nie ma już dimerów β , lecz tylko pojedyncze łańcuchy o ruchliwości zbliżonej do ruchliwości łańcuchów α . Na tej podstawie autorzy ci wyrazili przypuszczenie, że wiązania aldolowe są zlokalizowane w nieheliksowej części cząsteczki tropokolagenu (Rys. 2).

Omówione wyżej wiązania aldolowe powstają w wyniku kondensacji aldolowej dwóch reszt δ -semialdehydu kwasu α -aminoadypinowego. Ostatnio Bailey i wsp. (11, 15) wyizolowali z kolagenu kości, denty ny zębów oraz ścięgien Achillesa tzw. syndezyne, która powstała w wyniku kondensacji aldolowej dwóch aldehydów, przy czym prekursorem jednego z nich była lizyna a drugiego hydroksylizyna. Lokalizacja tego wiązania w cząsteczce tropokolagenu nie jest dotychczas ustalona, gdyż niezna ne jest położenie hydroksylizyny, która ulega oksydacyjnej dezaminacji

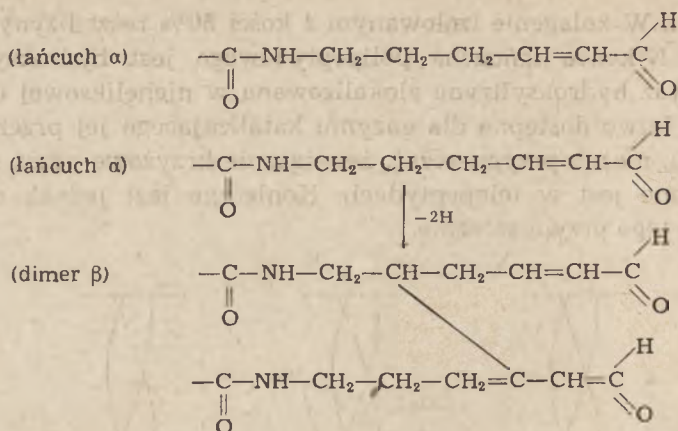
do aldehydu. W kolagenie izolowanym z kości 50% reszt lizyny na piątej pozycji od N-końca łańcucha polipeptydowego jest hydroksylowanych (15). Ponieważ hydroksylizyna zlokalizowana w nieheliksowej części cząsteczki jest łatwo dostępna dla enzymu katalizującego jej przekształcenie do aldehydu, można przypuszczać, że wiązanie krzyżowe przez syntezyne umiejscowione jest w telopeptydach. Konieczne jest jednak dalsze potwierdzenie tego przypuszczenia.



Rys. 2. Działanie chymotrypsyny i cyjanobromu na cząsteczkę tropokolagenu (23)

W ostatnich latach Blumenfeld, Gallop i Schneider (21, 37, 69) zaproponowali jeszcze jeden schemat powstawania wewnątrzcząsteczkowych wiązań krzyżowych. Wyizolowali oni z kolagenu, poddanego redukcji i hydrolizie sześć aminoalkoholi (między innymi lizynol), których prekursorami według autorów były odpowiednie aminoaldehydy. Według tej hipotezy lizynol był C-końcowym aminoaldehydem związanym z łańcuchem polipeptydowym przez grupę ϵ -aminową. Tylko taka lokalizacja lizynolu mogła tłumaczyć obecność w preparatach kolagenu enozaliny, która mogła powstać z lizynolu na drodze nieoksydacyjnej dezaminacji. Według autorów tej koncepcji reszty enozaliny z dwóch sąsiednich łańcuchów α mogą w odpowiednich warunkach tworzyć wiązania poprzeczne czego potwierdzeniem było wyizolowanie dwuenozaliny (Schemat 4).

W świetle najnowszych badań opisana wyżej teoria wydaje się mało prawdopodobna. Paz i wsp. (57) dowodzą, że większość α -aminoalkoholi izolowanych po redukcji i hydrolizie kolagenu pochodzi nie z α -aminoaldehydów, jak wcześniej przypuszczano lecz powstaje z redukcji wiązań peptydowych.



Schemat 4. Powstawanie wiązania krzyżowego między dwiema resztami enozalin (17)

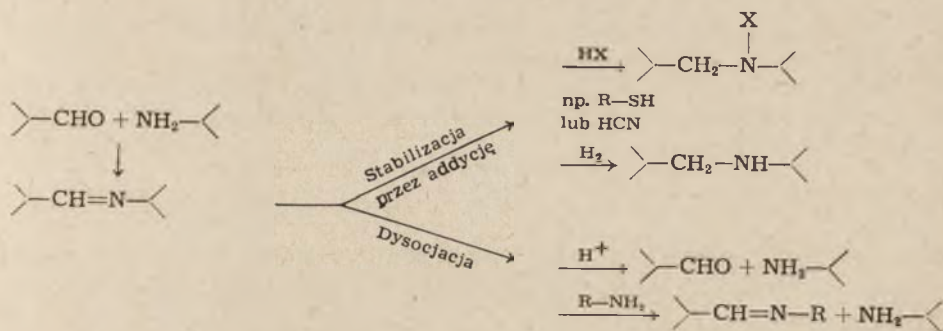
Zatem spośród teoretycznie możliwych wiązań krzyżowych wewnątrzcząsteczkowych w kolagenie (41) do tej pory doświadczalnie udowodniono obecność wiązań aldolowych i peptydowych γ -glutamylowych.

II. Krzyżowe wiązania kowalencyjne międzycząsteczkowe

O występowaniu wiązań międzycząsteczkowych w kolagenie świadczy obecność w nim dimerów β_{22} (25, 26) oraz trimerów γ_{222} (78) zbudowanych z dwóch lub trzech łańcuchów α_2 pochodzących z sąsiadujących cząsteczek tropokolagenu. Dimery β_{12} i β_{11} mogą pochodzić z pojedynczych cząsteczek tropokolagenu.

Na pewne podobieństwo wiązań wewnątrz i międzycząsteczkowych wskazują badania kolagenu wyodrębnionego ze zwierząt latorycznych. Wykazały one, że podanie zwierzętom związków latorycznych hamuje powstawanie obu typów wiązań (40, 53, 55). Można by więc przypuszczać, że natura wiązań międzycząsteczkowych i wewnątrzcząsteczkowych jest zbliżona. W tej sytuacji było prawdopodobne, że aldehydy występujące w wiązaniach wewnątrzcząsteczkowych biorą udział także w tworzeniu wiązań międzycząsteczkowych. Przy powstawaniu wiązań wewnątrzcząsteczkowych kondensacja aldolowa jest ułatwiona wskutek tego, że aldehydy w łańcuchach α cząsteczki tropokolagenu położone są naprzeciw siebie. Powstanie wiązań międzycząsteczkowych z udziałem dwóch reszt aldehydowych jest jednak mało prawdopodobne, gdyż sąsiednie cząsteczki tropokolagenu we włóknach kolagenowych są przesunięte względem siebie o 1/4 długości cząsteczki. Wobec tego zaczęto badać możliwości powstawania wiązania typu zasady Schiffa między wolną grupą aminową jednej cząsteczki z resztą aldehydową sąsiedniej cząsteczki tropokolagenu (6, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 56, 74, 75, 76).

Bailey i wsp. (6, 8, 9, 12, 13, 14, 15) przedstawili szereg dowodów na występowanie wiązań tego typu we włóknach kolagenowych. Zaobserwowali oni między innymi, że związki rozszczepiające to wiązanie obniżają wytrzymałość włókien kolagenowych, natomiast związki stabilizujące zwiększają wytrzymałość włókien kolagenowych (Schemat 5).

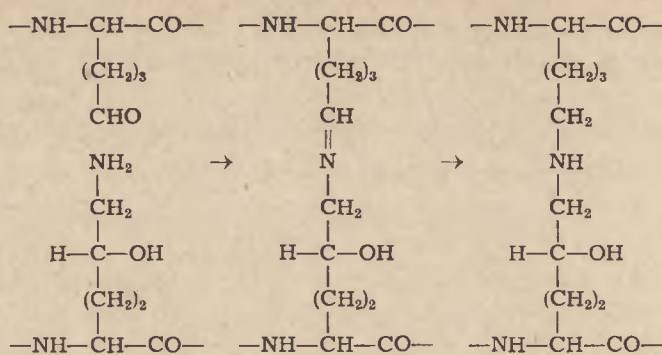


Schemat 5. Reakcje wiązań typu zasady Schiffa (8)

Zmniejszająca się wraz z wiekiem kolagenu podatność wiązań typu zasady Schiffa na odczynniki rozrywające tego rodzaju wiązania Bailey (8) tłumaczy ich stabilizację *in vivo* przez przyłączenie jakiegoś związku do podwójnego wiązania. Tak więc wiązania typu zasady Schiffa w kolagenie miałyby charakter przejściowy i w czasie starzenia się kolagenu byłyby przekształcane w wiązania bardziej trwałe. W aldiminowych wiązaniach krzyżowych międzycząsteczkowych zdaniem Bailey'a bierze udział grupa aldehydowa z końca jednej cząsteczki i wolna grupa ϵ -aminowa sąsiedniej cząsteczki. Gdyby grupa ϵ -aminowa pochodziła z lizyny, to wówczas powinno się znaleźć w hydrolizatach kolagenu $N\epsilon$ -(5-amino-5-karboksypentanylo)-lizynę czyli lizynonorleucynę. Związku tego nie udało się jednak dotychczas wyizolować z kolagenu, znaleziono go natomiast w elastynie (33, 35, 46). Z kolagenu pochodzącego ze ścięgien ogona szczura, ze ścięgien Achillesa wołu, oraz kości i dentyny zębów Bailey wyizolował ostatnio $N\epsilon$ -(5-amino-5-karboksypentanylo)-hydroksylizynę czyli hydroksylizynonorleucynę (9, 11, 13, 14, 15). Związek ten powstał w reakcji grupy aldehydowej δ -semialdehydu kwasu α -aminoadypinowego z grupą ϵ -aminową hydroksylizyny. Produktem pośrednim tej reakcji jest również zasada Schiffa (Schemat 6).

Hydroksylizyny nie znaleziono w telopeptydach, a wiadomo, że występuje ona w heliksowej części cząsteczki tropokolagenu; dlatego przyjmuje się, że międzycząsteczkowe wiązania typu zasady Schiffa powstają między aldehydem zlokalizowanym w telopeptydzie jednej cząsteczki, a hydroksylizyną w heliksowej części z drugiej cząsteczki.

Możliwe, że w kolagenie są również inne niż opisane tutaj wiązania typu zasady Schiffa, gdyż obok δ -semialdehydu kwasu α -aminoadypino-



Schemat 6. Biosynteza hydroksylizynonorleucyny (13)

wego donorami grup aldehydowych mogą być również α , β -nienasycone aldehydy (5, 64) zaś donorami grup aminowych — inne aminokwasy niż hydroksylizyna.

Ponieważ w tworzeniu wiązań zarówno wewnątrz jak i międzycząsteczkowych bierze udział aldehyd, który powstaje z lizyny na drodze oksydacyjnej dezaminacji zaczęto szukać enzymu, który katalizowałby tę przemianę. Wielu autorów postuluje, że przemianę lizyny do aldehydu katalizują niektóre aminooksydazy (19, 28, 42, 54). Nie jest jednak jasne, dlaczego aktywność tych enzymów nie ulega zahamowaniu po podaniu zwierzętom związków latyrogennych (np. β -aminopropionitryli) w stężeniach, które hamują *in vivo* powstawanie wiązań krzyżowych w kolagenie. Istnienie niesklasyfikowanego jeszcze enzymu katalizującego przemianę lizyny związanej peptydowo do δ -semialdehydu kwasu α -aminoadypinowego i wrażliwego na fizjologicznie czynne stężenia latyrogenów, stwierdzili Pinnel, Martin i Gee (60, 61) w wyciągach z kości, aorty i skóry. Enzym ten, jak donieśli ostatnio Bailey i Fowler (10), katalizuje powstawanie *in vitro* wiązań aldolowych i aldiminowych w kolagenie pochodzącym ze zwierząt latyrycznych. W najnowszej pracy Siegela i Martina (71) można znaleźć dalsze dowody na powstawanie międzycząsteczkowych wiązań w kolagenie, w obecności enzymu izolowanego z chrząstek embrionów kurzych wg Pinnela i Martina i Gee (60, 61). Stopień oczyszczenia tego enzymu jest jednak zbyt mały, aby można było wyjaśnić jego strukturę i przeprowadzić dokładniejsze badania własności.

Nie znaleziono dotychczas enzymu katalizującego kondensację aldolową dwóch reszt aldehydowych. Przypuszcza się, że przemiana ta, prowadząca do wytwarzania wiązania aldolowego jest nieenzymatyczna (71).

Prócz omówionych wyżej rodzajów wiązań poprzecznych spotyka się w kolagenie mniej dokładnie zbadane wiązania innego typu. I tak w kolagenie z dentyny zębów Veis i Schlueter (68, 79, 80) postulują obecność wiązań dwuścirowych z udziałem reszt fosforanowych. Wniosek

ten oparli na obserwacji, że żelatyna otrzymana z odwapnionego za pomocą EDTA kolagenu zawiera mocno związane reszty fosforanowe.

Adam i wsp. sądzą, że w wiązaniach poprzecznych może brać udział także jon metalu (1, 2, 3). Podanie zwierzętom tiosiarczanu złota zwiększa bowiem wytrzymałość włókien kolagenowych, zaś w przypadku zwierząt latorycznych zabieg ten zwiększa ilość kolagenu nierozpuszczalnego. Podobny efekt występuje po podaniu zwierzętom soli miedzi i bizmutu. Z ostatnich prac grupy Adama (31) wynika, że wiązania krzyżowe powstające w kolagenie pod wpływem preparatów złota zlokalizowane są w obszarze telopeptydów.

Mostki dwusiarczkowe nie występują w kolagenie kręgowców można je natomiast znaleźć w kolagenie bezkręgowców. Mc Bride i wsp. (49, 50) stwierdzili występowanie mostków S-S w kolagenie z naskórka *Ascaris lumbricoides*. Traktowanie tego kolagenu β -merkaptetanolem powodowało znaczne obniżenie lepkości oraz zmniejszenie masy cząsteczkowej i skręcalności optycznej. W zredukowanym kolagenie autorzy stwierdzili obecność około 30 reszt -SH na 1000 aminokwasów. Spotyka się również doniesienia o udziale reszt tyrozynowych, obecnych w telopeptydach, w tworzeniu wiązań krzyżowych (17, 29, 32).

W przeglądzie tym omówiono szczegółowo tylko te rodzaje wiązań krzyżowych występujących w kolagenie, których obecność została dobrze udokumentowana doświadczalnie. Wobec dużego zainteresowania tą tematyką można jednak mieć nadzieję, że w najbliższym czasie nastąpi dalsze wyjaśnienie szczegółów zarówno natury jak i biosyntezy wiązań krzyżowych w kolagenie.

LITERATURA

1. Adam H., Fietzek P., Kühn R., *Eur. J. Biochem.* 3, 411 (1968).
2. Adam H., Fietzek P., Deyl Z., Rosmus J., Kühn K., *Eur. J. Biochem.* 3, 415 (1968).
3. Adam H., Kühn K., *Eur. J. Biochem.* 3, 407 (1968).
4. Ardelt W., *Post. Biochem.* 14, 105 (1968).
5. Ayad S., Wynn C. H., *Biochem. J.* 118, 61 (1970).
6. Bailey A. J., *Biochem. J.* 105, 348 (1967).
7. Bailey A. J., w *Comprehensive Biochemistry*, red. M. Florin i E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam 1968, tom 26B, str. 297.
8. Bailey A. J., *Biochim. Biophys. Acta* 160, 447 (1968).
9. Bailey A. J., *Gerontologia* 15, 65 (1969).
10. Bailey A. J., Fowler L. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 35, 672 (1969).
11. Bailey A. J., Fowler L. J., Peach C. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 35, 663 (1969).
12. Bailey A. J., Lister D., *Nature* 220, 280 (1968).
13. Bailey A. J., Peach C. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 33, 812 (1968).
14. Bailey A. J., Peach C. M., *Biochem. J.* 111, 12p (1969).
15. Bailey A. J., Peach C. M., Fowler L. J., *Biochem. J.* 117, 819 (1970).

16. Balian G. A., Bowes J. H., Cater C. W., *Biochim. Biophys. Acta* **181**, 331 (1969).
17. Bensusan H. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 77 (1966).
18. Bensusan H. B., Rybicki P., Scanu A., *Federation Proc.* **21**, 410 (1962).
19. Bird D. W., Savage J. W., O'Dell B. L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **123**, 250 (1966).
20. Blumenfeld O. O., Gallop P. M., *Biochemistry* **6**, 947 (1962).
21. Blumenfeld O. O., Gallop P. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **56**, 1260 (1966).
22. Bornstein P., *Biochemistry* **9**, 2408 (1970).
23. Bornstein P., Kang A. M., Piez K. A., *Biochemistry* **5**, 3803 (1966).
24. Bornstein P., Kang A. M., Piez K. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **55**, 417 (1966).
25. Bornstein P., Martin G. R., Piez K. A., *Science* **144**, 1220 (1964).
26. Bornstein P., Piez K. A., *J. Clin. Invest.* **43**, 1813 (1964).
27. Bornstein P., Piez K. A., *Biochemistry* **5**, 3460 (1966).
28. Chou W. S., Savage J. E., O'Dell B. L., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **128**, 948 (1968).
29. Condensen R., Kirrane J. A., *Nature* **218**, 957 (1968).
30. Deshmukh K., Nimni M. E., *Biochem. J.* **112**, 397 (1969).
31. Deyl Z., Rosmus J., Adam H., *Eur. J. Biochem.* **13**, 589 (1970).
32. Doyle R. J., Bell J., Roholt O. A., *Biochim. Biophys. Acta* **160**, 274 (1968).
33. Franzblau C., Faris B., Papaioannou R., *Biochemistry* **8**, 2833 (1969).
34. Franzblau C., Gallop P. M., Seifter S., *Biopolymers* **1**, 79 (1963).
35. Franzblau C., Sinex F. M., Faris B., Lampidis R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 575 (1965).
36. Gallop P. M., *Biophys. J. (Suppl.)* **4**, 79 (1964).
37. Gallop P. M., Blumenfeld O. O., Henson E., Schneider A. L., *Biochemistry* **7**, 2409 (1968).
38. Gallop P. M., Seifter S., Lukin M., Meilman E., *J. Biol. Chem.* **235**, 2619 (1960).
39. Gallop P. M., Seifter S., Meilman E., *Nature* **183**, 1659 (1959).
40. Gross J., *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 250 (1963).
41. Harding J. J., *Advan. Protein Chem.* **20**, 109 (1965).
42. Hill C. H., Starcher B., Kim C., *Federation Proc.* **26**, 129 (1967).
43. Joseph K. T., Bose S. M., *Proc. Symp. Collagen Madras, India, Wiley, New York 1962*, str. 371.
44. Kang A. H., Faris B., Franzblau C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 345 (1969).
45. Kulonen E., Mikkonen L., Heikkinen E., *Biochem. J.* **89**, 63P (1963).
46. Lent R. W., Franzblau C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 43 (1967).
47. Lent R. W., Smith B., Salcedo L. L., Faris B., Franzblau C., *Biochemistry* **8**, 2837 (1969).
48. Martin G. R., Piez K. A., Lewis M. S., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 472 (1963).
49. Mc Bride O. W., *Biochemistry* **6**, 1484 (1967).
50. Mc Bride O. W., Harrington W. F., *J. Biol. Chem.* **240**, PC 4545 (1965).
51. Mechanic G. L., Levy M., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1889 (1959).
52. Miller E. J., Martin G. R., Piez K. A., Powers H., *J. Biol. Chem.* **242**, 5481 (1967).

53. Nimi M., *J. Biol. Chem.* **243**, 1457 (1968).
54. Page R. C., Benditt E. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **124**, 454 (1967).
55. Page R. C., Benditt E. P., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **124**, 459 (1967).
56. Page R. C., Benditt E. P., Kirkwood C. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**, 752 (1968).
57. Paz M. A., Henson E., Rombauer R., Abrash L., *Biochemistry* **9**, 2123 (1970).
58. Paz M. A., Lent R. W., Faris B., Franzblau C., Blumenfeld O. O., Gallop P. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **34**, 221 (1969).
59. Piez K. A., *Ann. Rev. Biochem.* **37**, 547 (1968).
60. Pinnel S. R., Martin G. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **61**, 708 (1968).
61. Pinnel S. R., Martin G. M., Gee S., *Federation Proc.* **27**, 588 (1968).
62. Rojkind M., Blumenfeld O. O., Gallop P. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 320 (1964).
63. Rojkind M., Blumenfeld O. O., Gallop P. M., *J. Biol. Chem.* **241**, 1530 (1966).
64. Rojkind M., Gutierrez A. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **131**, 116 (1969).
65. Rojkind M., Gutierrez A. M., Zeichner M., Lent R. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 350 (1969).
66. Rojkind M., Rhi L., Aguirre M., *J. Biol. Chem.* **243**, 2266 (1968).
67. Salcedo L. L., Faris B., Franzblau C., *Biochim. Biophys. Acta* **188**, 324 (1969).
68. Schlueter R. J., Veis R., *Biochemistry* **3**, 1657 (1964).
69. Schneider A., Henson E., Blumenfeld O. O., Gallop P. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **27**, 546 (1967).
70. Shoshan S., Finkelstein S., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 261 (1968).
71. Siegel R. C., Martin G. R., *J. Biol. Chem.* **245**, 1653 (1970).
72. Skonieczna M., Sopata J., Wize J., Wojtecka-Łukasik E., *Post. Biochem.* **14**, 85 (1968).
73. Steven F. S., Jackson D. S., Broady K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **188**, 334 (1969).
74. Tanzer M. L., *Biochim. Biophys. Acta* **133**, 584 (1967).
75. Tanzer M. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 4045 (1968).
76. Tanzer M. L., Mechanic G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **32**, 885 (1968).
77. Urivetzky M., Lendvai S., Wiener S., Meilman E., *Biochim. Biophys. Acta* **181**, 208 (1969).
78. Veis A., Ansey J., *J. Biol. Chem.* **240**, 3899 (1965).
79. Veis A., Schlueter R. J., *Nature* **197**, 1204 (1963).
80. Veis A., Schlueter R. J., *Biochemistry* **3**, 1650 (1964).

EWA JOANNA SIKORSKA *

Procesy związane z powstawaniem przeciwciał

Mechanisms of Antibody Synthesis

Recent advances in the studies on the mechanism of antibody synthesis are reviewed and discussed.

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań nad procesami immunologicznymi w organizmach. Odkrycie kodu genetycznego zmusiło do zrewidowania starych poglądów na syntezę przeciwciał. W wielu ośrodkach rozpoczęto wielostronne badania tego zjawiska w oparciu o aktualne poglądy na biosyntezę białka. Badania te dotyczyły zarówno bezpośredniej syntezy cząsteczki immunoglobuliny, jak i mechanizmu działania antygeny. Wykryto istnienie immunogennych kompleksów RNA z antygenem i usiłowano podać hipotezy przedstawiające możliwie prawdziwie cały proces wytwarzania przeciwciał. W niniejszym artykule będą przedstawione wyniki niektórych z tych doświadczeń.

I. Działanie antygeny

Zwykle po zetknięciu się z antygenem w ustroju powstaje szereg zjawisk, między innymi wytwarzają się przeciwciała skierowane przeciw podanemu antygenowi. Wartościami krytycznymi są wielkość dawki i forma chemiczna antygeny. Jak wiadomo, antygenami mogą być białka, wielocukry i kompleksy białek z innymi związkami, a nasilenie i rodzaj odpowiedzi immunologicznej zależą od dawki i sposobu podania antygeny (1, 4, 34, 60, 71).

Po zetknięciu się z antygenem powstają zmiany w subcellularnej strukturze komórki wytwarzającej przeciwciała (25). Wiele z tych zmian następuje w ciągu godzin lub dni. Ogólnie uważa się, że indukcyjna faza trwa tydzień, choć przy dużej wrażliwości organizmu może być znacznie zredukowana (71). Zmiany te obejmują zwiększenie szybkości syntezy RNA, DNA i białka (23, 51, 52). Pojawia się nowy rodzaj RNA, wykrywalny metodą hybrydyzacji z DNA (17). Wzrasta specyficzna aktywność

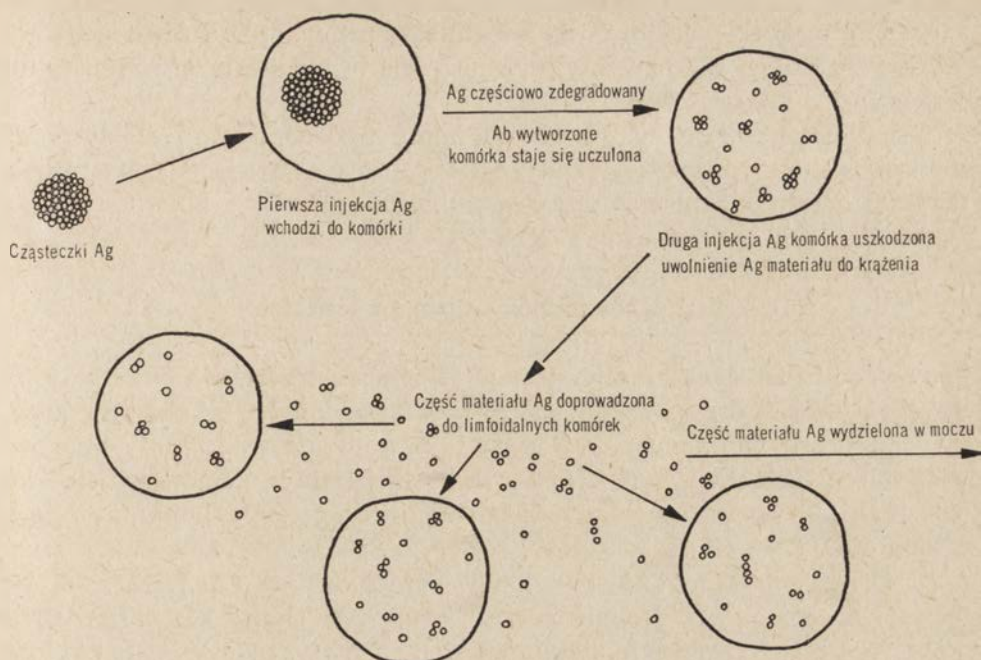
* Dr, Zakład Biochemii i Immunologii, Instytut Gruźlicy, Warszawa

enzymów metabolizmu nukleotydowego (45), a także ilość i wielkość polirybosomów (58). Następnie pojawiają się przeciwciała (19, 72). Na przykład, po dootrzewnowym podaniu myszom erytrocytów owczych jako antygenu stwierdzono w śledzionie pięćsetkrotny wzrost ilości komórek tworzących przeciwciała, czemu towarzyszyło zwiększenie aktywności kinazy tymidynowej i urydynowej oraz przyspieszenie syntezy RNA już w ciągu 2 godzin po iniekcji. Badania izotopowe z urydyną i tymidyną, znakowanymi trytem, wykazały, że wzrost syntezy RNA wyprzedza wzrost syntezy DNA (61). Komórki z płynu otrzewnowego myszy reagowały podobnie do komórek ze śledziony (12).

Szczegółowe badania nad losem antygeny w ustroju prowadzili G a r v e y i wsp. (14, 36, 37, 38, 39, 40, 65). Wyniki tych badań obrazuje schemat 1. Podając dożylnie hemocyjaninę jako antygen stwierdzono, że po pierwszym wstrzyknięciu w wątrobie królika pozostaje niewielka ilość materiału antygenowego, która stopniowo maleje z upływem czasu (16). Badania ilościowe wykazały, że retencja materiału antygenowego w wątrobie jest odwrotnie proporcjonalna do wewnątrzkomórkowej aktywności wytwarzania przeciwciał (38). Kiedy antygen wprowadzono po raz drugi do ustroju, zjawiska przebiegały szybciej (40). Już po kilku godzinach antygen znikał z wątroby, a równocześnie pojawiały się cytoplazmatyczne zmiany w jej komórkach parenchymatycznych. Komórki uszkodzone wskutek kontaktu z antygenem z drugiej iniekcji uwalniały zawarty w nich antygen, który dostawał się do układu krążeniowego, wchodził do innych tkanek zdolnych do tworzenia przeciwciał i częściowo był wydalany z moczem.

R o s z m a n i S t a v i t s k y (64) badali pierwotną i wtórną odpowiedź na podanie antygeny. Następnego dnia po wstrzyknięciu królikom hemocyjaniny wyisobniali komórki węzłów limfatycznych. Komórki te poddawane inkubacji z antygenami znakowanymi ^{14}C syntetyzowały radioaktywne przeciwciała typu IgM i IgG. Ogólna synteza białka była w nich 2—3 razy większa w porównaniu z syntezą w komórkach z węzłów limfatycznych zwierząt nieimmunizowanych. Badania prowadzone z aktynowymocyną D wykazały, że synteza przeciwciał jest mniej wrażliwa na działanie tego inhibitora niż synteza innych białek. Wpływ aktynowymocyny zależał od czasu działania. Po 8 godzinach następowało częściowe zahamowanie syntezy DNA, całkowite — RNA, a synteza przeciwciał przebiegała normalnie. Po 15 godzinach synteza DNA była zahamowana całkowicie, RNA częściowo, a syntezy przeciwciał nie było w ogóle. Podobne zjawiska zaobserwowali autorzy przy użyciu 5-bromourydyny jako inhibitora. Z danych tych można wnosić, że przynajmniej przez 8 godzin wystarcza mRNA do syntezy przeciwciał, potem jest konieczne wznowienie syntezy RNA i DNA.

Badania mające na celu znalezienie antygeny w komórkach syntetyzujących przeciwciała nie dały rezultatu nawet przy użyciu bardzo czu-



Schemat 1. Losy antygeny w ustroju wg (35a)

Ag — antygen, Ab — przeciwciało

łych metod (59). Świadczyłyby to, że albo stężenie antygeny jest bardzo małe, albo antygeny w pierwotnej formie w ogóle nie ma. Jeżeli jednak przyjąć, że antygen wzmacnia syntezę mRNA, bądź reaktywuje go z nieaktywnej formy i że pewna ilość tego mRNA jest stabilna przez jakiś czas (54, 70), to synteza przeciwciał mogłaby mieć miejsce przez ten właśnie czas nawet w nieobecności antygeny. Natomiast z chwilą degradacji mRNA ustałaby całkowicie i nowe porcje antygeny byłyby wymagane do indukcji.

Przy badaniu wtórnej odpowiedzi organizmu na antygen Roszman i Stavitky (64) izolowali z królików komórki węzłów limfatycznych w różnym czasie po iniekcji i poddawali je inkubacji ze znakowanymi ^{14}C aminokwasami. Badania wykazały, że pierwsze znakowane przeciwciała pojawiają się drugiego dnia po iniekcji, maksimum syntezy ma miejsce czwartego dnia, a potem następuje spadek. Autorzy uważają, że różnica w odpowiedzi pierwotnej i wtórnej jest natury ilościowej, a nie jakościowej.

Jeżeli chodzi o szybkość odpowiedzi na antygen i zakres tworzenia przeciwciał, to sugeruje się, że mogą one zależeć od ilości uprzednio istniejących w populacji komórek zawierających specjalne receptory dla poszczególnych antygenów. Uważa się też, że są oddzielne, zróżnicowane linie komórkowe do syntezy przeciwciał IgM i IgG, istnienie ewentualnego wspólnego prekursora tych linii nie zostało stwierdzone (75).

Synteza przeciwciał *in vitro* trwa dłużej niż *in vivo*. Prawdopodobnie pewne regulujące mechanizmy, które istnieją *in vivo* są *in vitro* nieczynne lub czynne tylko częściowo (55, 62).

Zmniejszenie syntezy przeciwciał może być odniesione do dyspersji polirybosomów na skutek utraty mRNA lub interferencji z wiązaniem rybosomów do endoplazmatycznego retikulum (8).

II. RNA w biosyntezie przeciwciał

Liczne badania nad mechanizmem tworzenia przeciwciał wykazały, że preparaty RNA otrzymane z makrofagów, poddanych inkubacji z antygenami, mają immunogenne własności, powodują powstawanie przeciwciał wobec tych antygenów (3, 26, 27). Przeciwciała w komórkach śledziony powstają już po 10 minutach od momentu dodania immunogennych preparatów RNA (46).

Fishman, Gottlieb i ich współpracownicy (2, 26, 27, 28, 29; 30, 41) próbowali wyodrębnić immunogenną frakcję RNA z całego RNA komórek makrofagowych inkubowanych z antygenami. Gottlieb i wsp. (41) zastosowali do rozdziału RNA metodę wirowania w gradiencie siarczanu cezu. Otrzymali oni dwie frakcje cięższą i lżejszą. Własności immunogenne wykazywała głównie lżejsza frakcja, która stanowiła zaledwie 5% całkowitego RNA. Po jej oczyszczeniu metodą chromatograficzną stwierdzono, że zawiera ona 28% białka. Istnienie podobnej frakcji RNA ze związanym białkiem wykazano także w makrofagach nie inkubowanych z antygenami. Dalsze badania (40a) pozwoliły stwierdzić, że RNA takiego typu występuje jedynie w makrofagach i makrofagopodobnych komórkach, jak na przykład komórki Kupfera w wątrobie. Autor sugeruje, że białko związane z RNA z nieinkubowanych z antygenami makrofagów mogło powstać wskutek uprzednich zetknięć w cyklu życiowym tych komórek z nieznanymi antygenami. Byłoby to zgodne z hipotezą o przechowywaniu w makrofagach immunologicznej informacji. Związek tego białka z antygenem potwierdziły badania izotopowe. Gdy do mieszaniny inkubacyjnej dodano jako antygenu znakowane ^{125}J białko z faga *E. coli* T₂, powstała frakcja RNA związana z radioaktywnym białkiem.

Badanie składu nukleotydowego immunogennej frakcji RNA wykazało, że zawiera ona więcej CMP i GMP w porównaniu z cięższą, większą frakcją i całkowitym makrofagowym RNA (tablica 1).

Według Gottlieba i wsp. (40a) własności immunogenne lżejszej frakcji były niszczone przez pronazę, natomiast rybonukleazy A i T₁, a także alkalia miały słabsze działanie, przy czym skuteczne stężenia RN-az były dużo większe niż pronazy. Próby przeprowadzenia cięższej frakcji makrofagowego RNA w lżejszą za pomocą trawienia nukleazami (rybonukleazą A i T₁) nie dały rezultatu.

Tablica 1

Skład zasad makrofagowego RNA i jego oczyszczonych frakcji

Frakcja	% molowy			
	CMP	AMP	GMP	UMP
Lżejsza	26,1	20,8	32,5	20,6
Cieęższa	24,2	27,8	28,2	20,6
Całkowity makrofagowy RNA	22,6	24,6	30,0	23,0

Makrofagowy ³²P-RNA rozdzielano przez dwukrotne ultrawierowanie w gradiencie Cs₂SO₄, a następnie chromatografię na TEAE-celulozie w 7,5M moczniku. Próbki frakcji w 0,33M NaCl hydrolizowano w 0,3M KOH przez 24 godziny. Zasady rozdzielano drogą elektroforezy bibulowej a ich radioaktywność po elucji z elektroferogramu mierzono w roztworze *Breys-Cabosil*.

Dodanie aktynomycyny D do inkubowanych z antygenami makrofagów całkowicie hamowało powstawanie immunogennej frakcji.

Cohen i wsp. (18) wykazali, że immunogenna frakcja RNA sedimentuje w gradiencie sacharozy w zakresie 8—12S.

Fishman i wsp. (27, 29, 30) badając RNA pochodzący z makrofagów inkubowanych z antygenami wyizolowali za pomocą metod chromatograficznych dwie odmienne, immunogenne frakcje. Jedna z nich nie zawierała antygeny i nie powstawała w obecności aktynomycyny D w środowisku inkubacyjnym. Druga frakcja była skompleksowana z antygenem. W komórkach węzłów chłonnych po dodaniu pierwszej frakcji powstawały przeciwciała 19S, dodatek drugiej inicjował tworzenie przeciwciał 7S. Jeżeli użyto jako antygeny faga *E. coli* T₂ i otrzymane preparaty makrofagowego RNA poddano działaniu surowicy anty T₂ otrzymywano osad. Supernatant znad tego osadu miał własności tworzenia wyłącznie przeciwciał 19S, a wyekstrahowany z osadu RNA mógł inicjować jedynie tworzenie przeciwciał 7S.

Inkubacja makrofagów z dwoma różnymi antygenami (fag *E. coli* T₂ i *B. subtilis* SP 32) prowadziła do powstania immunogennych frakcji RNA, które miały zdolność wywoływania w komórkach węzłów chłonnych syntezy specyficznych przeciwciał 7S i 19S wobec każdego z tych antygenów (31).

Obecność immunogennego, skompleksowanego z antygenem RNA stwierdzono w makrofagach, komórkach węzłów limfatycznych, śledziony (35) i wątroby (37).

Próbowano także zbadać, czy pod wpływem różnych antygenów powstają w komórkach limfoidalnych odmienne rodzaje RNA. W badaniach prowadzonych *in vivo* i *in vitro* użyto jako antygenów erytrocytów owczych, kurzych i króliczych oraz *E. coli* i γ -globulinę ludzką. Stosując metody hybrydyzacji DNA-RNA i znakowania izotopami wykazano, że te antygeny wywołują powstawanie nowych, różnych rodzajów RNA (20). Obecność takich RNA w komórkach (makrofagi i limfocyty) płynu jamy

otrzewnowej poddanych działaniu różnych antygenów wykazały również badania Cohen'a (21). Podczas inkubacji tych komórek z substancjami nieimmunogennymi, na przykład z syntetyczną DNP₁₅-polilizyną, nie powstawał nowy rodzaj RNA. Szybkość syntezy nowych rodzajów RNA okazała się większa od szybkości syntezy całego pozostałego RNA komórki (przenoszący, rybosomalny i informacyjny dla innych białek niż przeciwciała).

Próbowano także wyodrębnić z samych limfocytów informacyjne RNA specyficzne dla różnych przeciwciał (21). Jako antygen zastosowano erytrocyty owcze i kurze, a powstające kwasy nukleinowe, znakowane podwójnie ³H- i ¹⁴C-urydyną (47), rozdzielano za pomocą chromatografii na metylowanej albuminie (48, 56). Wykazano, że w odpowiedzi na poszczególne antygeny powstają specyficzne mRNA.

III. Biosynteza przeciwciał

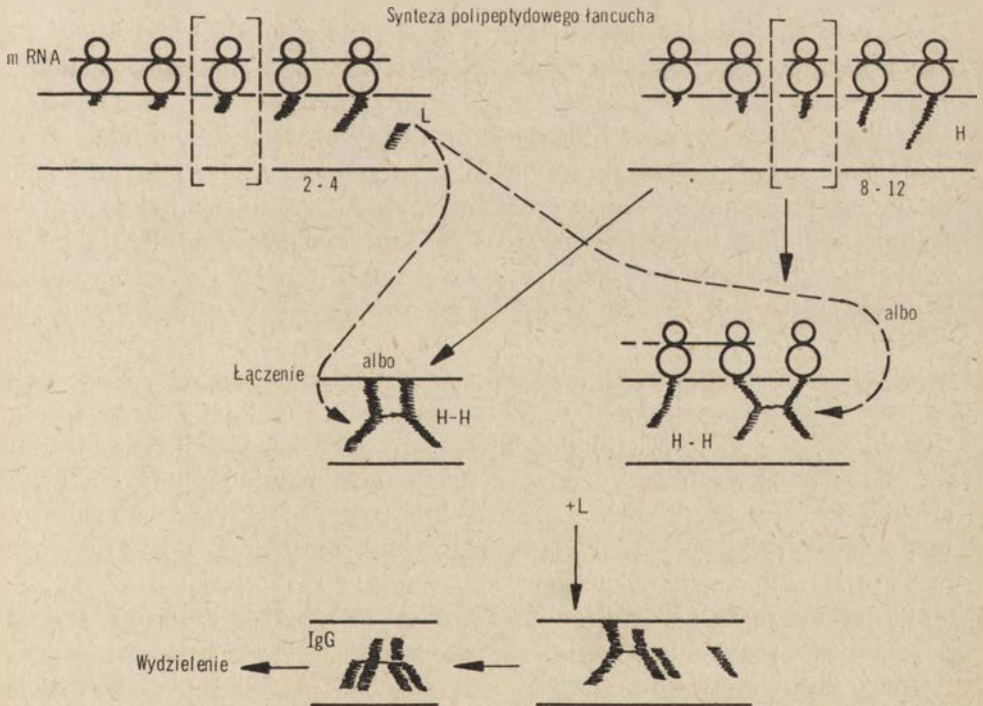
Biosynteza przeciwciał przebiega takimi samymi drogami jak biosynteza innych białek (9, 68), a więc z udziałem procesów transkrypcji i translacji. W komórce wytwarzającej przeciwciała około 30—50% ogólnej ilości syntetyzowanego białka stanowią immunoglobuliny. Stwierdzono, że informacja określająca specyficzność przeciwciał zawarta jest w DNA komórek syntetyzujących przeciwciała (11, 15, 22, 24, 49, 69). Nie wiadomo jednak, czy każdy klon komórek tworzących przeciwciała ma różny DNA kodujący, czy też DNA we wszystkich klonach jest taki sam, a tylko różne jego części ulegają derepresji (20, 43).

Znany inhibitor biosyntezy białka na poziomie transkrypcji DNA, aktynomycyna D, hamuje tworzenie przeciwciał zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* (68, 74). Dostarczenie zahamowanemu aktynomycyną układowi nowego mRNA wznawia biosyntezę (73).

Jak wiadomo miejscem syntezy białka w komórkach są polirybosomy, na których układają się mRNA. Rozmiar polirybosomów jest zwykle proporcjonalny do długości mRNA. Badania wykazały, że łańcuchy lekkie (L) i ciężkie (H) są tworzone na różnych polirybosomach (6, 7, 50, 57, 76). Polirybosomy te rozdzielono w gradiencie sacharozy, zagęszczono przez odwirowanie i wyizolowano powstające na nich łańcuchy polipeptydowe. Okazało się, że łańcuchy L są tworzone na mniejszych polirybosomach 190S. Czas powstawania łańcucha L wynosi średnio 30 sekund (66, 67). Łańcuchy L są autonomicznie uwalniane z miejsc syntezy do małej puli wolnych łańcuchów L (6). Synteza łańcuchów L i H jest zrównoważona (77) i nie ma netto nadmiaru syntezy lub wydzielania łańcuchów L (5, 6). Łańcuchy H powstają na większych polirybosomach 270S. Czas powstawania jest dłuższy, sięga on 75 sekund. Są dwie różne sugestie dotyczące sposobu łączenia się łańcuchów w cząsteczkę γ -globuliny. Według jednej

połączenie następuje na większych polirybosomach, na których łańcuchy L przyczepiają się do powstających łańcuchów H. Kompleks L-H, jak podaje Scharff (66), jest prekursorem czterołańcuchowej cząsteczki immunoglobuliny. Molekularny skład agregatów L-H uwolnionych z 270S polirybosomów nie został jednak jeszcze ustalony. Askonas i Williamson (4, 5, 6) proponują inną koncepcję, według której najpierw ulegają dimeryzacji dwa powstające łańcuchy H (schemat 2). Następuje polirybosomalna interakcja i wytworzenie mostka siarczkowego. Nie wiadomo czy przyłączenie łańcucha L poprzedza uwolnienie dimeru H-H czy mu towarzyszy. W pierwszym przypadku przyłączenie łańcucha L mogłoby warunkować uwolnienie łańcuchów H. W drugim wypadku dimer H-H mógłby przez krótki okres czasu istnieć samodzielnie. Jak dotąd nie wykryto jednak wolnych łańcuchów H podczas gdy wolne łańcuchy L wykrywano w niektórych stanach patologicznych (4, 5, 67).

Badania nad mRNA dla obu typów łańcuchów wykazały, że stała sedymentacji mRNA dla łańcucha L wynosi 9S—11S, a bardziej heterogenicznego mRNA dla łańcucha H — ponad 14S. Można obliczyć (44), że mRNA wyizolowany z frakcji 190S polirybosomów koduje łańcuch o ciężarze cząsteczkowym około 25 000. Jak wykazali Lennox i wsp. (50) wynik ten jest zgodny z translacją łańcucha L z jednego punktu startowego.



Schemat 2. Biosynteza cząsteczki immunoglobuliny-G wg (78)

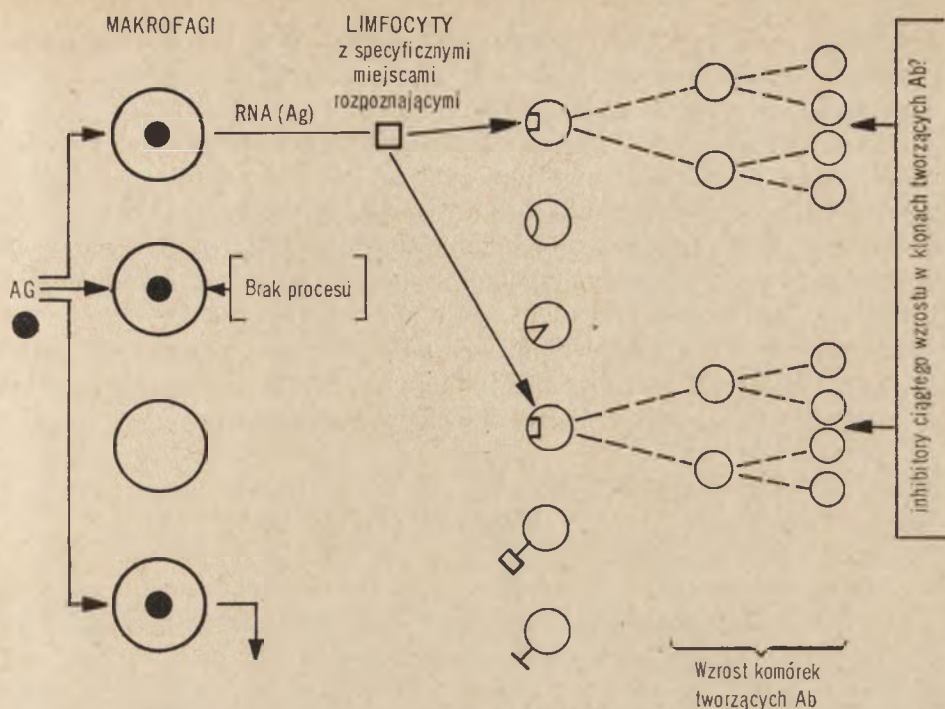
Schemat opracowano na podstawie doświadczeń z komórkami nowotworowymi myszy (5563 plasmacytoma)

Czas półtrwania informacyjnych RNA kodujących łańcuchy cząsteczki immunoglobuliny jest stosunkowo długi w porównaniu z innymi mRNA w komórce.

Ostatnim etapem budowy cząsteczki immunoglobuliny jest dołączenie reszty węglowodanowej. Pierwszą przyłączoną resztą cukrową jest glukozamina. Wiąże się ona z łańcuchami białka zanim jeszcze zostaną one uwolnione z polirybosomów (53). Dalsze heksozy, mannoza i galaktoza, przyłączane są już po skompletowaniu i uwolnieniu polipeptydowych łańcuchów z polirybosomów (57). Przyłączanie heksoz jest katalizowane przez odpowiednie enzymy działające niezależnie od procesu biosyntezy białka. Cząsteczki heksoz mogą przyłączać się aż do momentu wydzielenia cząsteczki białka z komórki (57). Oznaczając procent cukrów w glikoproteinach, a w tym i w immunoglobulinach (53), stwierdzono, że jest on wyższy w białkach wydzielonych z komórek niż w wewnątrzkomórkowych. Nasuwa to przypuszczenie, że skompletowanie reszty węglowodanowej jest wewnątrzkomórkowym sygnałem do wydzielenia cząsteczki białka przez błonę komórkową.

IV. Mechanizm tworzenia przeciwciał

Różne hipotezy wysunięte na podstawie dotychczas uzyskanych danych próbują możliwie dokładnie przedstawić mechanizm powstawania przeciwciał. Braun (10) zakłada działanie dwukomórkowego systemu złożonego z makrofaga i limfocytu (schemat 3). Pierwszym etapem po zetknięciu antygeny z makrofagem jest przemiana materiału antygenowego i przyłączenie produktu do RNA. Efektem tych reakcji jest wytworzenie immunogenego kompleksu RNA-antygen. W kompleksie determinanta antygenowa warunkuje specyficzność, a RNA jest niespecyficznym aktywatorem. Determinanta antygenowa pełni według Brauna rolę pilota wprowadzającego aktywator do właściwego klonu komórek immunologicznie kompetentnych, do odpowiednich limfocytów. Różnorodne klony komórek powstają w organizmie już w okresie życia płodowego i według teorii klonów (13) ilość ich jest wystarczająca dla rozpoznania wszelkich możliwych antygenów, z którymi w późniejszym życiu ustrój mógłby się spotkać. W skład każdego klonu wchodzi komórki zdolne do rozpoznania tylko jednego właściwego sobie antygeny. Rozpoznanie to następuje na błonach, gdzie są jakby miejsca rozpoznające (32, 42, 63) (ang. *antibody-like recognition site*), z którymi reaguje determinanta odpowiedniego antygeny. Wynikiem tej reakcji jest wnikięcie niespecyficznego aktywatora do komórki i rozpoczęcie wszystkich procesów związanych z syntezą przeciwciał oraz intensywne namnażanie właściwych komórek. Wniknięcie immunogenego kompleksu RNA-antygen do niewłaściwych komórek jest w normalnych warunkach zupełnie niemożliwe.



Schemat 3. Hipotetyczny przebieg tworzenia przeciwciał wg (10)
 Ag — antygen Ab — przeciwciało

Założenie, że w immunogennym kompleksie RNA jest jedynie niespecyficznym aktywatorem nasuwa przypuszczenie, że w przypadku zmienionej przepuszczalności błony komórkowej nie wykluczone jest wejście tego RNA do nieodpowiednich komórek i zapoczątkowanie syntezy niewłaściwych przeciwciał. Ewentualność tę potwierdzono doświadczalnie. Na komórki śledziony działano związkami zmieniającymi przepuszczalność błony (chloropromazyna, epinefryna), a następnie wprowadzano erythrocyty owcze jako antygen. Zaobserwowano wśród wytworzonych przeciwciał także takie, które były skierowane przeciw innym antygenom niż podane.

Schemat Brauna pozwala wytłumaczyć kilka znanych zjawisk immunologicznych, a mianowicie brak tworzenia przeciwciał u nowonarodzonych osobników (33), paraliż immunologiczny oraz zanik zdolności do syntezy przeciwciał po naświetleniu promieniami X. Zgodnie z założeniami omawianego schematu synteza przeciwciał może się rozpocząć tylko w przypadku istnienia w ustroju zdolnych do przerobienia antygeny makrofagów i kompetentnych limfocytów, mających odpowiednie miejsca rozpoznające wytworzony przez makrofagi immunogeny kompleks RNA-antygen.

U nowonarodzonych osobników istnieją wprawdzie właściwe klony komórek immunologicznie kompetentnych, ale nie ma jeszcze dojrzałych makrofagów, które byłyby zdolne do przetworzenia podanego antygeny.

Jeżeli ten brak wyrównać podaniem noworodkom antygenu wraz z makrofagami z dorosłych osobników następuje, jak wykazano doświadczalnie, zapoczątkowanie syntezy przeciwciał.

Paraliż immunologiczny, który jak wiadomo można wywołać podaniem nadmiaru antygeny, można by tłumaczyć zablokowaniem miejsc receptorowych na limfocytach przez wolne antygeny. W tej sytuacji wytwarzane przez makrofagi immunogenne kompleksy RNA-antygen miałyby zamknięte wejście do właściwych komórek immunologicznie kompetentnych i mogłyby jedynie współzawodniczyć o nie z wolnymi antygenami.

Po naświetlaniu promieniami X następuje porażenie makrofagów, w tych warunkach wytworzenie immunogenego kompleksu nie byłoby możliwe i to tłumaczyłoby brak odpowiedzi immunologicznej.

V. Uwagi końcowe

Szereg danych świadczy o istnieniu immunogenego kompleksu RNA-antygen. Jednak zarówno sam kompleks, jak i zjawiska towarzyszące jego powstaniu wymagają jeszcze wielu badań. Nie są znane ani enzymy zaangażowane w tym procesie, ani sposób rozpoznania antygeny przez makrofag. O budowie kompleksu też niewiele wiadomo. Konieczne jest znalezienie sekwencji nukleotydowej RNA oraz ustalenie miejsca, względnie miejsc, do których przyłączany jest antygen. Wymaga także zbadania, jakie wiązanie wytwarza się między RNA a antygenem i czy zależy ono od rodzaju antygeny. Następnie bardzo istotne jest wykazanie jak to się dzieje, że mimo trawienia w makrofażu, antygen zachowuje swoją charakterystyczną strukturę. Dyskusyjne jest nadal czy każdy antygen musi ulec przetworzeniu w makrofażu, czy też ta droga dotyczy jedynie dużych, nierozpuszczalnych antygenów. One bowiem głównie były stosowane w omówionych poprzednio doświadczeniach Gottlieba i Fishmana (30, 41).

Inni badacze, jak na przykład Gravey (35b), uważają, że rola makrofagów wobec rozpuszczalnych antygenów może być przypadkowa, ponieważ są także dane, które przemawiają za tym, że te antygeny mają pierwszy i drugi kontakt od razu z komórkami limfoidalnymi.

Można spodziewać się, że w najbliższej przyszłości wiele z tych jeszcze niewyjaśnionych zagadnień znajdzie wytłumaczenie na podstawie nowych danych doświadczalnych.

LITERATURA

1. Ada G. L., Parish C. R., Nossal G. J. V., Abbot A., *Cold Spring Harbor Symp.* **32**, 381 (1967).
2. Adler F. L., Fishman M., Dray S., *J. Immunol.* **97**, 554 (1966).
3. Askonas B. A., Rhodes J. M., *Nature* **205**, 470 (1965).

4. Askonas B. A., Williamson A. R., *Nature* **211**, 369 (1966).
5. Askonas B. A., Williamson A. R., *Nature* **216**, 264 (1967).
6. Askonas B. A., Williamson A. R., *Cold Spring Harbor Symp.* **32**, 223 (1967).
7. Bagdasarian M., Bagdasarian M. M., Borecka D., *Acta Biochim. Polon.* **16**, 45 (1969).
8. Blobel G., Potter V. R., *J. Mol. Biol.* **26**, 293 (1967).
9. Braun W., w *Molecular and Cellular Basis of Antibody Formation*, Academic Press, New York 1965, str. 525.
10. Braun W., w *Nucleic Acids in Immunology*, red. O. J. Plescia i W. Braun, Springer Verlag, New York 1968, str. 535.
11. Brenner S., Milstein C., *Nature* **211**, 242 (1966).
12. Bussard A. E., Lurie M., *J. Exptl. Med.* **125**, 873 (1967).
13. Burnet M., *The Clonal Selection Theory of Aquired Immunity*, Nashville Vanderbilt University Press 1959.
14. Campbell D. H., Garvey J. S., *Lab. Investigation* **10**, 1126 (1961).
15. Cioli D., Baglioni C., *J. Mol. Biol.* **15**, 385 (1966).
16. Cohen E. P., *Nature* **213**, 462 (1967).
17. Cohen E. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 673 (1967).
18. Cohen E. P., Newcomb R. W., Crosby L. K., *J. Immunol.* **95**, 583 (1965).
19. Cohen E. P., Parks J. J., *Science* **144**, 1012 (1964).
20. Cohen E. P., Raska K., *Cold Spring Harbor Symp.* **32**, 349 (1967).
21. Cohen E. P., Raska K., w *Nucleic Acids in Immunology* red. O. J. Plescia i W. Braun, Springer Verlag, New York 1968, str. 583.
22. Dreyer W. J., Bennet J. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 864 (1965).
23. Dutton R. W., Mishell R. J., *J. Exptl. Med.* **126**, 443 (1967).
24. Edelman G. M., Gally J. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 353 (1967).
25. Feldman D. J., *Advan. Immunol.* **4**, 175 (1964).
26. Fishman M., *Nature* **183**, 1200 (1959).
27. Fishman M., *J. Exptl. Med.* **114**, 837 (1961).
28. Fishman M., Adler F. L., *J. Exptl. Med.* **117**, 595 (1963).
29. Fishman M., Adler F. L., w *Immunity, Cancer, Chemotherapy*, Academic Press, New York 1967, tom I, str. 177.
30. Fishman M., Adler F. L., *Cold Spring Harbor Symp.* **32**, 343 (1967).
31. Fishman M., Adler F. L., Holub M., w *Nucleic Acids in Immunology* red. O. J. Plescia i W. Braun, Springer Verlag, New York 1968, str. 442.
32. Foerster J., Lamelin J. P., Green I., Benacerraf B., *J. Exptl. Med.* **129**, 295 (1969).
33. Friedman H., *J. Immunol.* **89**, 257 (1962).
34. Friedman H., Gaby W. L., *J. Immunol.* **84**, 441 (1960).
35. Friedman H., Stavitsky A. B., Solomon J. M., *Science* **149**, 1106 (1965).
- 35a, b. Garvey J. S., w *Nucleic Acids in Immunology*, red. O. J. Plescia i W. Braun, Springer Verlag, New York 1968, str. 494, 540.
36. Garvey J. S., Campbell D. H., *J. Immunol.* **76**, 36 (1956).
37. Garvey J. S., Campbell D. H., *J. Exptl. Med.* **105**, 361 (1957).
38. Garvey J. S., Campbell D. H., *J. Exptl. Med.* **107**, 497 (1958).
39. Garvey J. S., Campbell D. H., *Nature* **209**, 1201 (1966).
40. Garvey J. S., Campbell D. H., Das D. M., *J. Exptl. Med.* **125**, 111 (1967).
- 40a. Gottlieb A. A., w *Nucleic Acids in Immunology*, red. O. J. Plescia i W. Braun, Springer Verlag, New York 1968, str. 475.

41. Gottlieb A. A., Glisin V. R., Doty P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1849 (1967).
42. Granger G. A., Schacks J. S., Williams T. W., Kolb W. P., *Nature* **221**, 1155 (1969).
43. Greenberg L. J., Uhr J. W., *Cold Spring Harbor Symp.* **32**, 243 (1967).
44. Hall B. D., Doty P., w *Microsomal Particles and Protein Synthesis*, Pergamon Press, Londyn 1958, str. 27.
45. Handmaker S. D., Great J. W., *Biochim. Biophys. Acta* **199**, 95 (1970).
46. Jacherts D., Noltenius H., *Z. Med. Mikrobiol. Immunol.* **152**, 112 (1966).
47. Kano-Sueoka T., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1942 (1962).
48. Kubiński H., Koch G., Dress O., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 332 (1962).
49. Lederberg J., *Science* **129**, 1649 (1959).
50. Lennox E. S., Knopf P. M., Munro A. J., Parkhouse R. M. E., *Cold Spring Harbor Symp.* **32**, 249 (1967).
51. Mach B., Vassali P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 975 (1965).
52. Mach B., Vassali P., *Science* **150**, 622 (1965).
53. Melchers F., Knopf P. M., *Cold Spring Harbor Symp.* **32**, 255 (1967).
54. Miller J. J., *J. Immunol.* **92**, 673 (1964).
55. Mishell R. I., Dutton R. W., *J. Exptl. Med.* **126**, 423 (1967).
56. Monier R., Naono S., Hayes D., Hayes F., Gross F., *J. Mol. Biol.* **5**, 311 (1962).
57. Moroz C., Uhr J. W., *Cold Spring Harbor Symp.* **32**, 263 (1967).
58. Norton W. L., Levis D., Ziff M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 851 (1965).
59. Nossal G. J. V., Ada G. L., Austin C. M., *J. Exptl. Med.* **121**, 945 (1965).
60. Nossal G. J. V., Shortman K. D., Miller A. P., Mitchell G. F., Haskill S., *Cold Spring Harbor Symp.* **32**, 369 (1967).
61. Ortiz-Ortiz L., Jaroslaw B. N., *Nature* **221**, 1153 (1969).
62. Ortiz-Muniz G., Sigel M. M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **124**, 1178 (1967).
63. Paul W. E., Siskind G. W., Benacerraf B., *J. Exptl. Med.* **127**, 25 (1968).
64. Roszman T., Stavitsky A. B., w *Nucleic Acids in Immunology* red. O. J. Plescia i W. Braun, Springer Verlag, New York 1968, str. 448.
65. Saha A., Garvey J. S., Campbell D. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 179 (1966).
66. Scharff M. D., Shapiro A. L., Ginsberg B., *Cold Spring Harbor Symp.* **32**, 235 (1967).
67. Shapiro A. L., Scharff M. D., Maizel J. V., Uhr J. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 216 (1966).
68. Smiley J. D., Heard J. G., Ziff M., *J. Exptl. Med.* **119**, 881 (1964).
69. Smithies O., *Nature* **199**, 1231 (1963).
70. Stavitsky A. B., Gusdon J. P., *Bacteriol. Rev.* **30**, 418 (1966).
71. Stavitsky A. B., *Advan. Immunol.* **1**, 211 (1961).
72. Svehag S. E., Mandel B., *J. Exptl. Med.* **119**, 1 (1964).
73. Tawde S., Scharff M. D., Uhr J. W., *J. Immunol.* **96**, 1 (1966).
74. Uhr J. W., *Science* **142**, 1476 (1963).
75. Wei M. M., Stavitsky A. B., *Immunology* **12**, 431 (1967).
76. Williamson A. R., Askonas B. A., *J. Mol. Biol.* **23**, 201 (1967).
77. Williamson A. R., Askonas B. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 401 (1968).
78. Williamson A. R., Askonas B. A., w *Nucleic Acids in Immunology*, red. O. J. Plescia i W. Braun, Springer Verlag, New York 1968, str. 591.

TOMASZ GOŁASZEWSKI *, JAN W. SZARKOWSKI **

Uorganizowanie strukturalno-metaboliczne jądra komórkowego

Structural and Metabolic Organization of the Cell Nucleus

Numerous biochemical and cytochemical data indicating that substructural elements of the cell nucleus (nucleolus, extranucleolar chromatin, nuclear sap and perinuclear space) constitute the separate and interdependent metabolic compartments, are reviewed. Discussion is focused on the fact that metabolic activities of the cell nucleus are correlated with appearance of the compartments in the interphase nucleus. Nucleus compartmentation can be regarded as a form of higher organization of biological systems, acquired during evolution by eukaryotic organisms.

Jądro, nadrzędna organella komórkowa, charakteryzuje się przewagą procesów anabolicznych nad przemianami katabolicznymi. Jest ono siedliskiem podstawowej puli kwasu dezoksyrybonukleinowego w komórce, a zatem najistotniejszej części jej genomu. Chloroplasty i mitochondria, choć wykazują pewien zakres autonomii metabolicznej, również podlegają kontroli jądra (31, 32, 102).

Jądro, podobnie jak inne organelle, można uważać za *sui generis* przedział (kompartament) metaboliczny komórki. Nie jest ono jednak przedziałem izolowanym. Świadczą o tym dwa podstawowe fakty: 1. w błonie jądrowej widoczne są pory, które za pośrednictwem zespołu kanalików łączą plazmę jądrową (nukleoplazmę czyli karioplazmę) z cytoplazmą (27, 63, 110). Wielokrotnie obserwowano przepływ związków wysokocząsteczkowych, głównie białek i RNA, z jądra do cytoplazmy (100, 112). Niektóre dane (17, 54) sugerują, że możliwy jest także przepływ pewnych białek, między innymi białek nukleotropowych (54), z cytoplazmy do jądra. Transport związków niskocząsteczkowych w tym kierunku nie podlega dyskusji (31, 110).

2. w okresie pośredniego podziału komórki (mitozy), a ściślej w czasie podziału jądra (kariokinezy), dochodzi u większości organizmów do fragmentacji błony jądrowej i wymieszania metabolitów cytoplazmy i nukleoplazmy (76). Wyjątkiem w tym względzie okazały się niektóre grzyby (39) i pierwotniaki, na przykład *Tetrahymena pyriformis* (26). Błona jądrowa

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

** Doc. dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

u tych organizmów pozostaje nienaruszona w czasie całego cyklu komórkowego, a chromosomy przemieszczają się w dwóch przeciwległych kierunkach w wydłużonym jądrze (u *T. pyriformis* — w makrojądrze, patrz niżej).

W ostatnich latach dużym zainteresowaniem cieszy się problem lokalizacji podstawowych procesów biochemicznych w poszczególnych podfrakcjach uzyskiwanych za pomocą wirowania różnicowego. W artykule tym omawiamy nowsze dane wskazujące, że w jądrze komórkowym istnieje pewna specjalizacja poszczególnych substruktur w przeprowadzaniu określonych procesów. Określone przestrzenne usytuowanie substruktur w jądrze implikuje występowanie zjawisk przedziałowości strukturalno-metabolicznej w tej organelli. Sądzimy, że odgraniczenie przestrzenne pewnych szlaków metabolicznych w jądrze może być uważane za formę współzależności między różnymi procesami biochemicznymi, czego wyrazem byłoby współdziałanie między poszczególnymi substrukturami jądrowymi.

I. Uorganizowanie przestrzenne jądra

Jądro zawiera nieoblioną (60, 89, 101) organelę: jedno lub kilka jąderek (w jądrach oocytów niektórych płazów — setki (66)). Ilość i kształt jąderek może być cechą gatunkową (na przykład u glonu *Acetabularia* (31)), pomimo że jąderka są tworami różnokształtnymi (pleomorfizm) (11). Jąderka nie mają charakteru trwałego — jako morfotycznie widzialne struktury występują zazwyczaj jedynie w okresie międzypodziałowym cyklu komórkowego (interfaza). Zanikają one w profazie kariokinezy i pojawiają się ponownie już w jądrach potomnych, podczas telofazy (11, 89). U pewnych organizmów jąderka zachowują swą integralność strukturalną w czasie mitozy (13, 111). Zenk teler (111) przytacza dane świadczące o odbywaniu się wewnątrzjąderkowej mitozy u skrętnicy (*Spirogyra*).

Według Georgieva (29) jąderko wraz z chromatyną tworzy tzw. kompleks jąderkowo-chromosomalny. Według pracowników grupy Buscha (93, 96) jąderko stanowi część składową tzw. jądrowej siatki nukleoproteidowej. Składa się ona z zespołu nukleoproteidów promieniście rozchodzących się w karioplazmie od jąderka do otoczki jądrowej, stanowiących prawdopodobnie szlak transportowy dla rybosomów przekazywanych z jądra do cytoplazmy.

Chromatyna jądrowa pozostaje w stanie rozproszenia w okresie interfazy cyklu komórkowego (24). W jądrach niektórych organizmów widoczne są wówczas skondensowane rejony chromatyny, tzw. składniki heterochromatynowe (44) (np. pseudojąderka, kariosomy (24)), a niekiedy nawet interfazalne chromosomy (18, 54a, 58). Rozproszona chromatyna

jądra interfazalnego może być rozdzielona na kilka frakcji w czasie różnicowego wirowania homogenatów jądrowych (8, 79). W czasie mitozy ulega ona kondensacji i uwidaczniają się chromosomy (24). Niezupełnie jasne są związki między chromatyną jąderkową i chromatyną występującą w karioplazmie (29). Wiadomo dzisiaj o istnieniu tzw. chromatyny związanej z jąderkiem (7, 69, 87, 88). Część tej chromatyny może występować w jąderku (14, 65, 88), część natomiast tworzy pierścienie chromatynowe stanowiące tzw. chromatynę wokółjąderkową czyli perinukleolarną (4, 14). Siebert i Humphrey (86) określili chromatynę jądrową wraz ze związanymi z nią enzymami mianem „przestrzeni chromatynowej” jądra.

Po odwirowaniu chromatyny z plazmy jądrowej, w supernatancie pozostaje tzw. sok jądrowy (kariolimfa) (29, 89). Z soku jądrowego można uzyskać za pomocą wirowania rybosomy jądrowe i frakcję białek rozpuszczalnych (60, 82).

Otoczka jądra (karyotheca (24)) jest błoną podwójną (100, 110). Wewnętrzna warstwa tej błony jest nieco grubsza od warstwy zewnętrznej, czego przyczyną jest najprawdopodobniej fakt, że obejmuje ona tzw. gęstą lamellę wewnętrzną, oddzielającą ją od chromatyny (100). Między obiema błonami otoczki jądra znajduje się tzw. przestrzeń wokółjądrowa — perinuklearna (60, 63). Przestrzenie perinuklearne jąder sąsiednich komórek są ze sobą połączone, prawdopodobnie za pośrednictwem kanalików endoplazmatycznego retikulum (63). Błony retikulum są bowiem ściśle zespolone z zewnętrzną błoną otoczki jądrowej (100, 105). Kanaliki plazmatyczne międzykomórkowe (plazmodesmy) spełniałyby tu rolę łączy między przestrzeniami wokółjądrowymi, które, być może, nie mają bezpośredniego kontaktu z cytoplazmą (105).

II. Przedziałowość metaboliczna jądra

Wymienione wyżej części składowe jądra różnią się między sobą składem chemicznym i intensywnością metabolizmu pewnych związków. Tak na przykład w jąderku występują głównie rybonukleoproteidy, w karioplazmie natomiast — dezoksyrybonukleoproteidy (14, 60), choć stwierdza się tam również obecność pewnych ilości RNA (60, 109). Jedynie 5—20% DNA jądrowego występuje w jąderku (4, 14, 62). Większość DNA jądrowego wykrywana jest w chromatynie pozajądrowej (14). U organizmów eukariotycznych DNA ten pozostaje związany z białkami. Ciekawym wyjątkiem okazały się pewne wiciowce z rzędu *Dinoflagellatae*, u których chromosomowy DNA występuje w stanie wolnym (54a), podobnie jak DNA tzw. regionu jądrowego prokariotów.

Jąderko stanowiąc 20—40% suchej masy jądra obejmuje jedynie około 10% jego objętości (60), co wskazywałoby, że stężenie RNA i białek jest wyższe w jąderku niż w pozajądrowych obszarach jądra (62, 98).

Również aktywność niektórych enzymów jest większa w jąderku. Szczególnie interesująca jest pod tym względem polimeraza RNA zależna od DNA. Zgodnie z danymi Hulberta i wsp. (47), jąderkowa polimeraza RNA jest ściśle związana z cistronami (czyli miejscami genetycznymi na chromosomie) warunkującymi syntezę rybosomowego RNA i pozostaje w stanie wysokiej aktywności. W przeciwieństwie do niej, pozająderkowa polimeraza RNA, stanowiąca przeważającą ilość tego enzymu w jądrze, jest związana z matrycą DNA i histonami utrzymującymi ją w stanie silnej represji. Uaktywniając ją przez podwyższenie siły jonowej środowiska, Hulbert i wsp. (47) zmienili skład RNA syntetyzowanego *in vitro* w jądrach komórek wątroby szczura.

Badania Jacoba i wsp. (48) przeprowadzone na jądrach komórek wątroby szczura wykazały, że polimeraza RNA występująca w jąderku jest enzymem odmiennym od polimerazy RNA występującej w chromatynie pozająderkowej. Autorzy ci stwierdzili, że amanityna, toksyczny peptyd wyodrębniony z grzyba *Amanita phalloidea*, hamuje aktywność polimerazy RNA (aktywowanej przez jony manganu Mn^{2+} i siarczan amonu) występującej w chromatynie pozająderkowej, nie wpływa natomiast na aktywność polimerazy jąderkowej (aktywowanej przez jony magnezu Mg^{2+}).

Cistrony dla rybosomowego RNA zlokalizowane są wyłącznie w chromatynie związanej z jąderkiem, a niekiedy — we wnętrzu jąderka (47, 87, 88). Zdaniem Tandlera i Sirlina (101) jąderko i tzw. chromatyna związana z jąderkiem stanowią oddzielne kompartmenty fizjologiczne jądra. Skład zasad RNA syntetyzowanego w jąderku wykazuje duże różnice w porównaniu z RNA wytwarzanym w chromatynie pozająderkowej (25, 38, 47, 48, 67, 70). RNA jąderkowy wykazuje podobieństwo do RNA rybosomów cytoplazmatycznych — jest bogaty w guaninę (38, 81, 97). Pewnym wyjątkiem są jąderka u glonu *Acetabularia*, w których wykryto RNA podobny do DNA jąderkowego (9).

Zdaniem Prescottta (76) chromatyna jądrowa i jąderko stanowią oddzielne systemy syntezy RNA w jądrze. Zgodnie z danymi grupy Buscha (96), tzw. „pozostałość jądrowa” czyli nukleoproteidy nierozpuszczalne w 2M roztworze chlorku sodu, pozostające po wydzieleniu jąderek z tzw. jądrowej siatki nukleoproteidowej (patrz wyżej), syntetyzują RNA o stałej sedymentacji 18S. RNA jąderkowy u tego samego obiektu badań (wątroba szczura) charakteryzuje się natomiast stałą sedymentacji 28S.

Istnieją sugestie (21, 79, 87, 103), w myśl których jąderko warunkuje depolimeryzację wysokocząsteczkowego RNA prekursorowego. Wysuwano też przypuszczenie, że w jąderku mogą być dokonywane zmiany w drugorzędowej strukturze łańcucha polinukleotydowego, syntetyzowanego poza jąderkiem (79). Nie wykluczona byłaby tu metylacja rozpuszczalnego (6) lub rybosomowego RNA (21), gdyż stwierdzono, że zespoły metylaz jądrowych występują głównie w jąderku.

Pewne wyniki wskazują na dużą niezależność metaboliczną jąderek od chromatyny pozająderekowej. Szczególnie interesujące są dane uzyskane przez Perry'ego (73) oraz przez Perry'ego i wsp. (75). Jąderko komórek HeLa dezaktywowali oni wybiórczo za pomocą mikrowiązki światła nadfioletowego. W tych warunkach pozająderekowe obszary karioplazmy — w przeciwieństwie do jąderek — wykazywały dość aktywny metabolizm RNA. Również doświadczenia, w których użyto aktynomycyny D, nasuwały podobne wnioski. Antybiotyk ten w niskim stężeniu silnie hamował syntezę jąderkowego RNA, nie wpływając w poważniejszym stopniu na syntezę chromatynowego RNA (74). Z doświadczeń Sirlina i wsp. (90) wynika, że u muchówki z rodzaju *Smittia* aktynomycyna C hamowała całkowicie syntezę RNA w jąderku, a jedynie nieznacznie zakłócała syntezę RNA w chromosomach. W związku z tym Sirlin i wsp. (90) wyrazili opinię, że metabolizm RNA jąderkowego uzależniony jest od przemian RNA w nukleoplazmie. Uważają oni, że w jąderku występują dwie główne klasy RNA: RNA pochodzący z chromatyny i RNA syntetyzowany w jąderku na matrycowym RNA pochodzenia chromatynowego.

Prócz aktynomycyny różnicowe działanie na metabolizm RNA poszczególnych substruktur jąderkowych wykazuje, między innymi, tioacetamid (97). Związek ten doprowadza do nagromadzenia RNA w jąderku przy jednoczesnym zahamowaniu syntezy rybosomów cytoplazmatycznych. Sądzone, że tioacetamid może zaburzać syntezę chromosomowego RNA, co mogłoby z kolei wywierać wpływ na metabolizm RNA w jąderku (16).

Doświadczenia prowadzone z użyciem proflawiny wykazały, że zahamowaniu syntezy RNA w jąderku nie musi towarzyszyć inhibicja syntezy RNA w chromatynie (91). Podobnie leworfanol, syntetyczna morfina, hamował syntezę RNA jąderkowego, nie wpływając na syntezę RNA chromatynowego w komórkach wątroby szczura (83).

Zdaniem Rho i Bonnera (79) oraz Goldsteina i Micou (30) synteza RNA jąderkowego zachodzi przede wszystkim w chromatynie pozająderekowej. RNA ten jest następnie transportowany do jąderka, gdzie jest przejściowo gromadzony i stąd przekazywany do cytoplazmy. W jąderku może ulegać on pewnym przeobrażeniom strukturalnym, być może zmianom konformacyjnym. Gdyby rzeczywiście hipoteza ta okazała się prawdziwa, mielibyśmy ciekawy przykład przestrzennego oddzielenia (kompartamentacji) dwóch kolejnych etapów syntezy RNA: tworzenia łańcucha polinukleotydowego i procesów jego modyfikacji strukturalnych. Pewnym potwierdzeniem — a zrazem rozszerzeniem — tej hipotezy są wyniki Ringborga i wsp. (79a) sugerujące, że w komórkach ślinianek u larw *Chironomus tentans* ostateczne dojrzewanie strukturalne prekursorowego RNA rybosomalnego uprzednio zmodyfikowanego w jąderku ma miejsce w chromosomach.

Podobne wnioski nasuwają się z cytochemicznych obserwacji Dasa

(23), który stwierdził, że w czasie mitozy, kiedy chromatyna jest skondensowana w postaci chromosomów i nie wykazuje zdolności do syntezy RNA, struktury jąderkowe widoczne w późnej profazie syntezę tę jeszcze prowadzą. Natomiast w okresie telofazy zawiązki jąderek potomnych czyli tzw. ciała projąderkowe, rozpoczynają syntezę RNA wcześniej niż ulegająca rozproszeniu chromatyna.

Synteza DNA jądrowego odbywa się głównie w chromatynie występującej w karioplazmie. Jednakże, zdaniem Morina i wsp. (69), chromatyna jąderkowa wykazuje szybszy metabolizm DNA niż chromatyna pozająderkowa. Zdaniem Harrisa (36) w jąderku ma miejsce inicjacja syntezy DNA jądrowego.

W ostatnich latach szczególnym zainteresowaniem cieszy się problem syntezy białek w poszczególnych strukturach jądra (5, 8). Wiadomo dziś powszechnie, że białka stanowią przeważającą część (50—80%) suchej masy zarówno jądra jako całości, jak też i jąderka (14, 60, 85, 98). Już 30 lat temu zwrócono uwagę (20), że komórki charakteryzujące się szybkim metabolizmem białek mają jąderka o dużych rozmiarach. Wiadomo też, że jąderko podobnie jak całe jądro, stopniowo zwiększa swoje rozmiary w okresie interfazy, kiedy metabolizm białek jest najintensywniejszy (19, 62). Powszechnie przyjmuje się dzisiaj (odnośniki — patrz (62)), że jąderko jest bardzo aktywnym centrum syntezy białek, nie tylko RNA. Jest ono najprawdopodobniej miejscem syntezy białek rybosomalnych, a być może wytwarza całe rybosomy cytoplazmatyczne, bądź też ich prekursorów (62, 87, 88). Sirlin (87) wysunął przypuszczenie, iż rybosomy cytoplazmatyczne są pochodzenia jąderkowego, natomiast rybosomy wykrywane w chromatynie pozająderkowej mają znaczenie jedynie w syntezie białek jądrowych.

Zgodnie z wynikami Birnstiela i wsp. (3), jąderko jest najaktywniejszym w syntezie białek przedziałem metabolicznym jądra komórkowego. Birnstiel i Hyde (7) podają, że niektóre białka zsyntetyzowane w jąderku są przekazywane do chromatyny pozająderkowej. Ta ostatnia, będąc oddzielnym systemem biosyntezy białek w jądrze, jest zarazem znacznie mniej aktywna.

Wyniki Buscha (15) wskazują, że chromatyna pozająderkowa syntetyzuje między innymi histony. Białka te są raczej mało aktywne metabolicznie (87) i spełniają najprawdopodobniej rolę regulacyjną w procesach transkrypcji DNA (1, 46). Szczegółowe badania Spaldinga i wsp. (94), przeprowadzone na zsynchronizowanych populacjach komórek HeLa, wykazały, że synteza histonów jest skorelowana z syntezą DNA w jądrze. Maksymalne znakowanie białek zasadowych w jądrze obserwowano bowiem w okresie maksymalnej syntezy DNA podczas interfazy cyklu komórkowego (patrz Uwagi końcowe). Kiedy jednak zahamowano gwałtownie syntezę DNA za pomocą hydroksymocznika, wówczas pewne frakcje tych białek wykazywały nadal bardzo aktywny metabolizm po-

mimo spadku natężenia procesów włączania znakowanych aminokwasów do histonów. Zdaniem Spaldinga i wsp. (94) świadczyłyby to o uzależnieniu syntezy histonów od obecności noworeplikowanego DNA. Stwierdzono też, że inne frakcje białek jądrowych mogą być syntetyzowane w okresie, gdy synteza DNA jest wstrzymana (49). Mimo że histony skupione są głównie w pozajądrowych rejonach jądra, Birnstiel i Hyde (7) stwierdzali aktywny metabolizm tych białek również w jąderku.

Przemiana białek w jądrze odbywa się więc zarówno w jąderku, jak w karioplazmie. Istnieją dane wskazujące, że również sok jądrowy odgrywa pewną rolę w biosyntezie białek jądrowych. Dotychczas jednak niezupełnie jasny jest związek między metabolizmem tych substancji w soku jądrowym i w chromatynie (87). W soku jądrowym stwierdzano występowanie enzymów aktywujących aminokwasy (43). Zdaniem Georgieva (29) odbywa się tam głównie wstępny etap syntezy białek (aktywacja aminokwasów).

W soku jądrowym, gdzie stężenie RNA jest najprawdopodobniej stosunkowo niskie, może odbywać się replikacja pewnych frakcji kwasu rybonukleinowego (87). Tam też wykrywane są enzymy glikolityczne i enzymy cyklu kwasów trójkarboksylowych, a także zachodzi synteza niektórych koenzymów (na przykład NAD) i wytwarzanie wiązań wysokoenergetycznych (odnośniki — patrz (29)). Jak podkreśla Georgiev (29) między sokiem jądrowym a cytoplazmą zachodzi swobodna wymiana niektórych metabolitów. Tym samym sok jądrowy stanowi oddzielny przedział metaboliczny w jądrze.

III. Metabolizm RNA w strukturach jąderka

Pewne dane doświadczalne wskazują, że oprócz różnic w metabolizmie RNA poszczególnych substruktur jądra, również w samym jąderku można zaobserwować pewne zróżnicowanie strukturalne, którego odbiciem jest zróżnicowany metabolizm RNA.

Morfotycznie nienaruszone jąderko w jądrze interfazalnym wykazuje obecność struktur włóknistych, tzw. nucleonemata lub nukleolonemata (l. poj. nucleonema lub nukleolonema) rozmieszczonych w środkowych rejonach organelli i struktur granulanych, usytuowanych w obszarach peryferycznych (29, 40, 51, 56, 84). W jąderkach niektórych komórek obserwuje się ponadto rejony bezstrukturalne, tzw. *pars amorphae* (84). Poszczególne struktury jąderka uwidocznione są na rysunku 1.

Z badań grupy Buscha (71, 96) wiadomo, że w jąderkach komórek wątroby szczura elementy fibrylarne zawierają głównie niskopolimeryzowany RNA o stałej sedimentacji 6S. W przeciwieństwie do nich, elementy granularne zawierają RNA szybko opadający o stałych sedymen-

tacji 28S i wyższych. Pod wpływem aktynomycyny D podawanej *in vivo* następuje charakterystyczne przemieszczanie obu typów elementów strukturalnych, przy czym ze wzrostem ilości granул w jąderku wzrasta ilość RNA wysokopolimeryzowanego (71). Wyniki te wskazują na pewnego rodzaju specjalizację obu rodzajów struktur jąderkowych w syntezie różnych klas RNA.

Badania przeprowadzone na muchówce z rodzaju *Chironomus* przez Stevens (99) wykazały, że aktynomycyna D i w tym przypadku wywołuje stopniową segregację elementów fibrylarnych i granulanych w jąderku. Autorka ta sądzi, że elementy fibrylarne stanowią formę wolnego RNA jąderkowego, natomiast granule są prekursorami rybosomów cytoplazmatycznych. W obecności aktynomycyny D, gdy wstrzymana jest synteza RNA, wśród elementów włóknistych uwidoczniają się amorficzne skupienia wolnych białek.

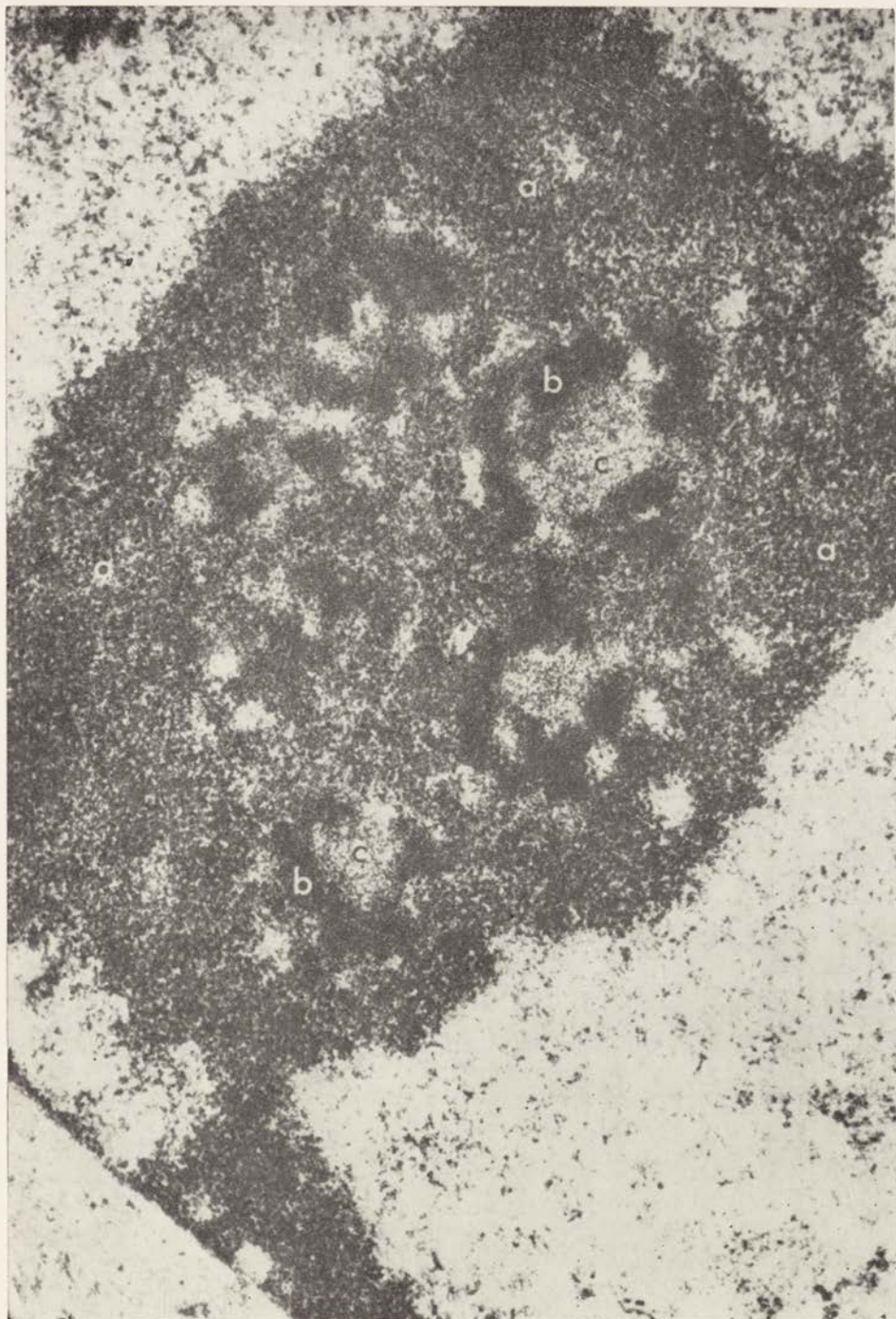
Autoradiograficzne badania La Coura i Crawleya (56) wykazały, że nowosyntetyzowany RNA pojawia się najpierw w elementach fibrylarnych, a dopiero później przekazywany jest on do elementów granulanych. Podobne rezultaty uzyskał Karasaki (51, 52), który badał rozwój jąderek u zarodków trzszki *Triturus pyrrhogaster*. Zdaniem tego autora (52), elementy włókniste są strukturami najwcześniej pojawiającymi się w ontogenezie jąderek.

Szczególnie interesujące wyniki uzyskali niedawno Miller i Betty (66), którzy badali oba rodzaje struktur jąderkowych w oocytach trzszki *Triturus viridescens*. Autorzy ci stwierdzili, że elementy fibrylarne jąderka (określane przez nich terminem „rdzeń jąderka”) są niciami DNA stanowiącymi geny. Inne fibryle (*matrix*) pokrywające nici DNA — są natomiast skupieniami polimerazy RNA, która zespolona z genem syntetyzuje kwas rybonukleinowy. Badania autoradiograficzne w połączeniu z obserwacjami w mikroskopie elektronowym wykazały bowiem, że elementy fibrylarne nie pokryte elementami *matrix* nie włączają znakowanych rybonukleozydotrójfosforanów. Granule z kolei są „korą” jąderka*.

IV. Ontogeneza jąderka

Powszechnie przyjmuje się dzisiaj, że proces formowania jąderek jest kontrolowany przez materiał chromatynowy tzw. organizatora jąderkowego (2, 42, 89). Organizator jąderkowy jest zapewne określonym miejscem genetycznym na określonym chromosomie (2, 59, 80). Według dawniejszych koncepcji Heitza (42), w grę wchodziłyby tu tzw. SAT-chromosomy (chromosomy *sine acido thymonucleinico*). W przypadku występowania kilku jąderek w danym jądrze, mamy najprawdopodobniej do czynienia z kilkoma organizatorami (2, 12, 89). Wskutek braku lub niewłaściwego działania organizatora jąderkowego na przykład u mutantu

* Patrz addendum



Rys. 1. Jąderko komórek nerki pawiana (*Papio papio*) oglądane pod mikroskopem elektronowym, powiększenie 42 000×

Przygotowanie i barwienie — patrz poz. (84). Oznakowanie poszczególnych substruktur: a — strefa peryferyczna jąderka zawierająca granule rybonukleoproteidowe; b — strefa centralna jąderka zawierająca struktury włókniste (*nukleolonemata*); c — składniki bezstrukturalne (*pars amorpha*), najprawdopodobniej białka

południowo-afrykańskiej ropuchy płatanna (*Xenopus laevis*) proces rozwojowy jąderka jest zahamowany (12, 89). Jednocześnie mutant ten nie wykształca rybosomów cytoplazmatycznych, co jest potwierdzeniem faktu, iż organizator jąderkowy zawiera cistrony warunkujące syntezę rybosomalnego RNA (104).

Według Stevens (99) organizator jąderkowy pozostaje w ścisłym związku z elementami fibrylarnymi występującymi w tej organelli (por. rozdział poprzedni). Karasaki (51, 52) uważa, że u traszki elementy fibrylarne jąderka przypominają swym wyglądem skondensowane chromosomy. Fibryle, jak podkreślaliśmy wyżej, są najwcześniej pojawiającym się elementem strukturalnym jąderka i są widoczne już w tzw. jąderku pierwotnym, które u traszki wykształca się w okresie gastrulacji, podobnie jak u płatanny (*Xenopus laevis*) (12). Dopiero później pojawiają się elementy granularne tworzące warstwę peryferyczną dojrzałego jąderka (51, 52).

Zanik jąderka jako wy osobnionego tworu jądrowego w okresie mitozy nie przesądza sprawy ciągłości genetycznej jego elementów strukturalnych. Badania Brinkleya (11), Hsu (45), Harrisa (37) i Martina (64) wykazały, że przynajmniej niektóre elementy strukturalne jąderka, najprawdopodobniej białkowe (37, 64), są tworam — posługując się terminologią Sirlina (87) — preformowanymi. Znaczy to, że pomimo zaniku morfotycznie nienaruszonej organelli w czasie mitozy, dochodzi wówczas jedynie do rozproszenia materiału jąderkowego (55). Już podczas anafazy w czasie kariokinezy włókniste elementy jąderka widoczne są wzdłuż ramion chromosomów. We wczesnej telofazie tzw. ciała projąderkowe (22) są już wyraźnie wykształcone. Zdaniem Brinkleya (11) oba podstawowe rodzaje struktur jąderkowych, granule i fibryle, pozostające po dezintegracji jąderka w okresie profazy, mogą spełniać rolę zawiązków jąderek potomnych.

Podkreślić jednak trzeba, że istnieją pewne dane sprzeczne z przyjmowanym przez wielu autorów poglądem, sugerującym ciągłość genetyczną jąderek. Na przykład Lafontaine i Chouinard (57) uważają, iż ciała projąderkowe powstają jako produkty aktywności metabolicznej chromosomów w okresie telofazy. W zgodzie z taką opinią pozostawałyby obserwacje dokonane przez Browna i Emery'ego (13) na kilku gatunkach roślin, między innymi traw. Jąderko u tych organizmów nie zanika w okresie profazy, a po wykształceniu się jąderek potomnych stare jąderko jest usuwane z jądra. Liczne pozycje literatury na temat tego zjawiska można znaleźć w artykule przeglądowym Zenktelea (111).

Prace nad ontogenezą jąderka, choć nie wyjaśniają ostatecznie problemu jego ciągłości genetycznej, wskazują na ścisłą współzależność metaboliczną między poszczególnymi substrukturami w jądrze. Jak można sądzić, chromatyna jądrowa spełnia centralną rolę w procesie wykształcania substruktury jądra. Wskazywałyby na to cytowane wyżej badania

nad organizatorem jąderkowym. Nie wiadomo jednak, jaka jest rola organizatora jąderkowego w metabolizmie dojrzałego funkcjonalnie jąderka (87).

V. Heterogenność jąder komórkowych

Obok przestrzennego odgraniczenia niektórych szlaków metabolicznych w jądrze komórkowym, czego wyrazem jest wykształcenie właściwej mu struktury, przedziałowość metaboliczna może być realizowana na drodze wykształcenia jąder heterogennych.

Heterogenność jąder, polegająca na wykształcaniu kilku jąder w danej komórce, różniących się intensywnością metabolizmu podstawowych związków, jest zjawiskiem mało zbadanym.

Szczególnym przypadkiem zjawiska heterogenności jąder jest dymorfizm tej organelli u niektórych pierwotniaków (*Protozoa*). Interesujące pod tym względem są przede wszystkim wymoczki (*Ciliata*) i korzeniówki (*Rhizopoda*) (35). Istotą dymorfizmu jąder u wymoczków jest występowanie u nich jądra dużego (makrojądra) i jądra małego (mikrojądra). Choć zjawisko to znane jest od dawna, badania porównawcze nad przemianami biochemicznymi zachodzącymi w obu typach jąder prowadzone są dopiero od lat kilkunastu (35). Badania te prowadzono, między innymi, na pantofelkach z gatunku *Paramecium caudatum* (78), *P. aurelia* (108) oraz na pierwotniaku *Tetrahymena pyriformis* (33). Na uwagę zasługują prace Gorovsky'ego i Woodarda (34). Autorzy ci ustalili, że mikrojądro u *T. pyriformis* jest genetycznie nieaktywne i w czasie wzrostu wegetatywnego komórki nie syntetyzuje RNA (33), w przeciwieństwie do makrojądra. Zdaniem autorów (34) oba typy jąder zawierają analogiczną informację genetyczną, pozostającą w odmiennych stanach aktywności. Warto tu dodać, że mikrojądro u tego organizmu, w przeciwieństwie do makrojądra, nie zawiera jąderek, wykazując tym samym inne uorganizowanie strukturalne (87). Prócz jąderek makrojądro zawiera okresowo pojawiające się tzw. ciała kwasu rybonukleinowego, które przekazują najprawdopodobniej RNA syntetyzowany w tzw. ciałkach chromatynowych do jąderka (26).

W przeciwieństwie do mikrojądra u *Tetrahymena pyriformis*, jądro małe pantofelka *Paramecium aurelia* wykazuje aktywny metabolizm DNA (108). Dotychczas nie stwierdzono występowania szczepów *P. aurelia* pozbawionych tej organelli, co jest zjawiskiem dość częstym u *T. pyriformis* (34). Zdaniem Gorovsky'ego i Woodarda (34) fakty te mogą wskazywać, że u różnych pierwotniaków mikrojądra zostały w różnym stopniu wprzęgnięte do pozajądrowych przemian komórkowych. Jak podkreślał niedawno Grell (35), dotychczas niewiele wiadomo, jakie znaczenie funkcjonalne dla komórki ma zjawisko dymorfizmu jąder. Do-

dajmy od siebie, że jest ono, być może, wyrazem kompartmentacji metabolicznej na poziomie organellowym.

To samo możnaby powiedzieć o heterogenności jąder w pyłkach kwiatowych, w których występuje jądro generatywne i jądro wegetatywne. Z pracy *Wevera* (106) wiadomo, że w pyłku trzykrotki (*Tradescantia*) jedynie jądro generatywne syntetyzuje DNA. W zarodkach nasiennych występują jądra o odmiennych funkcjach fizjologicznych, na przykład jądro zygocytne i jądro bielmowe (92). Wiadomo też, że tzw. jądro pierwotne i jądra wtórne (czyli generatywne — warunkujące wykształcanie spor) u glonu *Acetabularia* nie są sobie równoważne biochemicznie. W przeciwieństwie do jądra pierwotnego, jądra wtórne nie są w stanie kierować procesami morfogenezy plechy u tego glonu (31, 41).

Powszechnie znanym zjawiskiem jest występowanie licznych jąder w tzw. komórczakach. Nie wiadomo, czy jądra komórczaków są sobie równoważne. Niekiedy w danym materiale biologicznym może dochodzić do uwielokrotnienia ilości jąder wskutek zaburzeń procesu cytokinezy, następującego zazwyczaj po kariokinezie w czasie mitozy (28). W innych przypadkach wskutek zjawiska tzw. endomitozy, czyli podziału chromosomów wewnątrz obłonionego jądra (24, 28), wykształcają się jądra poliploidalne czyli jądra zawierające wielokrotną liczbę chromosomów w porównaniu do normalnej liczby chromosomów charakterystycznej dla danego gatunku. Ostatnio *Johnston* i wsp. (50), posługując się techniką wirowania strefowego, rozdzielili jądra komórek wątroby szczura na populacje jąder diploidalnych i tetraploidalnych. Jąderka obu typów jąder wykazywały różną intensywność syntezy białek i RNA, przy czym jąderka jąder tetraploidalnych były bardziej aktywne. Znaczenie tego zjawiska nie jest jednak wyjaśnione.

VI. Uwagi końcowe

Wyniki wielu prac sugerują, że jąderko, chromatyna pozająderkowa karioplazmy i tzw. sok jądrowy są oddzielnymi systemami metabolicznymi w jądrze komórkowym. Innymi słowami, jądro interfazalne może być rozpatrywane jako zespół przedziałów (kompartmentów) metabolicznych, których istnienie implikowane jest substrukturą tej organelli. Istnienie przedziałowości metabolicznej w jądrze dyskutowali między innymi *Siebert* (85), *Sirlin* (87), *Georgiev* (29) oraz pracownicy grupy *Buscha* (70, 96).

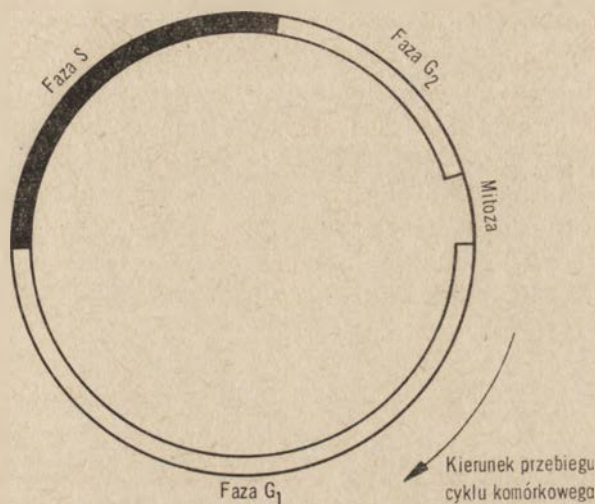
Zagadnienie kompartmentacji metabolicznej wewnątrzorganellowej było już dawniej dyskutowane w odniesieniu do mitochondriów. Nie poruszając szerzej tego problemu zwrócimy jedynie uwagę, że w mitochondriach wyróżnia się tzw. przedział zewnętrzny obejmujący błony zewnętrzne tej organelli i przestrzenie wewnątrzgrzebieniowe oraz kompartment

wewnętrzny złożony z błon wewnętrznych i *matrix*. W obu przedziałach stwierdza się charakterystyczne rozmieszczenie enzymów oddechowych, enzymów wprzęgniętych w metabolizm fosfolipidów i przeprowadzających utlenienia kwasów tłuszczowych. Liczne odnośniki literaturowe na ten temat można znaleźć w pracy W o j t c z a k a i wsp. (107).

Wydaje się, że kompartmentacja jądra komórkowego ma bardziej złożony charakter i przypomina — w pewnym sensie — zjawisko przedziałowości komórki traktowanej jako całość. Jak dotychczas, nie ma powszechnej zgodności poglądów na temat wzajemnych relacji między poszczególnymi przedziałami metabolicznymi w jądrze. Przykładem może tu być zagadnienie roli jąderka w metabolizmie RNA jądrowego.

Ogólny charakter przedziałowości jądra zmienia się w czasie cyklu komórkowego. Towarzyszą temu zmiany szybkości przemian w komórce. W okresie mitozy ustają w zasadzie procesy anaboliczne podstawowych związków: białek, RNA i DNA. Wiadomo dziś powszechnie, że synteza tych związków odbywa się przede wszystkim, jeśli nie wyłącznie, w okresie międzypodziałowym podczas interfazy cyklu komórkowego. W o o d a r d i wsp. (109), badając autoradiograficznie i mikrofotometrycznie szybkość metabolizmu w jądrach komórek merystemu u korzeni bobu (*Vicia faba*) stwierdzili, że w okresie mitozy zachodzą jedynie przemiany kataboliczne białek i RNA. Synteza tych związków odbywa się jedynie w dwóch kolejnych okresach między późną telofazą i wczesną profazą, a więc podczas interfazy. DNA syntetyzowany jest, przynajmniej w komórkach organizmów wyższych, jedynie w tzw. fazie S podczas interfazy (2, 53, 95), gdy synteza RNA jest wstrzymana (29, 109) (por. schemat 1). Jak podkreślał G e o r g i e v (29), replikacja DNA w dezoksyrybonukleoproteidach chromatyny może zachodzić jedynie wówczas, gdy pozostają one w stanie rozproszenia. Mianem „rozproszona chromatyna” określa się chromatynę, w której nie są widoczne chromosomy bez zastosowania jakichkolwiek metod utrwalania i barwienia materiału. Zgodnie z wynikami H a y i R e v e l a (40), gęste granule chromatynowe (stanowiące tzw. składniki heterochromatynowe (44)), występujące niekiedy w karioplazmie, nie są w stanie syntetyzować DNA w przeciwieństwie do otaczającej je chromatyny rozproszonej jądra interfazalnego (czyli chromatyny właściwej — euchromatyny). Ciekawym wyjątkiem są tzw. interfazalne chromosomy obserwowane w jądrach niektórych komórek u larw owadów dwuskrzydłych (*Diptera*) — zwane chromosomami politenicznymi (wielopasmowymi) (58) oraz chromosomy szczoteczkowe w jądrach oocytów u niektórych płazów (18). Chromosomy te tworzą odpowiednio: puffy lub pętle (które są najprawdopodobniej „rozluźnionymi” niciami DNA) i wykazują intensywny metabolizm białek oraz RNA (10, 24). Ponadto, makrojądra niektórych pierwotniaków wykazują obecność chromosomów w ciągu całego cyklu komórkowego (35). U pierwotniaka z rodzaju *Euplotes* synteza DNA odbywa się w dwóch tzw. warstwach reorganizacyjnych, które przesuwają

jąc się do centrum makrojądra zmieniają konsystencję nukleoplazmy — tuż przed syntezą DNA nukleoproteidy przechodzą w stan rozproszony (77). Z przytoczonych przykładów wynika, że cyklicznym zmianom w stanie uorganizowania struktury jądra towarzyszą głębokie zmiany metaboliczne. U drożdży z gatunku *Schizosacharomyces pombe*, których komórki podlegają podziałom amitotycznym i w związku z tym nie wykształcają się chromosomy, a także nie zanika jąderko, synteza RNA zachodzi w sposób ciągły (68).



Schemat 1. Fazy syntezy i spoczynku metabolicznego w cyklu komórkowym

Przybliżone okresy trwania poszczególnych faz cyklu komórkowego (odpowiadającego czasowi jednej generacji komórek) wg Stannera i Tilla (95) dla hodowanych *in vitro* (L)-komórek myszy. W ogólnych zarysach podobne schematy uzyskano również dla komórek innych organizmów wyższych (68a). Czas trwania cyklu komórkowego u myszy — około 20 godz. Mitoza (obejmująca kariokinezę — pośredni podział jądra i cytokinezę — podział komórki) zachodzi w ciągu około $\frac{1}{10}$ czasu cyklu. W większości komórek u różnych organizmów synteza DNA, RNA i białek jest wstrzymana (68a, 109)

Interfaza, okres międzypodziałowy, obejmuje 3 fazy: Faza S — okres syntezy DNA trwający około $\frac{1}{3}$ czasu całego cyklu komórek myszy. W komórkach HeLa — synteza RNA (72). Faza G₁ — pomitotyczny okres spoczynku metabolicznego DNA, obejmujący około $\frac{1}{2}$ czasu cyklu komórkowego u myszy. W komórkach licznych organizmów odbywa się wówczas synteza RNA i białek (68a, 109). Faza G₂ — premitotyczny okres spoczynku metabolicznego DNA, obejmujący u myszy około $\frac{1}{4}$ cyklu. Synteza RNA i białek w komórkach licznych organizmów

Tak więc dezintegracji strukturalnej jądra w czasie mitozy i zanikowi kompartmentacji tak jądra jak i całej komórki towarzyszy zanik aktywności anabolicznej organizmu. Można więc sądzić, że istnienie przedziałów metabolicznych jest warunkiem odbywania się procesów syntetycznych tak na poziomie organelli, jak i na poziomie całej komórki. Chodzi tu zapewne o właściwe przestrzenne rozmieszczenie struktur i najprawdopodobniej — o pewne odgraniczenie przestrzenne określonych szlaków metabolicznych w jądrze komórkowym. Wydaje się bowiem, że nieaktywne metabolicznie (skondensowane) chromosomy wykazują wyższy stopień

uorganizowania morfotycznego w porównaniu do aktywnej chromatyny rozproszonej. Przegląd hipotez na temat struktury chromosomów można znaleźć w artykule opublikowanym przez Malec (61). Procesy kondensacji chromosomów z jednoczesną spiralizacją chromonemy opisują De Robertis i wsp. (24).

Zjawisko przedziałowości metabolicznej jądra, jako odbicie kompartmentacji całej komórki, nie powinno być jednak absolutyzowane. Obserwowane jest ono bowiem jedynie podczas interfazy — ma więc charakter czasowy. Ponadto, poszczególne przedziały metaboliczne jądra pozostają w ścisłych, choć niezupełnie jeszcze wyjaśnionych, związkach. Współzależności metaboliczne między kompartmentami jądra są przedmiotem intensywnych badań. Pamiętać należy, iż zjawisko przedziałowości metabolicznej obserwuje się jedynie u organizmów eukariotycznych. Prokaryoty (bakterie i sinice) nie wykształcają organelli komórkowych a zamiast jądra komórkowego posiadają jedynie tzw. obszar jądrowy (zawierający skupienie DNA), który nie jest oddzielony błoną od reszty komórki. Nie jest więc wykluczone, że zjawisko przedziałowości strukturalno-metabolicznej jest wyrazem rozwoju filogenetycznego systemów biologicznych.

LITERATURA

1. Allfrey V., Littau V., Mirsky A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **49**, 414 (1963).
2. Barr H. J., Esper H., *Exptl. Cell. Res.* **31**, 211 (1963).
3. Birnstiel M. L., Chipchase M., Bonner J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 161 (1961).
4. Birnstiel M. L., Chipchase M. I. H., Flamm W. G., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 111 (1964).
5. Birnstiel M. L., Chipchase M. I. H., Hayes R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 728 (1962).
6. Birnstiel M. L., Fleissner E., Borek E., *Science* **142**, 1577 (1963).
7. Birnstiel M. L., Hyde B. B., *J. Cell. Biol.* **18**, 41 (1963).
8. Birnstiel M. L., Rho J. A., Chipchase M. I. H., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 734 (1962).
9. Brachet J., w *Biochim. Biophys. Acta Library*, tom 10, Regulation of Nucleic Acids and Protein Biosynthesis, Red. V. V. Koningsberger i L. Bosch, Elsev. Publ. Comp., Amsterdam 1967, str. 330.
10. Brachet J., *Biochemia Rozwoju*, PWN, Warszawa 1964.
11. Brinkley B. R., *J. Cell Biol.* **27**, 411 (1965).
12. Brown D. D., Gurdon J. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **51**, 139 (1964).
13. Brown W. V., Emery W. H. P., *Am. J. Bot.* **44**, 585 (1957) cyt. wg 66.
14. Busch H., w *Comprehensive Biochemistry*, Red. M. Florkin, E. M. Stotz, Elsev. Publ. Comp. Amsterdam 1968, t. 23, str. 39.
15. Busch H., *Histones and Other Nuclear Proteins*, Academic Press, New York-Londyn 1965, str. 171.
16. Busch H., Muramatsu M., Adams S. H., Liau M. C., Smetana

- K., *Exptl. Cell Res. (Suppl.)* **9**, 150 (1963).
17. Byers T. J., Platt D. P., Goldstein L., *J. Cell Biol.* **19**, 467 (1963).
 18. Callan H. G., *Intern. Rev. Cytol.* **15**, 1 (1963).
 19. Carriere R., Lebloud C. P., Messier B., *Exptl. Cell Res.* **23**, 625 (1961).
 20. Caspersson T., *Naturwissenschaften* **29**, 33 (1941), cyt. wg 88.
 21. Culp L. A., Brown G. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **137**, 222 (1970).
 22. Das N. K., *Exptl. Cell Res.* **26**, 428 (1962).
 23. Das N. K., *Science* **140**, 1231 (1963).
 24. De Robertis E. D. P., Nowinski W. W., Saez F. A., *Cytologia (Biologia komórki)*, PWN, Warszawa 1969.
 25. Edström J. E., Gall J. G., *J. Cell Biol.* **19**, 279 (1963).
 26. Elliot A. M., w *The Cell in Mitosis*, red. L. Levin, Academic Press, New-York 1963, str. 107.
 27. Feldherr C. M., *J. Cell Biol.* **14**, 65 (1962).
 28. Gajewski W., *Kosmos, seria A (Biologia)* **4**, 682 (1955).
 29. Georgiev G. P., w *Enzyme Cytology*, red. D. B. Roodyn, Academic Press, Londyn-New York 1967, str. 27.
 30. Goldstein L., Micou J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, 301 (1959).
 31. Gołaszewski T., Rytel M., Szarkowski J. W., *Współzależności metaboliczne jądra i cytoplazmy w komórce glonu Acetabularia sp.*, Monografie Biochemiczne Nr 18, PWN, Warszawa 1968.
 32. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* **10**, 491 (1964).
 33. Gorovsky M. A., *J. Cell Biol.* **27**, 37 A (1965).
 34. Gorovsky M. A., Woodard J., *J. Cell Biol.* **42**, 673 (1969).
 35. Grell K. G., w *The Cell*, red. J. Brachet, A. E. Mirsky, Academic Press, New York-Londyn 1964, t. 6, str. 1.
 36. Harris H., *Biochem. J.* **72**, 54 (1959).
 37. Harris H., *Nature* **190**, 1077 (1961).
 38. Harris H., *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2**, 19 (1963).
 39. Hawker L. E., *Biol. Rev.* **40**, 52 (1965).
 40. Hay E. D., Revel J. P., *J. Cell Biol.* **16**, 29 (1963).
 41. Hämmerling J., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **14**, 65 (1963).
 42. Heitz E., *Planta* **12**, 775 (1931), cyt. wg 59.
 43. Hopkins J. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **45**, 1461 (1959).
 44. Hsu T. C., *Exptl. Cell Res.* **27**, 332 (1962).
 45. Hsu T. C., *J. Cell Biol.* **26**, 539 (1965).
 46. Huang R. C., Bonner J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **48**, 1216 (1962).
 47. Hulbert R. B., Miller E. G., Vaughan C. L., *Advan. Enzyme Reg.* **7**, 219 (1969).
 48. Jacob S. T., Sajdel E. M., Munro H. N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **38**, 765 (1970).
 49. Jockusch B. M., Brown D. F., Busch P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **38**, 279 (1970).
 50. Johnston J. R., Mathias A. P., Pennington F., Ridge D., *Biochim. Biophys. Acta* **195**, 563 (1969).
 51. Karasaki S., *J. Cell Biol.* **26**, 937 (1965).
 52. Karasaki S., *J. Ultrastr. Res.* **11**, 246 (1964).
 53. Kolodny G. M., Gross P. R., *Exptl. Cell Res.* **56**, 117 (1969).
 54. Kroeger H., Jacob J., Sirlin J. L., *Exptl. Cell Res.* **31**, 416 (1963).
 - 54a. Kubai D., Ris H., *J. Cell Biol.* **40**, 508 (1969).
 55. La Cour L. F., *Exptl. Cell Res.* **29**, 112 (1963).
 56. La Cour L. F., Crawley J. W. C., *Chromosoma* **16**, 124 (1965).

57. Lafontaine J. G., Chouinard L. A., *J. Cell Biol.* **17**, 167 (1962).
58. Laufer H., Nakase Y., Vanderberg J., *J. Cell Biol.* **19**, 43A (1963).
59. Longwell A. C., Svihla G., *Exptl. Cell Res.* **20**, 294 (1960).
60. Lyndon R. F., w *Plant Cell Organelles*, red. J. B. Pridham, Academic Press, Londyn-New York 1968, str. 16.
61. Malec J., *Post. Biochem.* **14**, 523 (1968).
62. Malec J., *Post. Biochem.* **15**, 215 (1969).
63. Marinos N. G., *J. Ultrastruct. Res.* **3**, 328 (1960).
64. Martin P. G., *Nature* **190**, 1078 (1961).
65. McConkey E. H., Hopkins J. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 1197 (1964).
66. Miller O. L. jr., Beatty B. R., w Supplement 1 do *J. Cell. Physiol.* **74**, 22E (1969). Materiały Symposium on Protein-Nucleic Acid Interaction w Galtinburg, Tennessee 31 marzec—3 kwiecień, 1969, The Wistar Institute Press, Philadelphia. por. *Science* **164**, 955 (1969).
67. Mitchison J. M., *Intern. Rev. Cytol.* **19**, 97 (1966).
68. Mitchison J. M., Lark K. G., *Exptl. Cell Res.* **28**, 452 (1962).
- 68a. Monesi V., w *Handbook of Molecular Cytology*, red. Lima-de-Faria, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam-Londyn, 1969, str. 472.
69. Morin G. A., Zajdela F., Costerrousse O., *Exptl. Cell Res.* **13**, 204 (1957).
70. Muramatsu M., Hodnett J. L., Steele W. J., Busch H., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 116 (1966).
71. Narayan K. S., Steele W. J., Busch H., *Exptl. Cell Res.* **43**, 483 (1966).
72. Pagoulatos G. N., Darnell J. E., *J. Cell Biol.* **44**, 476 (1970).
73. Perry R. P., *Exptl. Cell Res.* **20**, 216 (1960).
74. Perry R. P., *Exptl. Cell Res.* **29**, 400 (1963).
75. Perry R. P., Hell A., Errera M., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 47 (1961).
76. Prescott D. M., *Progr. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **3**, 33 (1964).
77. Prescott D. M., Kimbal R. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 686 (1961).
78. Rao M., Prescott D., *J. Cell Biol.* **33**, 281 (1967).
79. Rho J. H., Bonner J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 1611 (1961).
- 79a. Ringborg U., Daneholt B., Edström J.-E., Egyházi E., Rydlander L., *J. Mol. Biol.* **51**, 679 (1970).
80. Ritossa F. M., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 737 (1965).
81. Ro T. S., Muramatsu M., Busch H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 149 (1964).
82. Sadovski P. D., Howden J. A., *J. Cell Biol.* **37**, 163 (1968).
83. Sakiyama S., Usui S., Miura Y., *Advan. Enzyme Reg.* **7**, 207 (1969).
84. Schoefl G. J., *J. Ultrastruct. Res.* **10**, 224 (1964).
85. Siebert G., w *Comprehensive Biochemistry*, red. M. Florin, E. M. Stotz, Elsev. Publ. Comp. Amsterdam 1968, t. 23, str. 1.
86. Siebert G., Humphrey G. B., *Advan. Enzymol.* **27**, 239 (1965).
87. Sirlin J. L., *Intern. Rev. Cytol.* **15**, 35 (1963).
88. Sirlin J. L., *Nature* **186**, 275 (1960).
89. Sirlin J. L., *Progr. Biophys. Biophys. Chem.* **12**, 25 (1962).
90. Sirlin J. L., Jacob J., Kato K. - J., *Exptl. Cell Res.* **27**, 355 (1962).
91. Sirlin J. L., Tandler G. J., Jacob J., *Exptl. Cell Res.* **31**, 611 (1963).
92. Sielecka M. A., Gołaszewski T., Szarkowski T., (w przygotowaniu).
93. Smetana K., Steele W. J., Busch H., *Exptl. Cell Res.* **31**, 198 (1963).
94. Spalding J., Kajiwaru K., Mueller G. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1535 (1966).

95. Stanners C. P., Till J. E., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 406 (1960).
96. Steele W., Busch H., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 54 (1966).
97. Steele W., Okamura N., Busch H., *J. Biol. Chem.* **240**, 1742 (1965).
98. Stern H., Johnston F. B., Setterfield G., *J. Biophys. Biochem. Cytol* **6**, 57 (1959).
99. Stevens B. J., *J. Ultrastruct. Res.* **11**, 329 (1964).
100. Stevens B. J., André J., w *Handbook of Molecular Cytology*, red. A. Lima-de-Faria, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam-Londyn 1969, str. 837.
101. Tandler C. J., Sirlin J. E., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 228 (1962).
102. Turski W., Gross M., *Post. Biochem.* **13**, 359 (1967).
103. Vesco C., Penman S., *Biochim. Biophys. Acta* **169**, 188 (1969).
104. Wallace H., Birnstiel M. L., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 296 (1966).
105. Watson M., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 257 (1955).
106. Wever G., *J. Cell Biol.* **27**, 112A (1965).
107. Wojtczak L., Załuska H., Zborowski J., w *Biochemistry of Intracellular Structures: Mitochondria and Endoplasmic Reticulum*, red. L. Wojtczak, W. Drabikowski, H. Strzelecka-Golaszewska, PWN Warszawa 1969, str. 75.
108. Woodard J., Gebler B., Swift H., *Exptl. Cell Res.* **23**, 258 (1961).
109. Woodard J., Rasch E., Swift H., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 445 (1961).
110. Zagórski W., *Post. Biochem.* **11**, 145 (1965).
111. Zenkteler M., *Wiad. Botan.* **4**, 31 (1960).
112. Zetsche K., *Naturwissenschaften* **51**, 18 (1964).

ADDENDUM

Już po oddaniu artykułu do druku ukazała się praca rozszerzająca dotychczasowe wyniki na ten temat (Das N. K., Micou-Eastwood J., Ramamurthy G., Alfert M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **67**, 968 (1970)). Autorzy badali syntezę RNA w jąderku niezaplodnionych jaj robaka morskiego *Urechis caupo* (typ *Echiuroidea*). Stwierdzili oni, że synteza wielkocząsteczkowego (o stałej sedymentacji 38S) rRNA prekursorowego odbywa się w rejonie fibrylarnym jąderka (czyli w jego rdzeniu), gdzie występuje DNA. Tam też zachodzi wstępna depolimeryzacja RNA prekursorowego, w wyniku której powstaje RNA 30S. Ten z kolei jest natychmiast przekazywany do rejonu granularnego jąderka (czyli strefy korowej — *cortex*), przy czym następuje jednocześnie poważna zmiana konformacyjna cząsteczek: włóknikowa struktura RNA zostaje zastąpiona przez ziarnistą strukturę rybonukleoproteidu.

RECENZJE

Włodzimierz Ostrowski — Elektroforeza w badaniach biochemicznych i klinicznych

Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1970 (str. 288 cena 42 zł)

Książka jest przeznaczona dla chemików analityków, w szczególności dla biochemików i analityków klinicznych.

Podręcznik-monografia o metodach elektroforetycznych W. Ostrowskiego wypełnia lukę w zestawie polskiego piśmiennictwa z zakresu metod chromatograficznych i elektroforetycznych. Obok obszernego podręcznika „Chromatografia” z 1956 roku ukazały się w ostatnim dziesięcioleciu różne monografie z dziedziny metodyki chromatograficznej i jej zastosowania, jak chromatografia w analizie leków, witamin, hormonów, aminokwasów i w badaniach aminoacydury, czy podręcznik chromatografii cienkowarstwowej. Brak było natomiast podstawowego podręcznika w zakresie elektroforezy.

Książka Ostrowskiego pt. „Elektroforeza w badaniach biochemicznych i klinicznych” — w małym formacie zawiera na 250 stronach bogaty, zwięzłe ujęty materiał z teorii i praktyki metody analitycznej zwanej elektroforezą z licznymi zastosowaniami głównie w biochemii i analityce klinicznej, a ponadto przegląd i charakterystykę różnych odmian i modyfikacji tej podstawowej metody analitycznej.

Na całość wydawnictwa składają się: Wstęp i rys historyczny, Część I poświęcona elektroforezie w roztworach i Część II o elektroforezie na nośnikach. Pozytywnie należy ocenić zwięzłość tekstu, jasny i krótki sposób przedstawienia w szczególności podstaw teoretycznych, jednolity układ, szczegółowe opisy aparatury opatrzone doskonałymi rysunkami, wyczerpujący przegląd wariantów, modyfikacji i odmian metodyki oraz bogaty materiał zastosowań. Część pierwsza zawiera dane podstawowe o klasycznej metodzie Tiseliusa, ponadto opisy i charakterystykę elektroforezy konwekcyjnej, mikroelektroforezy w roztworach swobodnych, elektroforezy mikroskopowej w zawiesinach, elektroforezy pasmowej, w roztworach, dielektroforezy i elektromagnetoforezy. W części drugiej autor opisuje elektroforezę na nośnikach, w szczególności najobszerniej elektroforezę bibułową nisko-, średnio- i wysokonapięciową, ponadto elektroforezę dwukierunkową i elektrochromatografię. Ta część zawiera liczne przykłady praktycznego stosowania elektroforezy w analizie jakościowej i ilościowej białek w płynach ustrojowych, peptydów, aminokwasów, kwasów nukleinowych, cukrów i niektórych innych substancji organicznych i nieorganicznych. Oprócz opisu elektroforezy bibułowej znajdujemy w tej części książki obszerne stosunkowo opisy elektroforezy na innych nośnikach, jak na żelu skrobiowym, agarowym, poliakrylamidowym, a w końcu elektroforezy na cienkich warstwach.

Piśmiennictwo, oddzielnie zebrane dla poszczególnych części, obejmuje przeszło 1200 pozycji bibliograficznych z uwzględnieniem wszystkich polskich prac. Dobre opracowanie językowe, poprawna terminologia, staranne rysunki uzupełniają całość tej pożytecznej książki.

Krytycznie mogłabym się odnieść do niealfabetycznie zestawionego piśmien-

nictwa i do braku „addendum” z uzupełnionym piśmiennictwem do 1969 roku. W celu usprawiedliwienia autora muszę podać, że okres produkcyjny, bynajmniej nie z winy autora, był niezwykle długi i ciągnął się przez długie lata. Autor w międzyczasie uzupełnił piśmiennictwo do 1966 roku i unowocześnił tekst, ale książka ukazała się na rynku księgarskim dopiero w końcu maja 1970 roku. Niewielki nakład (1300 egzemplarzy w sumie) jest zbyt skromny w stosunku do potrzeb. Niewątpliwie książka ta powinna się znaleźć w każdym laboratorium analitycznym, a w szczególności w biochemicznych i analitycznych pracowniach klinicznych.

J. Opieńska-Blauth

Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse organischer Verbindungen, tom I: „Organische Farbrenzien” red. J. J. Vejdelek i B. Kakac, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1969 (stron 804)

Powyższa monografia stanowi zaktualizowane i rozszerzone wznowienie podręcznika „Handbuch der Kolorimetrie” (3 tomy, 1962—1966). W odróżnieniu od dawnego wydania, obecne zawiera szerszy przegląd reakcji barwnych, stosowanych nie tylko w farmacji, biologii i medycynie, ale także w zakresie ogólnej chemii organicznej. Dalszą różnicą jest odmienny niż poprzednio układ materiału. Jest on uszeregowany w rozdziały według głównych typów odczynników organicznych, stosowanych w kolorymetrii, jak: fenole, aldehydy, ketony, chinony, związki z grupą nitrową, związki z grupą aminową, związki dwuazoniowe, barwniki itd.

Podrozdziały poświęcone poszczególnym odczynnikiem podają szczegółowo ich zastosowanie, pełne mechanizmy reakcji chemicznych, ogólne omówienie optymalnych warunków danej reakcji w zastosowaniu do kolorymetrii, obszerny wybór opisów wykonania oznaczeń kolorymetrycznych z zastosowaniem danego odczynnika.

Cennym uzupełnieniem każdego podrozdziału są tabele, podające wykaz literatury opisującej przykłady kolorymetrycznych oznaczeń na podstawie danej reakcji barwnej. Niezależnie od tabel każdy podrozdział zaopatrzone jest w spis literatury.

Szybkie odszukanie interesującej czytelnika reakcji kolorymetrycznej bądź odczynnika ułatwia obszerny indeks rzeczowy oraz alfabetyczny wykaz autorów.

Monografia Vejdeleka i Kakaca łączy umiejętnie stronę teoretyczno-chemiczną z praktycznym, analitycznym zastosowaniem najważniejszych odczynników organicznych w analizie kolorymetrycznej związków organicznych. Bogata literatura zgromadzona w monografii uwzględnia zakres reakcji barwnych, interesujących zarówno biochemika, jak chemika-organika, farmaceutę i lekarza.

Z tych względów książkę można polecić do użytku wszystkim pracownikom zajmującym się kolorymetrycznymi oznaczeniami związków organicznych.

J. Trojanowski

SPRAWOZDANIA

XIV Międzynarodowa Konferencja na temat: Biochemia Lipidów — metabolizm steroli; enzymy lipolityczne Lund (Szwecja) 9—12.VI.1970 r.

Organizatorem i gospodarzem Konferencji był prof. dr Bengt Borgström wraz z zespołem pracowników Oddziału Chemii Fizjologicznej Centrum Chemicznego Uniwersytetu w Lund. Konferencja poświęcona była dwu zagadnieniom: metabolizmowi steroli oraz enzymom lipolitycznym.

W sympozjum, zgodnie z założeniami regulaminu, wzięło udział 150 uczestników, a obrady odbywały się w jednej sekcji. Streszczenia referatów i doniesień zostały wydrukowane przed Konferencją, odrębnego druku pełnych tekstów nie przewiduje się.

W ramach tematu: „metabolizm steroli” wygłoszono 8 referatów plenarnych oraz 36 doniesień. J. de Gier z Utrechtu (Holandia) w pierwszym referacie plenarnym omówił aktualne i ważne zagadnienie znaczenia steroli dla przepuszczalności i właściwości naturalnych i sztucznych błon. Funkcja cholesterolu w błonach komórkowych zarówno zewnętrznych, jak i wewnętrznych sprowadza się do roli materiału impregnującego te błony, co powoduje obniżenie ich przepuszczalności. Autor przedstawił szereg dowodów doświadczalnych na poparcie takiego stanowiska, uzyskanych w wyniku badań przeprowadzonych na błonach sztucznych, tzw. liposomach, na błonach mycoplasma — zastosowanych pomysłowo w charakterze osmometru, oraz na krwinkach czerwonych. Wykazał on, że pochodne ketonowe steroli nie mogą zastąpić cholesterolu ani innych obojętnych steroli w tej funkcji, nie wykazując zdolności impregnowania błon.

Zagadnienia bilansu przemiany cholesterolu, roli krążenia jelitowo-wątrobowego cholesterolu i kwasów żółciowych oraz roli kwasów żółciowych w warunkach prawidłowych i w patologii były przedmiotem obszernych referatów wygłoszonych przez E. A. Ahrensa z Nowego Yorku (USA), E. H. Mosbacha z Nowego Yorku (USA), D. M. Smalla z Bostonu (USA) oraz A. F. Hofmanna z Rochester (USA). Dzięki wprowadzeniu bardzo pomysłowych technik badawczych, umożliwiających przeprowadzenie bezpośrednich pomiarów wydzielania składników żółci, ich wydalania oraz syntezy *de novo*, a także określanie puli kwasów żółciowych przy różnym stopniu zakłóceń krążenia jelitowo-wątrobowego, wykazano, że dzienna synteza cholesterolu w wątrobie człowieka mieści się w granicach od 300—3000mg na dobę, w zależności od dowozu kalorii w diecie, od sprawności reabsorpcji cholesterolu i kwasów żółciowych oraz wydajności krążenia jelitowo-wątrobowego. Dzienna reabsorpcja cholesterolu z przewodów pokarmowych nie przekracza 700mg (średnio 200—400mg) nawet przy znacznie wyższej podaży cholesterolu w diecie (Ahrens). Wchłanianie soli kwasów żółciowych w przewodzie pokarmowym wynosi 98% wydzielonych do żółci tych kwasów, a cała pula (około 1,0mMol) krąży z szybkością 10—12 cykli na dobę (Small, Mosbach).

Biosynteza kwasów żółciowych regulowana jest na zasadzie sprzężenia zwrotnego przez ilość kwasów żółciowych powracających do wątroby krążeniem zwrotnym. Hamowanie syntezy rozpoczyna się, gdy ilość ta wynosi 7mMoli na dobę, i jest

całkowite, gdy wartość ta przekroczy 10,3mMola na dobę. Jak wynika z przedstawionych na konferencji badań Mosbacha oraz Boyda i wsp. (Edynburg, Anglia), intensywność biosyntezy kwasów żółciowych regulowana jest na poziomie zespołu enzymów katalizujących 7- α -hydroksylację cholesterolu (cytochrom P-450, zależny od tlenu, zredukowany NADP oraz ciepłostabilnego czynnika cytoplazmatycznego), natomiast dalsze przekształcanie 7- α -hydroksycholesterolu jest niezależne od wielkości krążącej puli kwasów żółciowych.

Rolę fizjologiczną kwasów żółciowych i konsekwencje wynikające z zaburzeń ich wchłaniania badał Hofmann przy użyciu całkowicie nowej i bardzo pomysłowej techniki doświadczalnej, pozwalającej nie tylko na przeprowadzenie badań bilansowych, ale również na precyzyjne kontrolowanie różnego stopnia zaburzeń w krążeniu wrotnym składników żółci. Wyniki tych badań wskazują, że sole kwasów żółciowych, poza swoją podstawową rolą w solubilizacji produktów lipolizy i ich wchłanianiu oraz poza pełnieniem funkcji regulatorów biosyntezy na zasadzie represorów własnej syntezy, wykazują również właściwości pobudzania wydzielania wody i sodu do światła jelita grubego.

Współczesny stan badań nad mechanizmem syntezy kwasów żółciowych, a więc szczegółową sekwencję reakcji przekształcania cholesterolu w kwas cholowy i chenoodezoksycholowy, łącznie z problemem regulacji tej syntezy przedstawił w bardzo interesującym referacie H. Danielson z Sztokholmu (Szwecja).

W pozostałych doniesieniach pierwszej części Konferencji wiele uwagi poświęcono zagadnieniom transportu cholesterolu i innych obojętnych steroli przez śluzówkę jelita, w chłonce i w osoczu. Dużym zainteresowaniem cieszyło się doniesienie J. A. Glomsęta z Waszyngtonu (USA), który przedstawił szczegółową analizę lipoproteidów osocza u osób z rodziny o genetycznie uwarunkowanym braku enzymu acylotransferazy lecytyna:cholesterol. Badania te dostarczyły danych o fizjologicznej roli tego enzymu w osoczu.

W ramach sympozjum na temat enzymów lipolitycznych wygłoszono 7 referatów plenarnych oraz 16 doniesień. Lipazom tkankowym poświęcone były dwa referaty plenarne: M. Vaughan z Bethesdy (USA) — „Lipaza tkanki tłuszczowej wrażliwa na działanie hormonów” oraz T. Olivecrony z Umea (Szwecja) — „Lipazy lipoproteidowe”. W referatach tych omówiono przeglądowo rolę i fizjologiczne znaczenie lipaz tkankowych, ich swoistość substratową i cechy różniące je od lipazy trzustkowej. Na przykładzie wyników badań wykonanych na częściowo oczyszczonej lipazie lipoproteidowej z mleka krowiego Olivecrona wykazał, że w skład tego enzymu wchodzi reszta glukozoglikanowa w postaci siarczanu heparanu (wielocukier różniący się od heparyny ilością reszt siarczynowych). Hamowanie reakcji enzymatycznej przez stężenia soli mineralnych wyższe od określonego krytycznego stężenia soli sugeruje, że wzajemne oddziaływanie między poliwalencyjnymi jonami jest niezbędne dla przebiegu reakcji enzymatycznej. Ważne wydaje się również stwierdzenie, że heparynopodobne glukozoaminoglikany mogą wchodzić w połączenia z lipazą lipoproteidową, co autor udowodnił wykazując, że enzym ten jest wydatnie wiązany przez żel agarowy kowalencyjny związków z heparynoidami lub polianionami.

Większość pozostałych referatów plenarnych i doniesień sympozjum poświęcona była enzymom lipolitycznym trzustki. Z dużym zainteresowaniem spotkał się referat L. Sardy'ego z Marsylii (Francja), najbliższego współpracownika Desnuelle'a, który omówił strukturę i funkcję niektórych reszt aminokwasów wchodzących w skład lipazy trzustkowej. Lipaza ta składa się z dwóch izoenzymów o identycznym ciężarze cząsteczkowym i identycznym składzie aminokwasowym, a różniących się tylko zawartością glukozoaminy, przy czym obie te formy mają charakter glikoproteidowy. Spośród 13—14 reszt cysteinowych, zawartych w cząsteczce, tylko dwie mają wolną grupę -SH i, co zasługuje na podkreślenie, każda z tych grup

odznacza się inną reaktywnością. Jedna z nich jest łatwo dostępna i znajduje się „na powierzchni” cząsteczki enzymu prawdopodobnie w pobliżu miejsca wiążącego enzym, które ponadto zawiera niezbędne dla jego funkcji aminokwasy: serynę i histydynę.

Na temat swoistości substratowej lipazy trzustkowej oraz fizykochemicznych aspektów hydrolizy wiązania estrowego w lipolizie, z uwzględnieniem praw rządzących reakcjami przebiegającymi na granicy faz, wypowiedzieli się w sposób kontrowersyjny H. Brockerhoff z Halifax (Nowa Szkocja) oraz F. H. Mattson z Cincinnati (USA).

Szczegółową charakterystykę i kompletną strukturę I i II rzędową innego enzymu lipolitycznego trzustki — fosfolipazy A, przedstawił G. H. de Haas z Utrechtu (Holandia). Enzym ten, wytwarzany przez egzokrynową część trzustki w formie nieaktywnego prekursora, jest białkiem o ciężarze cząsteczkowym około 18 000, składającym się z 130 reszt aminokwasów połączonych w jedną nić polipeptydową, powiązaną poprzecznie 6 mostkami siarczkowymi. Łagodna trypsynoliza uwalnia z nieaktywnego zymogenu N-terminalnie zlokalizowany heptapeptyd, odsłaniając N-końcową alaninę, niezbędną dla wiązania substratu do enzymu. Sześć z ośmiu reszt lizyny rozmieszczonych jest w najbliższym sąsiedztwie C-końcowego odcinka tego białka, co może nasuwać przypuszczenie o jakiejś swoistej roli tego odcinka polipeptydowego dla przebiegu reakcji enzymatycznej. Modyfikacja chemiczna wolnych grup aminowych lizyny pozostaje jednak bez wyraźniejszego wpływu na aktywność enzymu.

G. Vahouny z Waszyngtonu (USA), C. Erlanson z Lund (Szwecja), H. Filipek-Wender z Poznania (Polska) oraz L. Kelly i wsp. z Ohio (USA) przedstawili wyniki swoich badań dotyczących trzeciego enzymu lipolitycznego trzustki i jelita — esterazy cholesterolowej. W doniesieniach tych szeroko omawiano kontrowersyjne poglądy na identyczność oraz swoistość substratową tego enzymu i na rolę soli kwasów trój- i dwuhydroksychoolanowych w reakcjach katalizowanych przez ten enzym. Należy podkreślić, że Vahouny, który przedstawił skład aminokwasowy oczyszczonego przez siebie enzymu, przypominający skład aminokwasowy lipazy trzustkowej, wykazał, że enzym ten różni się od lipazy brakiem tyrozyny. W wyniku trawienia trypsyną powstaje prawdopodobnie aktywny enzymatycznie peptyd o nieznanym bliżej składzie i niewiadomej funkcji fizjologicznej. Autor sądzi, że peptyd ten warunkuje aktywność enzymatyczną śluzówki jelita i uczestniczy w procesie restryfikacji cholesterolu wchłoniętego z światła jelita. Wydaje się, że pogląd ten jednak nie ma uzasadnienia, gdyż częściowo oczyszczona esteraza cholesterolowa śluzówki jelita jest białkiem wielcząsteczkowym (Filipek-Wender).

Obrady Konferencji cieszyły się ogromnym zainteresowaniem, czego wyrazem była pełna frekwencja uczestników oraz ożywiona dyskusja towarzysząca każdemu doniesieniu. W podsumowaniu Konferencji podkreślono dobitnie i wielokrotnie, że konferencje naukowe gromadzące niewielką liczbę uczestników obeznanych ściśle z określonym tematem obrad stwarzają optymalne warunki do wymiany poglądów naukowych.

Następna, XV Międzynarodowa Konferencja z cyklu „Biochemia lipidów”, odbędzie się w 1971 roku w Munster (NRF) i poświęcona będzie metodologii i chemicznej syntezie lipidów.

H. Filipek-Wender

KOMUNIKATY

*International Council of Scientific
Unions Abstracting Board (ICSU AB)*

Komunikat

Na dorocznym zebraniu ICSU AB w Columbus (Ohio, USA) postanowiono kontynuować realizację pierwszego etapu planu światowego systemu sieci informacyjnej (streszczenia i indeksy) w nauce i technologii.

Do członków ICSU AB zalicza się 11 największych światowych służb informacyjnych Anglii, Francji, NRF, USA i ZSRR. Pierwszy etap planu określa zasady współpracy między członkami sieci informacyjnej ICSU AB w nabywaniu, selekcji i wymianie dokumentów objętych działalnością tej sieci. Ma to zapobiec dublowaniu w nabywaniu czasopism, które występuje obecnie wśród głównych służb informacyjnych.

Według tego planu członkowie sieci informacyjnej z poszczególnych dyscyplin naukowych przejąłby odpowiedzialność za nabywanie i wybór artykułów z najważniejszych czasopism w ich dziedzinie. Artykuły, które mogłyby interesować inne dyscypliny, byłyby przekazywane w formie mikro (wraz ze streszczeniem autorskim i standardowym komputerowym opisem bibliograficznym) do odpowiedniej jednostki sieci informacyjnej bezpośrednio lub za pośrednictwem centralnej komórki rozdzielczej. Nabywanie i wybór artykułów z czasopism poświęconych dziedzinom wiedzy nie objętym działalnością służb informacyjnych należałoby do członków sieci ICSU AB zależnie od języka, w którym publikowane jest czasopismo; artykuły te byłyby kierowane do odpowiedniej specjalistycznej komórki tej sieci. Przewodniczącą ICSU AB dr Byron Riegel stwierdził, że wprowadzenie w życie i działanie światowego systemu sieci informacyjnych jest dla ICSU AB długofalowym zadaniem o pierwszorzędym znaczeniu. Współpraca członków sieci przy nabywaniu i selekcji dokumentów stanowi pierwszy ważny krok na drodze do tego celu.

Dr Riegel podkreślił, że taka współpraca pozwoli znacznie obniżyć koszt nabywania i selekcji materiałów przez poszczególnych członków sieci, jak również zmniejszy całkowity koszt dokumentacji naukowej w skali światowej. Każdy z członków sieci będzie nabywał i opracowywał znacznie mniej czasopism. Służby informacyjne obsługujące określoną dyscyplinę naukową w różnych językach będą nadal nabywały podstawowe czasopisma tej dziedziny, natomiast będą mogły zrezygnować ze znacznej ilości czasopism poświęconych głównie innej dyscyplinie. Dr Riegel jest zdania, że taki układ przyczyni się znacznie do uzyskania pełniejszej dokumentacji w każdej z dyscyplin. W rezultacie każdy z członków sieci informacyjnej będzie mógł otrzymać dane z kompletu opracowywanych przez sieć czasopism, których ilość ocenia się na około 35 000. Pierwszym krokiem w realizacji tego planu będzie uzgodnienie między członkami sieci wspólnej definicji opracowywanych tematów, procedury wyboru materiałów oraz form zapisu bibliograficznego, a także ustalenie stopnia dublowania czasopism obecnie opracowywanych przez poszczegól-

nych członków sieci informacyjnej. Plan ten wymaga także dokładnego zestawienia zapisów komputerowych prowadzonych przez członków sieci w celu sprawdzenia zgodności i możliwości wymiany tych zapisów, a także analizy używanych metod rejestracji; ostatecznym celem byłaby bezpośrednia wymiana streszczeń i pozycji indeksu między członkami sieci.

Członkami sieci informacyjnej ICSU AB są: *Astronomy and Astrophysics Abstracts*, *Bibliographie des Sciences de Terre*, *Bibliography and Index of Geology*, *BioSciences Information Service of Biological Abstracts*, *Bulletin Sygnaletique*, *Chemical Abstracts Service*, *Chemischer Informationsdienst*, *Science Abstracts*, *Physikalische Berichte*, *Referativnyj Zhurnal*, *Zentralblatt für Mathematik*. Sprawozdania z zebrania ICSU AB z czerwca 1970 roku zawierające opis pierwszego etapu planu światowego systemu sieci informacyjnej są do nabycia w sekretariacie ICSU AB, 17 rue Mirabeau, Paris 16^e, Francja, w cenie 15,0 dol. USA + opłata pocztowa.

ICSU AB zawiadamia, że ukazała się

*TENTATIVE LIST OF PUBLICATIONS OF ICSU SCIENTIFIC UNIONS,
SPECIAL AND SCIENTIFIC COMMITTEES AND COMMISSIONS
OF ICSU, YEAR 1969, AND CORRECTIONS AND ADDITIONS
TO THE 1968 LIST*

(Maj 1970 r., str. 44, cena 5,0 dol. USA + opłata pocztowa)

Wydawnictwo to jest obecnie w sprzedaży i można je otrzymać w sekretariacie ICSU AB, 17 rue Mirabeau, Paris 16^e, Francja.

.

ICSU AB zawiadamia o publikacji

*SURVEY OF THE ACTIVITIES OF THE ICSU SCIENTIFIC UNIONS,
SPECIAL AND SCIENTIFIC COMMITTEES AND COMMISSIONS
OF ICSU IN THE FIELD OF SCIENTIFIC INFORMATION
DURING THE YEAR 1969*

(Maj 1970 r., str. 365, tablice, cena 12,0 dol. USA + opłata pocztowa)

Sprawozdanie to przedstawia w skrócie działalność organów ICSU w dziedzinie informacji naukowej.

Wydawnictwo to ukazuje się regularnie, corocznie od 1965 roku. Zestawiono listę ponad 170 Komisji i Komitetów podając przy każdym informację ogólną (nazwa, nazwiska przewodniczącego, sekretarza, terminarz zebrań itp.), a także ogólny opis działalności i podsumowanie prac za rok 1969.

Wydawnictwo to jest obecnie w sprzedaży i można je otrzymać w sekretariacie ICSU AB, 17 rue Mirabeau, Paris 16^e, Francja.

SPIS TREŚCI

B. Czartoryska—Metabolizm glikolipidów	3
D. Hulanicka—Biosynteza cysteiny i jej regulacja w komórce bakteryjnej	27
R. Rudnicki—Biosynteza i przemiany kwasu absycynowego w roślinach	43
S. Kohlmünzer—Biosynteza alkaloidów indolowych	57
A. Jerzmanowski—Monoterpeny metylocyklopentanowe	75
T. Barankiewicz, M. Miler — Funkcje i metabolizm kwasu retinowego	91
L. Konarska — β -Glukuronidaza	105
M. M. Jeleńska—Kowalencyjne wiązania krzyżowe w kolagenie	137
E. J. Sikorska—Procesy związane z powstawaniem przeciwciał	151
T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski — Uorganizowanie strukturalno-metaboliczne jądra komórkowego	163
Recenzje książek (<i>J. Opieńska-Blauth, J. Trojanowski</i>)	181
XIV Międzynarodowa Konferencja na temat: Biochemia Lipidów — metabolizm steroli, enzymy lipolityczne, Lund (Szwecja) 9—12.VI.1970 (<i>H. Filipek-Wender</i>)	183
Komunikaty <i>International Council of Scientific Unions Abstracting Board</i> (ISCU AB)	187

W 2-gim zeszycie 17-go tomu ukażą się:

1. Błona jądrowa — *J. Malec*
2. Enzymatyczna organizacja błon mitochondrialnych — *L. Wojtczak*
3. Retikulum endoplazmatyczne a biosynteza białka — *S. Klita*
4. Struktura i funkcja błon chloroplastów — *B. Frąckowiak*
5. Budowa antygenowa błon komórek bakteryjnych — *W. Rossowski*
6. Heteropolisacharydy zwierzęcych błon komórkowych — *T. Sawicka, A. Piasek*
7. Biosynteza polisacharydów ściany komórkowej roślin wyższych — *W. Janiszowska, Z. Wojciechowski*
8. Antybiotyki inhibitorami biosyntezy ściany komórkowej bakterii — *Z. Ruczaj*
9. Biochemia aktywnego transportu jonów sodu i potasu — *S. Szmigielski*
10. Udział białek w transporcie przez błony komórkowe — *G. Dudek*
11. Insulina a proces transportu przez błony komórkowe — *K. Wiśniewski*

POSTĘPY BIOCHEMII

January 1971

ARTICLES IN POLISH

Volume 17

Number 1

B. Czartoryska—Metabolism of Glycolipids (Dep. Biochem. Inst. Hematol., Warszawa)	3
D. Hulanicka—Biosynthesis of Cysteine and its Regulation in Bacteria Cell (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	27
R. Rudnicki—Biosynthesis and Metabolism of Abscisic Acid in Plants (Dep. Plant Physiol. Inst. Pomology, Skierniewice)	43
S. Kohlünzer—Biosynthesis of Indole Alkaloids (Dep. Pharmacol. Pol. Acad. Sci., Kraków)	57
A. Jerzmanowski—Methylcyclopentane Monoterpenes (Dep. Plant Biochem. Inst. Biochem. Univ., Warszawa)	75
T. Barankiewicz, M. Miler—Function and Metabolism of Retinoic Acid (Inst. Botany Univ., Warszawa; Dep. Techn. Hyg. Nutr. High School Agricult., Warszawa)	91
L. Konarska— β -Glucuronidase (Dep. Gen. Chem. Med. School, Warszawa)	105
M. M. Jeleńska—The Covalent Cross-Links in Collagen (Dep. Radiobiol. and Health Protect. Inst. Nucl. Res., Warszawa)	137
E. J. Sikorska—Mechanism of Antibody Synthesis (Dep. Biochem. Immunol. Inst. Tuberculosis, Warszawa)	151
T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski—Structural and Metabolic Organization of the Cell Nucleus (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	163
Chronicle	181

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO
NAUKOWE

poleca serię

Pw¹

CHEMIA WSPÓŁCZESNA

- T. 8. B. Jakuszewski: Współczesne zagadnienia elektrochemii teoretycznej, zł 50.—
- T. 9. S. Ciborowski: Chemia radiacyjna związków nieorganicznych, zł 5.—
- T.10. S. Ciborowski: Chemia radiacyjna związków organicznych, zł 44.—
- T.11. B. Staliński: Magnetochemia, zł 48.—
- T.12. J. Kroh: Wolne rodniki w chemii radiacyjnej, zł 55.—
- T.13. Metody badawcze chemii koordynacyjnej, zł 55.—

Pw

Nakładem

*PAŃSTWOWEGO WYDAWNICTWA
NAUKOWEGO*

ukazała się praca

Prof. Bernarda Zabłockiego

PODSTAWY WSPÓŁCZESNEJ IMMUNOBIOLOGII

1970, s. 450 ilustr. pł. zł 78.—

„W pracy będącej wynikiem długoletniej działalności naukowej, autor zawarł podstawowe wiadomości dotyczące zarówno immunologii infekcyjnej, którą dziś można już nazwać klasyczną, jak i immunologii nieinfekcyjnej.

Immunologia współczesna wyszła poza zakres medycyny i stała się nauką ogólnobiologiczną, zwłaszcza jeżeli uwzględnić jej powiązanie z genetyką, embriologią, ontogenezą, filogenezą, biochemią antropologią, fizjologią i innymi działami nauk przyrodniczych. Stąd też termin „IMMUNOBIOLOGIA” użyty w tytule książki”.

Książka przeznaczona jest dla pracowników naukowych i studentów studiów przyrodniczych, medycznych i weterynaryjnych, lekarzy różnych specjalności oraz lekarzy weterynarii.

SPIS TREŚCI

B. Czartoryska — Metabolizm glikolipidów	3
D. Hulanicka — Biosynteza cysteiny i jej regulacja w komórce bakteryjnej	27
R. Rudnicki — Biosynteza i przemiany kwasu abscysynowego w roślinach	43
S. Kohlmünzer — Biosynteza alkaloidów indolowych	57
A. Jerzmanowski — Monoterpeny metylocyklopentanowe	75
T. Barankiewicz, M. Miler — Funkcje i metabolizm kwasu retinowego	91
L. Konarska — β -Glukuronidaza	105
M. M. Jeleńska — Kowalencyjne wiązania krzyżowe w kolagenie	137
E. J. Sikorska — Procesy związane z powstawaniem przeciwciał	151
T. Gołaszewski J. W. Szarkowski — Uorganizowanie strukturalno-metaboliczne jądra komórkowego	163
Recenzje książek (<i>J. Opieńska-Blauth, J. Trojanowski</i>)	181
XIV Międzynarodowa Konferencja na temat: Biochemia Lipidów — metabolizm steroli, enzymy lipolityczne, Lund (Szwecja) 9—12.VI.1970 (<i>H. Filipek-Wender</i>)	183
Komunikaty <i>International Council of Scientific Unions Abstracting Board</i> (ISCU AB)	187