

POLSKA AKADEMIA NAUK
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY
BIOCHEMII

KWARTALNIK

TOM VIII

1962

ZESZYT 1

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
WARSZAWA

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBÓLÓW

1. AMP — adenozyjodjednofosforan
2. ADP — adenozyjoddwufosforan
3. ATP — adenozyjotrójfosforan
4. CMP — cytydinojednofosforan
5. CDP — cytyjoddwufosforan
6. CTP — cytyjodtrójfosforan
7. CoA lub CoASH — koenzym A
8. ac-SCoA — acetylokoenzym A
9. DN (kwas) — kwas dezoksyrybonukleinowy
10. DPN — nukleotyj dwufosfopiryjowy
11. DPNH — postać zredukowana DPN
12. FAD — dwunukleotyj flawinoadenilowy
13. FADH₂ — postać zredukowana FAD
14. FMN — monokleotyj flawinowy
15. GMP — guanozyjodjednofosforan
16. GDP — guanozyjoddwufosforan
17. GTP — guanozyjotrójfosforan
18. GSH — postać zredukowana glutationu
19. GSSG — postać utleniona glutationu
20. IMP — inozyjodjednofosforan
21. IDP — inozyjoddwufosforan
22. ITP — inozyjotrójfosforan
23. P — ortofosforan
24. PP — pirofosforan
25. PAPS — adenozyjod-3'-fosforano-5'-fosforanosiarozan
26. RN (kwas) — kwas rybonukleinowy
27. TPN — nukleotyj trójfosfopiryjowy
28. TPNH — postać zredukowana TPN
29. UMP — uryjodjednofosforan
30. UDP — uryjoddwufosforan
31. UTP — uryjotrójfosforan
32. UDPG — uryjoddwufosforan glikozy
33. UDPGal — uryjoddwufosforan galaktozy

P O L S K A A K A D E M I A N A U K
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

Kwartalnik

TOM VIII

1962

ZESZYT 1

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor — Irena Chmielewska

Sekretarz — Witold Brzeski

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący — Józef Heller

Członkowie — Włodzimierz Mozołowski, Janina Opieńska-Blauth,
Bolesław Skarżyński

ADRES REDAKCJI

KATEDRA BIOCHEMII UW
Warszawa 22, Al. Żwirki i Wigury 6/8
tel. 22-22-91, wewn. 46

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1962

Nakład 1150 (998+152)	Oddano do składania 10.XI.61 r.
Ark. wyd. 12.0. Ark. druk. 10.2	Podpisano do druku w lutym 1962 r.
Papier druk. sat. kl. V 70 g, 70 × 100	Druk ukończono w lutym 1962 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 1840/61. H-49.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ. WARSZAWA

ZBIGNIEW RYSZARD GRABOWSKI*

O niektórych metodach badania kinetyki procesów enzymatycznych**

Some Methods of Enzyme Kinetics

Some aspects of the progress in the enzyme kinetics are reviewed: determination of the kinetic constants; methods of experimental study of the fast reactions; methods of interpretation of absolute values of kinetic constants and their dependence on temperature and pH .

Cechą charakterystyczną enzymów jest ich specyficzne działanie katalityczne. Nic też dziwnego, że badanie kinetyki katalizowanych przez nie procesów odgrywa podstawową rolę w pracach nad tą grupą białek. Zarys historyczny rozwoju tych badań ogłosił niedawno Segal (71).

Już w swych klasycznych badaniach Henri (47) stwierdził, że procesami enzymatycznymi rządzą te same prawa ilościowe, co i reakcjami prostych związków nieorganicznych i organicznych, jakkolwiek, ze względu na stopień złożoności procesów, tak doświadczenie jak i jego interpretacja napotykają tu często na większe trudności. Nic więc dziwnego, że szybki rozwój teorii i metod doświadczalnych kinetyki chemicznej w ostatnim dziesięcioleciu pociągnął za sobą ogromny postęp również i w dziedzinie kinetyki reakcji enzymatycznych.

Udoskonalono w tym czasie metody pomiaru szybkości reakcji, rozszerzając je zwłaszcza na reakcje bardzo szybkie i najszybsze. Wyniki pomiarów kinetycznych pozwalają dzisiaj nie tylko na porównywanie

* Docent dr, pracownik Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk.

**Stosowane symbole i skróty:

E — enzym; ES — kompleks enzym-substrat (kompleks Michaelisa); ΔF^0 — standardowa entalpia swobodna (energia swobodna) reakcji, w kal.mol^{-1} ; h — stała Plancka, $1,58 \cdot 10^{-34}$ kal.sek ; ΔH^0 — standardowa entalpia reakcji, w kal.mol^{-1} ; ΔH^* — entalpia aktywacji, w kal.mol^{-1} ; I — inhibitor; j.e. — jednostka entropowa, $\text{kal.stapien}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$; k — stała szybkości reakcji; K — stała równowagi; K_M — stała Michaelisa; K_M^* — stała Michaelisa zależna od pH ; M — mol.l^{-1} , jednostka stężenia; N — liczba Avogadro, $6,02 \cdot 10^{23}$ mol^{-1} ; P — produkt; $pK = -\log K$; R — stała gazowa, $1,98$ $\text{kal.stapien}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$; S — substrat; ΔS^0 — standardowa entropia reakcji, w j.e.; ΔS^* — entropia aktywacji, w j.e.; t — czas, w sek; τ — okres czasu, w sek; T — temperatura absolutna, w $^{\circ}K$; v — szybkość reakcji, w M.sek^{-1} ; V — graniczna szybkość reakcji, w M.sek^{-1} ; W — energia aktywacji w kal.mol^{-1} ; [] — stężenie, w M .

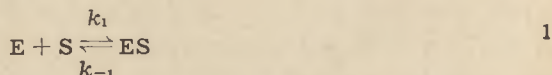
aktywności enzymów, ale częstokroć na identyfikację grup aktywnych enzymu i na głębokie wniknięcie w mechanizm procesu.

W referacie tym zajmiemy się tylko niektórymi aspektami kinetyki enzymatycznej: rozwojem metod formalnych, a więc obliczania poszczególnych stałych kinetycznych charakteryzujących układ enzymatyczny, rozwojem tych metod eksperymentalnych, które pozwalają na śledzenie kinetyki reakcji szybkich, oraz pewnymi metodami wnioskowania na podstawie danych kinetycznych o mechanizmie procesu. Zostaną natomiast pominięte pewne działy, jak analiza efektów izotopowych, wpływu inhibitorów i wpływu ciśnienia na szybkości reakcji oraz próby badania kinetyki enzymatycznej w warunkach biologicznych, w komórce.

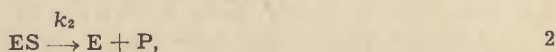
I. Wyznaczanie poszczególnych stałych kinetycznych

1. Kinetyka stanu stacjonarnego

Trwałą podstawę systematycznego ujęcia kinetyki procesów enzymatycznych stworzył Michaelis, przyjmując dla wyjaśnienia krzywoliniowej zależności szybkości reakcji od stężenia substratu, że w pierwszym stadium powstaje kompleks enzym-substrat (ES), zwany odtąd kompleksem Michaelisa:



W drugim stadium następuje rozkład kompleksu Michaelisa z wytworzeniem produktu oraz regeneracją wolnego enzymu:



tak że szybkość reakcji można wyrazić równaniem:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] \quad 3$$

Jeśli w pierwszym stadium założyc stan równowagi, to stężenie kompleksu ES, zgodnie z prawem działania mas, będzie równe:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K} \quad 4$$

Całkowite stężenie enzymu, $[E]_0$, równe jest sumie stężeń enzymu swobodnego, niezwiązanego, $[E]$, oraz kompleksu Michaelisa, $[ES]$. Podstawiając stąd

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad 5$$

do równania 4 i rozwiązując względem $[ES]$, otrzymujemy:

$$[ES] = \frac{([E]_0 - [ES])[S]}{K} = \frac{[E]_0[S]}{K + [S]} \quad 6$$

Podstawienie równania 6 do równania 3 prowadzi do otrzymania równania Michaelisa i Menten (64):

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_M + [S]} \quad 7$$

Równanie to, wyprowadzone pierwotnie na podstawie badań nad działaniem inwertazy na cukry, opisuje zadowalająco kinetykę ogromnej liczby reakcji enzymatycznych i stanowi po dziś dzień punkt wyjścia większości analiz kinetycznych.

Stała Michaelisa, K_M , miała w tym rozumowaniu sens fizyczny stałej nietrwałości kompleksu ES. Reakcje 1 i 2 stanowią jednak układ reakcji konsekwentnych (następczych). W takim układzie całkowita szybkość reakcji jest określona przez „wąskie gardło”, czyli przez szybkość stadium najwolniejszego. Może to być w pewnych przypadkach stadium 2, w innych — stadium 1.

Briggs i Haldane (12) wykazali, że założenie stanu równowagi, tj. założenie: $k_1 \ll k_{-1}$ nie jest wcale konieczne do wyprowadzenia równania Michaelisa i Menten. Wystarczające jest do tego założenie stanu stacjonarnego. W stanie stacjonarnym szybkości wszystkich stadiów reakcji są jednakowe, tak że

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}, \quad 8$$

a stężenie produktu pośredniego jest stałe, czyli:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad 9$$

Co prawda, stan stacjonarny może być zrealizowany tylko w układzie otwartym, do którego ciągle doprowadzany jest substrat, a z którego usuwany jest produkt (takim układem jest organizm żyjący), podczas gdy pomiarów kinetycznych dokonuje się z reguły w układzie zamkniętym, w którym stężenie substratu powoli maleje, a wraz z nim maleje i stężenie kompleksu Michaelisa; występują tu jednak stany *quasi*-stacjonarne, w których warunek 9 jest pierwszym przybliżeniem.

Szybkość powstawania kompleksu Michaelisa w układzie omawianych reakcji konsekwentnych będzie różnicą szybkości jego powstawania z substratu i enzymu, i szybkości jego zanikania na dwu drogach: odwrotnej przemiany w enzym i substrat oraz reakcji 2, prowadzącej do wytworzenia produktu:

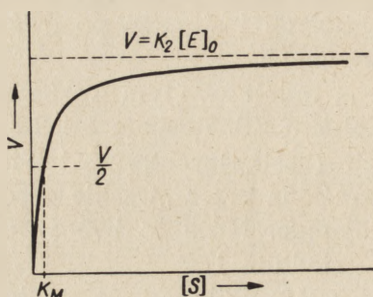
$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] = 0 \quad 10$$

Zastępując w tym równaniu $[E]$ przez $[E]_0 - [ES]$ i rozwiązując je względem $[ES]$ otrzymujemy ponownie równanie Michaelisa i Menten

(równ. 7). W tym przypadku tylko inny będzie sens fizyczny stałej Michaelisa:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad 11$$

Szybkość reakcji, opisywana równaniem 7, przedstawiona jest graficznie na rys. 1 jako funkcja stężenia substratu. Gdy wielkość $[S]$ staje



Rys. 1. Wykres równania Michaelisa i Menten (równanie 7)

się znacznie większa od K_M , można w mianowniku równania 7 zaniedbać K_M i równanie to uprościć do postaci

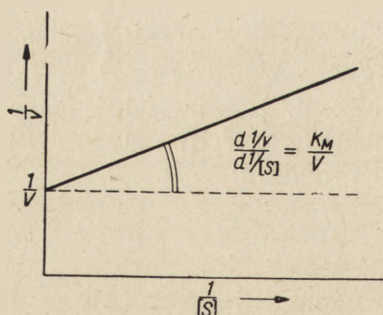
$$V = k_2 [E]_0 \quad 12$$

V oznacza tu graniczną maksymalną szybkość reakcji. Sposób wyznaczania K_M ukazany jest na rys. 1.

Dogodniejsza jest metoda znajdowania obu tych wielkości z prostoliniowego wykresu Lineweavera i Burka (rys. 2) (57), tj. z wykresu odwrotności równania Michaelisa:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_M}{V} \cdot \frac{1}{[S]} \quad 13$$

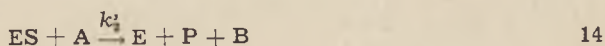
W przypadku wykresu linii prostej najłatwiejsze jest stwierdzenie zgodności danych doświadczalnych z równaniem i statystyczne ujęcie tej zgodności. Poza tym, wyznaczenie wielkości V oraz K_M przez ekstrapolację prostej jest łatwiejsze i dokładniejsze niż z wykresu podanego na rys. 1.



Rys. 2. Wykres Lineweavera i Burka (równanie 13)

Spośród trzech stałych szybkości reakcji, opisujących kinetykę układu reakcji 1 i 2, najłatwiejsze jest wyznaczenie wielkości k_2 , proporcjonalnej do tzw. liczby obrotów — z granicznej szybkości reakcji, na podstawie równania 12.

Stała k_2 traktowana jest tu jako stała szybkości reakcji rzędu pierwszego. W rzeczywistości reakcja 2 jest zwykle reakcją *pseudo*-pierwszego rzędu, tzn. reakcją bimolekularną, w której jeden z partnerów występuje w stałym stężeniu, np. H_2O w procesach hydrolizy. Jeżeli równanie reakcji 2 uzupełnić przez dodanie *explicite* drugiego substratu, A:



to równanie Michaelisa i Menten przybierze postać

$$v = \frac{k_2' [E]_0 [S] [A]}{\frac{k_{-1} + k_2' [A]}{k_1} + [S]} \quad 15$$

Tak uogólnione równanie stosuje się do reakcji wielu enzymów, w szczególności katalaz i peroksydaz, w przypadku których rolę partnera A odgrywa odpowiedni donor elektronów (16a). Gdy $[A] = const.$, równanie 15 sprowadza się do równania 7.

Kinetyka układów, opisywanych przez równanie 14 może być zanalizowana pełniej metodą Slatera (72). Jeśli przedstawić stałą Michaelisa jako

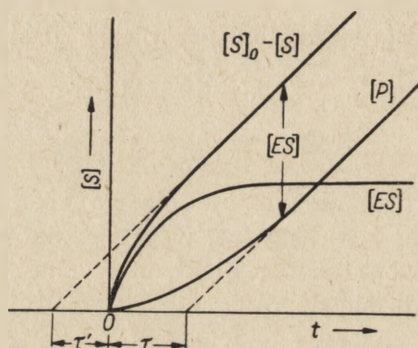
$$K_M = \frac{k_{-1} [E]_0 + V}{k_1 [E]_0} \quad 16$$

to przy zmianie V (przez zmianę rodzaju donora A) K_M staje się liniową funkcją wielkości V . Ekstrapolując tę linię prostą do $K_M = 0$, znajdujemy $V = -k_{-1} [E]_0$. W ten sposób wyznacza się wielkość k_{-1} , a następnie z równania 15 również k_1 . Tą metodą Slater obliczył stałe szybkości reakcji kilku enzymów oksydoredukcyjnych (72).

Liczba równań kinetycznych, lepiej lub gorzej opisujących reakcje enzymatyczne, jest dziś już ogromna. Z rozwojem kinetyki formalnej rozwiązuje się równania różniczkowe, opisujące coraz bardziej złożone układy np. reakcji konsekwentnych z wieloma stadiami pośrednimi (59) lub wieloma substratami (3). Do obliczeń stosuje się coraz częściej elektronowe aparaty matematyczne (18, 48a, 49). Różne postaci równań kinetyki enzymatycznej dyskutowane są w opracowaniach monograficznych (4, 25, 46, 55), w szczególności kinetyka procesów enzymatycznych przebiegających w obecności inhibitorów i aktywatorów (ogólniej: modyfikatorów) poszczególnych stadiów procesu. Wprowadzenie modyfikatora ułatwia czasem wyznaczenie stałych szybkości reakcji (73, 72, 8).

2, Kinetyka stanu przejściowego

Jeśli stała Michaelisa, K_M , nie spełnia kryteriów stałej równowagi, wówczas na podstawie danych uzyskanych w stanie stacjonarnym reakcji nie możemy na ogół obliczyć ani k_1 ani k_{-1} , ani ich stosunku. Do znalezienia tych wartości konieczna jest ponadto znajomość jeszcze jednego równania, niezależnego od równań 7 i 12. Niezbędne dane można uzyskać np. śledząc kinetykę reakcji w stanie „przed-stacjonarnym”, tj. w stadium początkowym reakcji (zaraz po zmieszaniu roztworów enzymu i substratu), gdy stężenie kompleksu ES ulega jeszcze zmianom. Typowe zmiany stężeń w tym stadium reakcji przedstawia rys. 3.



Rys. 3. Przebieg zmian stężeń w początkowym stadium reakcji

Badanie kinetyki ogromnie szybkich reakcji substrat-enzym (lub koenzym-apoenzym) możliwe jest głównie na dwu drogach. Jedną z nich jest prowadzenie reakcji w układzie tak silnie rozcieńczonym, że stadium początkowe trwa dostatecznie długo, by móc dokonywać pomiarów za pomocą odpowiednio czulej metody analitycznej. Taką metodą jest np. pomiar intensywności żółtej fluorescencji FMN, która zanika po związaniu tego nukleotydu z apoenzymem w żółty enzym Warburga (83, 81). Pomiar intensywności fluorescencji pozwala na oznaczanie swobodnego FMN w stężeniach rzędu 10^{-9} M, a więc o wiele niższych niż dające się oznaczyć najczulszymi metodami spektrofotometrycznymi.

Inną drogę, umożliwiającą w sposób bardziej uniwersalny badanie stadiów przejściowych, otworzył rozwój nowych metod doświadczalnych pozwalających śledzić przebieg reakcji w czasach bardzo krótkich, rzędu setnych i tysięcznych części sekundy (p. niżej, II).

Formalizm kinetyki stadium początkowego opracowany został przez Gutfreunda (39, 40) i rozwinięty przez innych autorów (52, 55a, 46). Ponieważ stężenie kompleksu ES w stadium początkowym nie jest stałe, przeto definiując szybkość reakcji zgodnie z równaniem 3 można

zrózniczkować to równanie jeszcze raz względem czasu. Po przekształceniach równanie kinetyczne przybiera postać

$$\frac{d^2[P]}{dt^2} + \frac{d[P]}{dt} k_1 ([S] + K_M) - k_1 k_2 [S] [E]_0 = 0 \quad 17$$

Po scałkowaniu równania 17 (z warunkiem początkowym dla $t = 0$: $\frac{d[P]}{dt} = 0$, bo produkt powstaje dopiero po uprzednim wytworzeniu kompleksu ES) równanie przebiegu reakcji w czasie ma postać:

$$[P] = [P]_0 + \frac{k_2 [E]_0 [S] t}{K_M + [S]} + \frac{k_2 [E]_0 [S]}{k_1 (K_M + [S])^2} \{ \exp [- k_1 t (K_M + [S])] - 1 \} \quad 18$$

Dla małych wartości t można wyrażenie eksponencjalne rozwinąć w szereg, odrzucając człony wyższe od kwadratowego. Pozostaje wówczas jako przybliżone wyrażenie:

$$[P] - [P]_0 = \frac{1}{2} k_1 k_2 [E]_0 [S] t^2 \quad 19$$

Dla dużych wartości t równanie 18 upraszcza się do zależności liniowej

$$[P] - [P]_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_M + [S]} t + \frac{k_2 [E]_0 [S]}{k_1 (K_M + [S])^2} \quad 20$$

Jeżeli prostą, przedstawioną równaniem 20, ekstrapolować do $[P] - [P]_0 = 0$, a więc do przecięcia z osią odciętych (rys. 3), wówczas punkt przecięcia wyznaczy na tej osi wielkość *okresu indukcji*, τ :

$$\tau = \frac{1}{k_1 (K_M + [S])} = \frac{1}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]} \quad 21$$

Równanie 19 lub 21 stanowi właśnie trzecie z układu niezależnych równań pozwalającego na wyznaczenie trzech stałych szybkości reakcji k_1 , k_{-1} i k_2 .

Równanie 17 sformułowane zostało przy założeniu, że nadmiar substratu jest na tyle duży, że mimo powstawania kompleksu Michaelisa można przyjąć: $[S] = [S]_0$. Przypadek bardziej ogólny, bez tego założenia, rozpatrzył S w o b o d a (78, 79). Przeprowadzając wykres funkcji $[S]_0 - [S]$, ekstrapoluje on jej część liniową do wartości zerowej i otrzymuje wówczas na ujemnej osi czasu odcinek odpowiadający okresowi indukcji

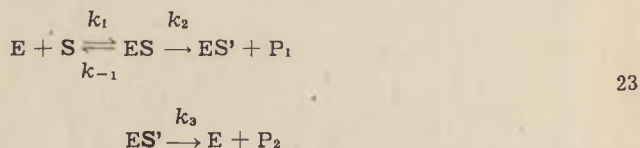
$$\tau' = \frac{1}{k_1 (K_M + [S]_0)} - \frac{1}{k_2} = \frac{1}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]_0} - \frac{1}{k_2} \quad 22$$

Oba sposoby graficznego wyznaczania okresu indukcji pokazane są na rys. 3.

Z dotychczasowych pomiarów wynika, że wszystkie znalezione stałe szybkości powstawania kompleksu Michaelisa są bardzo wielkie: prawie

we wszystkich przypadkach $k_1 > 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sek}^{-1}$. Oznacza to, że praktycznie każde zderzenie się cząsteczek enzymu i substratu prowadzi do powstania kompleksu a zatem szybkość jego powstawania jest określona przez szybkość dyfuzji partnerów reakcji. Równie wielkie są stałe szybkości reakcji wielu koenzymów z apoenzymami (82, 81). Niektóre wartości k_1 okazały się zgodne co do rzędu wielkości z obliczonymi teoretycznie dla szybkości dyfuzji enzymu i substratu, z uwzględnieniem czynników takich jak wielkość cząsteczki enzymu i ładunek grup reagujących (5).

Zwróćmy tu uwagę na przypadek innego niż rozpatrywany dotychczas przebiegu zmian, zachodzących w okresie indukcji. Jak stwierdzono, w procesie hydrolizy octanu *p*-nitrofenylu katalizowanej przez α -chymotrypsynę szybkość powstawania produktu (*p*-nitrofenolu) jest w stadium początkowym większa niż w stanie stacjonarnym. Wynika z tego, na podstawie równania 3, że stężenie kompleksu ES, z którego produkt ten powstaje, przechodzi w okresie indukcji przez maksimum. Schemat reakcji, zaproponowany w tym przypadku (41, 42), jest następujący:



Kompleks ES odszczepia *p*-nitrofenol (P_1), przy czym powstaje acetylo-enzym (ES'), który dopiero w następnym stadium hydrolizuje z wytworzeniem kwasu octowego (P_2) i z regeneracją wolnego enzymu.

W stanie stacjonarnym układu reakcji 23 szybkość powstawania produktu P_1 wyraża się wzorem

$$\frac{d[P_1]}{dt} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_M + [S] \left(1 + \frac{k_2}{k_3} \right)} \quad 24$$

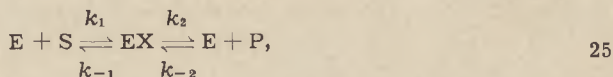
Mechanizm reprezentowany przez układ reakcji z dwoma kompleksami pośrednimi, którego kinetyka omawiana była i przez innych autorów (46, 54, 70), wydaje się mieć w różnych procesach enzymatycznych (9) bardziej ogólne znaczenie, niż do niedawna przypuszczano.

3. Kinetyka procesu odwracalnego

W badaniach kinetyki enzymatycznej pomiary prowadzi się z reguły w ten sposób, że szybkości reakcji wyznaczane w stanie stacjonarnym przy niewielkich stopniach przereagowania ekstrapoluje się do $t = 0$, wyznaczając w ten sposób tzw. początkową szybkość reakcji. Główną zaletą takiego postępowania jest eliminacja wpływu produktów reakcji,

które działają często jako inhibitory i w miarę nagromadzenia się zmieniają poważnie szybkość i kinetykę reakcji. Foster i Niemann do analizy przebiegu reakcji w czasie zamiast zwykłej postaci scałkowanego względem czasu równania Michaelisa i Menten (55.b) zastosowali na wielu przykładach z powodzeniem równanie, uwzględniające inhibicję przez powstające produkty (30, 31).

Wpływ produktów można jednakże ująć w sposób bardziej ogólny. Jedno z fundamentalnych praw kinetyki głosi, że katalizator przyspieszający jakąś reakcję, przyspiesza również i reakcję odwrotną. Z tego punktu widzenia wpływ produktu jako inhibitora sprowadzić się może do jego udziału jako substratu w reakcji przeciwnie skierowanej. Schemat najprostszej reakcji enzymatycznej (równania 1 i 2) sprowadza się wówczas do postaci:



gdzie kompleks Michaelisa oznaczono przez EX w celu podkreślenia jego symetrii względem substratu i produktu. Szybkość reakcji 25 w stanie stacjonarnym (1, 4) wyraża się wzorem:

$$v = \frac{(V_S/K_S)[S] - (V_P/K_P)[P]}{1 + [S]/K_S + [P]/K_P} \quad 26$$

przy czym symbole mają to samo znaczenie co w przypadku reakcji nieodwracalnej, ale odnoszą się do reakcji w jednym lub drugim kierunku:

$$V_S = k_2 [E]_0 \quad V_P = k_{-1} [E]_0 \quad 27$$

oraz

$$K_S = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad K_P = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} \quad 28$$

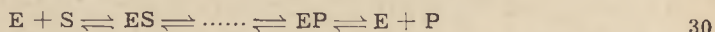
W rozwinięciu uwzględniającym reakcję odwrotną uzyskujemy wystarczającą liczbę czterech równań, 27 i 28, które pozwalają wyznaczyć wszystkie cztery stałe szybkości reakcji, występujące w układzie 25. Stałe k_2 oraz k_{-1} wyznacza się na podstawie równań 27 z maksymalnych szybkości reakcji w jednym i w drugim kierunku, a pozostałe dwie stałe z równań:

$$k_1 = \frac{V_S + V_P}{[E]_0 K_S} \quad \text{oraz} \quad k_{-2} = \frac{V_S + V_P}{[E]_0 K_P} \quad 29$$

Jedną z najlepiej zbadanych odwracalnych reakcji enzymatycznych jest uwodnienie kwasu fumarowego do kwasu l-jabłkowego wobec fumarazy. Między innymi wykazano, że stałe szybkości reakcji fumarazy tak z anionem fumaranu, jak i z anionem l-jabłczanu, są określone przez szybkość dyfuzji (7, 32). Bardziej szczegółowe zbadanie wpływu mocy jonowej roztworów wykazało, że tak jak w przypadku typowych

reakcji jonowych $\log k$ maleje liniowo z pierwiastkiem z mocy jonowej. Na tej podstawie można było stwierdzić, że grupa aktywna fumarazy, wiążąca substraty w kompleks Michaelisa, obdarzona jest ładunkiem elektrycznym $z = +2$ (5, 43).

Dla przypadków, gdy reakcja przebiega przez dwa lub więcej produktów pośrednich



opracowano teorię stanu stacjonarnego (66) w oparciu o ogólne ujęcie Christiansena kinetyki reakcji konsekwentnych (21). W mechanizmie 30, który zdaje się mieć ogólne znaczenie w odwracalnych procesach enzymatycznych, stałe szybkości k_1 i k_{-2} wyznaczone na podstawie danych stanu stacjonarnego nie są równe rzeczywistym wartościom stałych szybkości powstawania kompleksów Michaelisa, ale stanowią tylko ich dolną granicę.

II. Metody pomiaru kinetyki reakcji szybkich

1, Metody ciągłe

Klasyczną metodą pomiaru kinetyki reakcji było periodyczne pobieranie próbek i oznaczanie w nich produktu lub substratu jakąkolwiek dogodną metodą. Istotny postęp stanowi zastępowanie metod pomiaru periodycznego przez pomiary ciągłe. Pozwala to na przejście do badania reakcji szybszych niż dostępne badaniu metodami periodycznego pomiaru i na zwiększenie dokładności wyników; zastosowanie ciągłej rejestracji umożliwia przy tym dużo łatwiejszą i bardziej obiektywną eliminację przypadkowych odchyleń.

Najczęściej stosowaną metodą pomiaru ciągłego jest śledzenie zmian ekstynkcji przy określonej długości fali. Warunkiem koniecznym w tej metodzie jest istnienie wyraźnej różnicy w widmach absorpcji składnika oznaczanego i pozostałych składników układu. Takie różnice widmowe występują np. między zredukowanymi i utlenionymi formami enzymów oksydoredukcyjnych, między niektórymi koenzymami wolnymi a odpowiednimi enzymami, a w przypadku katalaz i peroksydaz między wolnym enzymem a kompleksem Michaelisa. W innych przypadkach można oznaczać niektóre substraty lub produkty o charakterystycznym widmie, np. nitrofenol w czasie hydrolizy jego estrów. Dzięki zastosowaniu wskaźników można czasem użyć metody widmowej również do pomiaru szybkich zmian pH .

Wygodną metodą ciągłego pomiaru stężeń wielu substratów lub produktów reakcji jest metoda polarograficzna (48, 20). Oznaczeniu mogą podlegać różnorodne związki w stężeniach 10^{-6} — 10^{-2} M, zdolne do

utlenienia lub redukcji elektrodowej, np. O_2 , H_2O_2 , endiole, chinony, związki zawierające takie grupy strukturalne, jak $-NO_2$, $>C=O$, $>C=N-$ i inne (37, 38). Bezpośrednia rejestracja prądu dyfuzyjnego przy określonym potencjale pozwala na wyznaczanie krzywych kinetycznych poczynając od kilkunastu sekund po zmieszaniu roztworów.

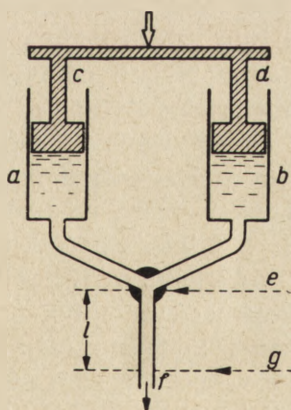
Metoda polarograficzna stosowana jest szczególnie często do oznaczania O_2 w roztworach. Przykłady oznaczeń innych substratów podane są w monografii Breziny i Zumana, poświęconej zastosowaniom polarografii w biochemii (11).

Do ciągłego pomiaru stężenia bez pobierania próbek znajdują nadto zastosowanie pomiary natężenia fluorescencji (p. wyżej, 1.2), pH , przewodnictwa elektrycznego, skręcania płaszczyzny polaryzacji światła i wiele innych metod fizykochemicznych.

Warto może podkreślić (choć nie było to jeszcze chyba stosowane w kinetyce enzymatycznej), że w każdej z metod pomiaru ciągłego, w której stężenie mierzone jest w postaci natężenia prądu lub napięcia — można pominąć żmudne i często niedokładne obliczanie szybkości reakcji ze zmian stężenia. Sygnał elektryczny można bezpośrednio zróżniczkować np. przez odpowiednie włączenie w obwód kondensatora, i rejestrować wprost szybkość reakcji jako pochodną stężenia względem czasu. Powinno to być szczególnie dogodnie do ekstrapolacji krzywej $v = f(t)$ do $t = 0$ w celu znalezienia szybkości początkowej.

2, Metody przepływowe

W każdej z omawianych nawet dowolnie szybkich metod pomiaru występowało ograniczenie związane z czasem mieszania roztworów rea-



Rys. 4. Schemat metody przepływowej: a, b — zbiorniki z roztworami reagentów; c, d — tłoki (lub ciśnienie) wyciskające roztwory ze zbiorników; e — komora mieszania; f — rurka obserwacyjna; g — punkt pomiaru; l — odległość punktu pomiaru od komory, wyznaczająca czas od momentu rozpoczęcia reakcji w komorze mieszania

gentów, przeto nie umożliwiały one badania krótkotrwałego — rzędu sekundy lub ułamków sekundy — początkowego stadium procesu enzymatycznego. Rozciągnięcie zakresu pomiarów do początkowych ułamków sekundy stało się możliwe dzięki zastosowaniu metod przepływowych. Do badania kinetyki szybkich reakcji w roztworach wprowadzili je po raz pierwszy Hartridge i Roughton (45, 69). Zasada metody przepływowej przedstawiona jest na rys. 4. Roztwory wypływają pod ciśnieniem z dwu zbiorników i zostają doprowadzone do komory mieszania, która może być różnej konstrukcji (68). Z komory tej mieszanina reagująca, już jednorodna, wypływa do kapilarnej rurki obserwacyjnej. Zamiast czasu, jaki upłynął od momentu rozpoczęcia reakcji, można mierzyć znacznie dogodniej wprost proporcjonalną doń odległość punktu obserwacji od komory mieszania. Do tego celu można zastosować odpowiednią, niekoniecznie nawet szybką, fizykochemiczną (najczęściej optyczną) metodę do pomiaru stężeń w danym punkcie rurki obserwacyjnej, tj. w danym czasie od rozpoczęcia reakcji. Czas mieszania można przy tym zmniejszyć na tyle, by rozpoczynać pomiary po upływie około 1 milisekundy od początku reakcji, co stanowi do tychczas dolną granicę możliwości badania okresu początkowego reakcji metodami przepływowymi.

Pomiary powtarzać można bądź w różnych punktach rurki obserwacyjnej, leżących na różnych odległościach od komory mieszania, bądź też w tym samym punkcie ale przy różnych szybkościach przepływu roztworu.

Büнау, De Maeyer i Matthies (13) zastosowali drugą z tych możliwości przy daleko idącej automatyzacji pomiaru. W stałej odległości od komory mieszania rejestrowali oni pełne widmo absorpcyjne układu, zmieniając automatycznie szybkość wyciskania roztworów ze zbiorników po zarejestrowaniu całego widma. Seria siedmiu widm, odpowiadających różnym czasom reakcji poczynając od milisekundy, pozwala już na dokonanie analizy kinetycznej.

Wadą prostych metod przepływowych, uniemożliwiającą często ich stosowanie do badania procesów enzymatycznych, była konieczność używania dużych objętości roztworów, rzędu litrów, a co najmniej kilkuset mililitrów. W 1940 r. Chance (14) udoskonalił metody przepływowe dostosowując je do badania małych objętości roztworów, wprowadzając metodę przyspieszonego przepływu i metodę zahamowanego przepływu. W udoskonalonej metodzie (34, 35) zahamowanego przepływu roztwory reagentów wyciskane są z dwu strzykawkę za pomocą dwu sprzężonych z sobą tłoków. Po przejściu przez komorę mieszania i rurkę obserwacyjną roztwór wpływa do innej, „odwróconej” strzykawki, wypychając z niej tłok aż do oporu. Następuje wówczas nagle zahamowanie przepływu cieczy i od tego momentu zestaw optyczno-elektronowy rejestruje już zmiany zachodzące w punkcie obserwacji

w czasie, poczawszy od czasu odpowiadającego odległości punktu pomiaru od komory mieszania. W ten sposób można było zredukować niezbędne objętości roztworów do 0,1 ml, nie zmniejszając czułości metody. Ważne było oczywiście zastosowanie dostatecznie czułej aparatury pomiarowej, np. pozwalającej mierzyć minimalne różnice ekstynkcji, oraz oscylografu katodowego do rejestracji krzywych kinetycznych (15). W niektórych przypadkach zastosowano precyzyjny pomiar zmian przewodnictwa elektrycznego (67).

Porównawcze omówienie aparatury przepływowej różnych typów podał Chance (16b), któremu zawdzięczamy większość prac z tej dziedziny. Przedmiotem jego badań były głównie katalazy i peroksydazy, w których to układach można było śledzić kinetykę powstawania kompleksu Michaelisa dzięki jego pasmu absorpcji (16a).

Dalszym postępowaniem jest opracowanie metody przepływu regeneratywnego (17), która dzięki wielokrotnej regeneracji stosowanego enzymu jeszcze bardziej zmniejsza ilość koniecznego do badań materiału.

3, Metoda prądów katalitycznych

Do pomiaru stałych szybkości bardzo szybkich enzymatycznych reakcji oksydoredukcyjnych wyzyskano również tzw. prądy katalityczne w polarografii (20a). Zilustrujemy to przykładem. Tlen redukuje się polarograficznie do H_2O_2 . W obecności katalazy zachodzi jednak w pobliżu elektrody szybki enzymatyczny rozkład dopiero co powstałego H_2O_2 na O_2 i H_2O . Następuje więc regeneracja tlenu zdolnego znów do redukcji elektrodowej; w ten sposób w obecności katalazy wzrasta prąd redukcji tlenu.

Matematyczne ujęcie tego typu reakcji nakładającej się na dyfuzję reagentów do — i od elektrody zostało opracowane przez Koutecký'ego (50). Pozwala ono obliczyć na podstawie danych polarograficznych stałą szybkości reakcji drugiego rzędu między substratem a enzymem. W przypadku katalazy znaleziono efektywną stałą szybkości reakcji równą $1,7 \cdot 10^7 M^{-1} \text{sek}^{-1}$ (51). Wartość tą jest porównywalna z wartością $k_1 = 1 \cdot 10^7 M^{-1} \text{sek}^{-1}$ znalezioną metodą przepływową (19). Polarograficznie wyznaczono wprawdzie tylko efektywną stałą szybkości reakcji drugiego rzędu, a mianowicie:

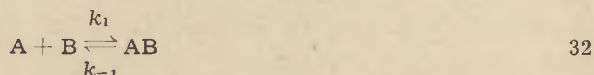
$$\frac{v}{[E]_0 [S]} = \frac{k_2}{K_M} = \frac{k_2 k_1}{k_2 + k_{-1}} \quad 31$$

ale wyrażenie to upraszcza się i staje się równe k_1 gdy $k_2 \gg k_{-1}$, co rzeczywiście stwierdzono w przypadku katalaz (19, 18).

Zastosowanie metody prądów katalitycznych do badania reakcji hemu z H_2O_2 , podają Brezina i Zuman (11).

4, Metody relaksacyjne

W ostatnich latach opracowano szereg metod wyznaczania stałych szybkości reakcji na podstawie pomiarów przeprowadzanych — wbrew zwyczajom klasycznej kinetyki chemicznej — w pobliżu stanu równowagi. W tych warunkach każdy układ, niezależnie od stopnia swego skomplikowania (reakcje dowolnego rzędu, również konsekwentne i konkurujące), zbliża się do stanu równowagi eksponencjalnie, a więc w sposób formalnie przypominający reakcję pierwszego rzędu. Rozpatrzmy najprostszy przykład reakcji:



Szybkość takiej reakcji jest równa:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_1[A][B] - k_{-1}[AB] \quad 33$$

Jeśli układ jest bardzo bliski stanu równowagi, wówczas możemy wyrazić stężenia poszczególnych partnerów reakcji, np. A, w postaci

$$[A] = [A]_{\infty} + x, \quad \text{gdzie} \quad x \ll [A]_{\infty} \quad 34$$

przy czym $[A]_{\infty}$ oznacza stężenie w stanie równowagi. Analogicznie można wyrazić stężenia B oraz AB. Podstawiając następnie równanie 34 do równania 33 otrzymujemy:

$$\begin{aligned} -\frac{dx}{dt} &= k_1([A]_{\infty} + x)([B]_{\infty} + x) - k_{-1}([AB]_{\infty} - x) = \\ &= k_1[A]_{\infty}[B]_{\infty} + k_1[A]_{\infty}x + k_1[B]_{\infty}x + k_1x^2 - k_{-1}[AB]_{\infty} + k_{-1}x \end{aligned} \quad 35$$

W sumie po prawej stronie równania 35 wyrazy pierwszy i piąty znoszą się zgodnie z definicją równowagi, a wyraz czwarty można zaniedbać jako małą wyższego rzędu. Pozostaje wyrażenie

$$-\frac{dx}{dt} = x\{k_1([A]_{\infty} + [B]_{\infty}) + k_{-1}\} \quad 36$$

a po jego scałkowaniu:

$$x(t) = x(0) \exp[-\{k_1([A]_{\infty} + [B]_{\infty}) + k_{-1}\}t] = x(0) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad 37$$

Wielkość

$$\tau = \frac{1}{k_1([A]_{\infty} + [B]_{\infty}) + k_{-1}} \quad 38$$

nazywamy *czasem relaksacji* reakcji 32.

Czasy relaksacji w odwracalnej reakcji enzymatycznej można wyznaczać np. przygotowując roztwór o stężeniach substratów i produktów bliskich stanu równowagi, dodając do tego roztworu enzymu i od tej chwili mierząc zmiany stężeń w czasie (44). Pomiarzy czasów relak-

sacji znalazły najważniejsze zastosowanie do badania kinetyki reakcji szybkich i najszybszych. W tym celu działaniem jakiegoś czynnika wytrąca się układ ze stanu równowagi i śledzi się proces osiągnięcia nowego stanu równowagi. Opracowano różnorodne metody zaburzania stanu równowagi (27, 61), wśród których wyróżniają się prostotą metody impulsowe: skoku temperatury (27, 23), ciśnienia (58, 76), natężenia pola elektrycznego (29). Polegają one na skokowej zmianie np. temperatury o kilka stopni, lub ciśnienia o kilkadziesiąt atmosfer. Skok taki może być zrealizowany w czasie bardzo krótkim, rzędu mikrosekund. Proces ustalania się nowego stanu równowagi śledzi się na ekranie oscylografu, mierząc przy tym ekstynkcję, przewodnictwo elektryczne lub inne wielkości.

Drugi wariant metod relaksacyjnych polega na periodycznym zakłócaniu stanu równowagi np. pod działaniem fali akustycznej. Gdy częstość fali akustycznej będzie równa $1/\tau$, wystąpi rezonans: energia dźwięku będzie wówczas maksymalnie pochłaniana w reakcji chemicznej. Przy tej częstości oprócz maksimum absorpcji pojawia się również anomalia na krzywej dyspersji szybkości dźwięku (80).

Różnorodne metody relaksacyjne pozwalają wyznaczać czasy relaksacji leżące w przedziale od sekund aż do 10^{-7} sekundy. W ten sposób zdołano zmierzyć m. in. szybkość reakcji zobojętnienia, $H^+ + OH^- = H_2O$, jako $k = 1,4 \cdot 10^{11} M^{-1} \text{sek}^{-1}$ (29).

W przypadku procesów złożonych, stanowiących układ sprzężonych z sobą reakcji cząstkowych, występuje nie jeden czas relaksacji, ale odpowiednie „widmo relaksacji”. Teoretycznie można przewidzieć dla danego układu liczbę czasów relaksacji oraz ich zależność od stałych szybkości reakcji i stężeń poszczególnych składników (28).

Podstawy obliczenia „widma relaksacji” dla odwracalnych układów enzymatycznych podali Alberty i Hammes (6, 44). W najprostszym przypadku odwracalnej reakcji enzymatycznej, wyrażonej równaniem 25, wszystkie stałe kinetyczne dają się wyznaczyć z pomiarów czasu relaksacji przy różnych stężeniach substratów.

Próby zastosowania metody skoku temperatury do badania kinetyki bardzo szybkich stadiów reakcji dehydrogenazy alkoholowej (dotychczas określanych jako „niemierzalnie szybkie”) przeprowadził Czeliński (22). Metodą analityczną był w tym przypadku bądź pomiar ekstynkcji, bądź pomiar natężenia fluorescencji.

Metody relaksacyjne niewątpliwie znajdują wkrótce szersze zastosowanie w badaniach szybkich, odwracalnych stadiów reakcji enzymatycznych — i dlatego zwracamy tu na nie szczególną uwagę.

Warto, już tylko nawiasem, wspomnieć o nowych metodach badania szybkości reakcji w stanie równowagi za pomocą jądrowego rezonansu magnetycznego (62) oraz elektronowego rezonansu spinowego (85). Obie te metody — choć na różnej zasadzie — wykorzystują zmiany

szerokości linii widmowych do wyznaczenia średniego czasu trwania danego indywiduum chemicznego w stanie równowagi. Mierzyć można czasy trwania leżące w przedziale 10^{-9} — 10^{-4} sek w przypadku rezonansu elektronowego (cząsteczki paramagnetyczne, wolne rodniki), względnie w przedziale 10^{-3} — 1 sek w przypadku rezonansu protonowego.

III. Interpretacja wyników

1. Wartości bezwzględne stałych

Już samo wyznaczenie bezwzględnych wielkości poszczególnych stałych szybkości reakcji lub stałych równowagi niejednokrotnie umożliwia wyciągnięcie pewnych wniosków, dotyczących mechanizmu procesu. Dalej idące wnioski wypływają ze znajomości cząstkowych pochodnych tych stałych względem różnych parametrów, takich jak temperatura, ciśnienie, *pH*. Wnioskowanie opierać się jednak musi na znajomości sensu fizycznego mierzonych stałych kinetycznych: dane bezwzględne mogą być fałszywe np. z powodu błędnie przyjętej masy cząsteczkowej enzymu lub liczby centrów aktywnych w enzymie.

Nawet w najprostszym przypadku procesu enzymatycznego spełniającego równanie 7 konieczne jest sprawdzenie, czy K_M jest rzeczywiście stałą nietrwałości z równania 4, czyli że $k_2 \ll k_{-1}$, aby można było przyjąć wielkość K_M za podstawę do obliczenia swobodnej entalpii powstawania kompleksu ES:

$$\Delta F_{ES}^0 = RT \ln K_M \quad 39$$

Najczęściej stosowanym kryterium równowagi w reakcji 1 jest zgodność danych kinetycznych z równaniami opisującymi wpływ inhibitorów lub modyfikatorów reakcji, wyprowadzonymi przy założeniu tego stanu równowagi. Sposoby postępowania sprawdzającego podaje m. in. Laidler (55.c) oraz Bernhard i Gutfreund (9).

Wielkość ΔF_{ES}^0 zależy od sposobu wiązania substratu przez grupy aktywne enzymu. Składać się na nią mogą oddziaływania dyspersyjne, kulombowskie i chemiczne. Oddziaływania pierwszego typu, wynikające z sił Van der Waalsa-Londona, są stosunkowo słabe i niespecyficzne, ale są z grubsza proporcjonalne do liczby oddziaływujących z sobą atomów jednej i drugiej cząsteczki. Gdy silnemu zbliżeniu ulegają liczne atomy cząsteczek enzymu i substratu, składowa ta może być rzędu $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, odgrywać więc będzie istotną rolę w przypadku płaskiego ułożenia substratu na powierzchni enzymu, zwłaszcza w przypadku substratu o niezbyt małej cząsteczce. Oddziaływania kulombowskie są większe, ale występują wyłącznie między grupami funkcyjnymi o swobodnych ładunkach elektrycznych. Wreszcie silne oddziaływania chemiczne charakteryzują się specyficznością względem ułożenia grup

reagujących w przestrzeni, ze względu na kierunkowość wiązań chemicznych. O roli tych oddziaływań świadczy m. in. fakt, że izomery optyczne substratów reakcji enzymatycznej działają często jako inhibitory konkurujące.

Przykładowo przytoczymy za Bernhardem i Gutfreundem (9) kilka przeciętnych wartości ΔF , dla wiązania pewnych grup strukturalnych przez „typową” powierzchnię białka: $-\text{CH}_3$: -500 kal·mol⁻¹ (siły dyspersyjne); $-\text{OCH}_3$ lub $-\text{C}_2\text{H}_5$: -900 (siły dyspersyjne, więcej oddziaływających atomów); $-\text{C}_6\text{H}_5$: -2000 (siły dyspersyjne, płaskie ułożenie pierścienia); $-\text{COO}^-$ lub $-\text{NH}^+$: -5000 (siły kolumbowskie, oddziaływanie z grupami $-\text{NH}_3^+$ względnie $-\text{COO}^-$ białka).

Modyfikując stopniowo strukturę substratu można czasem rozstrzygnąć w jaki sposób i jakimi grupami aktywnymi związane są z sobą w kompleksie substrat i enzym (9). Pamiętać przy tym należy, że inhibitory konkurujące traktowane być muszą na równi z substratami, tzn. wartości stałych K_M substratu porównywać należy z wartościami stałych K_I inhibitora konkurującego.

Ponieważ stałe k_1 określone są z reguły przez szybkość dyfuzji (p. wyżej, I.2), a więc są praktycznie niezależne od rodzaju substratów (o ile nie różnią się one zbytnio wielkością cząsteczek), przeto różnice w wielkościach stałych Michaelisa danego enzymu należy przypisać różnicom w wartości k_{-1} to jest stałych szybkości dysocjacji kompleksu.

2, Wpływ temperatury

Wpływ temperatury na szybkość procesu enzymatycznego wyraża się z reguły krzywą przechodzącą przez maksimum, ze względu na to, że w wyższych temperaturach wzrasta szybkość denaturacji enzymu. Znacznie poniżej temperatury optymalnej, zmiany szybkości reakcji z temperaturą mogą być jednak analizowane podobnie jak w prostych reakcjach chemicznych. Określone wnioski można wyciągnąć z zależności temperaturowych poszczególnych stałych kinetyki enzymatycznej: k_2 , K_M (o ile spełnia ona warunek stałej równowagi) lub K_I .

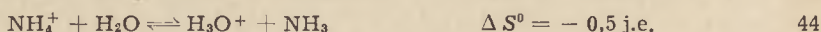
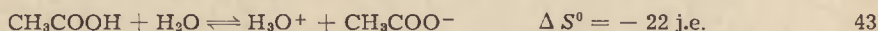
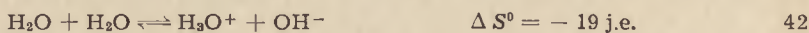
K_M , jako stała równowagi, zależy od temperatury w sposób określony równaniem 39 oraz tożsamością termodynamiczną:

$$\Delta F^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad 40$$

gdzie ΔH^0 oznacza standardową entalpię, a ΔS^0 — entropię reakcji. Entalpię reakcji wyznaczyć można z zależności $\log K_M$ od temperatury lub, wygodniej, z zależności od $1/T$:

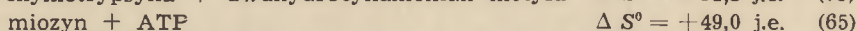
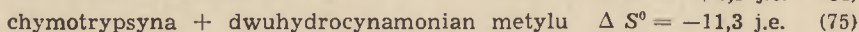
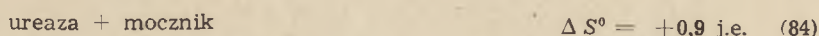
$$\Delta H^0 = -RT^2 \frac{d \ln K_M}{dT} = R \frac{d \ln K_M}{d(1/T)} \quad 41$$

Entropię reakcji obliczyć można łatwo z równania 40, znając ΔF^0 oraz ΔH^0 . Ma ona duże znaczenie poznawcze. Ogólnie: gdy następuje zwiększenie stopnia uporządkowania układu, zmniejszenie liczby stopni swobody, usztywnienie struktury molekularnej lub struktury rozpuszczalnika wokół ciała rozpuszczonego — entropia maleje. Dla przykłądu przytoczymy kilka prostych reakcji dysocjacji kwasowej (33):



Entropia reakcji 42 i 43 jest silnie ujemna, gdyż w wyniku rozdzielania ładunków z nienaładowanych cząsteczek powstały jony, wokół których następuje silna orientacja (usztywnienie, wzrost uporządkowania) dipoli wody. W reakcji 44 następuje tylko przeniesienie ładunku; liczba jonów nie ulega zmianie i entropia reakcji jest bliska zera. Podobne, choć mniejsze są efekty entropowe związane ze zmianą momentu dipolowego bez zmiany liczby ładunków. Zmiana entropii w reakcji powstawania kompleksu z dwu reagujących cząsteczek, związana ze zmniejszeniem się liczby cząsteczek, wynosi w roztworze wodnym ok. $-7,9 \text{ j. e.}$

Porównajmy kilka wartości ΔS^0 powstawania kompleksu Michaelisa:



Podczas gdy w dwu pierwszych reakcjach zmiana entropii jest mała i może być uważana za normalną, to w trzecim przypadku jest ona bardzo duża.

Duża, dodatnia entropia reakcji może wskazywać:

a) na zubożenie większej liczby ładunków elektrycznych (np. dodatnich ładunków miozynu przez ujemne ładunki ATP);

b) na rozwiniecie się cząsteczki w wyniku rozerwania licznych wiązań wodorowych i wzrostu liczby stopni swobody;

c) na skurczenie się cząsteczki bez zmiany liczby wiązań (np. rozciągnięcie kauczuku oznacza wzrost uporządkowania).

Udział zmiany ładunku (przypadek a) w entropii reakcji można ocenić m. in. na podstawie wpływu zmian stałej dielektrycznej w mieszanym rozpuszczalniku na wielkość K_M (55d). W przypadku miozynu badanie takie wykazało, że część elektrostatyczna entropii reakcji, odpowiadająca zmianie liczby ładunków, wynosi $+31 \text{ j. e.}$, odgrywa więc najpoważniejszą rolę (56). Jednakże i pozostała, nieelektrostatyczna składowa entropii reakcji jest dodatnia. Bliższe rozważania (55e) prowadzą do wniosku, że zubożeniu ładunków elektrycznych miozynu towarzyszy skurczenie się jego cząsteczki, która przed związaniem ATP pozostaje

stawiała rozciągnięta pod wpływem kulombowskiego odpychania się jednoimiennie naładowanych grup strukturalnych.

Dyskusję wpływu temperatury na stałe szybkości reakcji przeprowadza się analogicznie do przypadku stałych równowagi. Przedstawimy w tym celu stałą szybkości reakcji w postaci danej przez teorię kompleksu aktywnego (36):

$$k = \frac{RT}{Nh} \exp\left(-\frac{\Delta H^*}{RT}\right) \exp\left(\frac{\Delta S^*}{R}\right) \quad 45$$

gdzie N oznacza liczbę Avogadro, h — stałą Plancka, ΔH^* i ΔS^* — odpowiednio entalpię i entropię aktywacji.

Entalpia aktywacji jest związana z tradycyjnie obliczoną wielkością energii aktywacji

$$W = -R \frac{d \ln k}{d(1/T)} = \Delta H^* + RT, \quad 46$$

podczas gdy entropię aktywacji obliczyć można na podstawie równania 45 jako

$$\Delta S^* = R \ln\left(\frac{k N h}{RT}\right) + \frac{\Delta H^*}{T} \quad 47$$

Entropia i entalpia aktywacji przedstawiają sobą różnice wartości tych funkcji termodynamicznych dla kompleksu aktywnego i dla substratów danego stadium reakcji. Nie wchodząc bliżej w omawianie natury kompleksu aktywnego*, stwierdzimy tylko, że jest to nietrwała konfiguracja atomów, o czasie trwania rzędu 10^{-13} sek., odpowiadająca maksimum energii potencjalnej osiągananej przez układ reagujący w danym stadium reakcji (36, 33). Poznając wartości ΔS^* i ΔH^* możemy często wnikać w strukturę kompleksu aktywnego. Kompleks aktywny ma strukturę pośrednią między substratem a produktem danego stadium; np. w reakcjach jonowych będzie on miał z reguły ładunek równy sumie ładunków reagujących w tym stadium jonów, ale rozkład ładunków i konfiguracja atomów będą w nim inne niż w produkcie reakcji.

Interpretacja wielkości ΔS^* jest poza tym podobna do omówionej wyżej interpretacji ΔS^0 . Ciekawe, że ujemne entropie aktywacji powstawania kompleksu Michaelisa wykazuje chymotrypsyna, karboksypeptydaza, ureaza, natomiast dodatnią entropię aktywacji stwierdzono w przypadku reakcji pepsyny, trypsyny, a zwłaszcza miozyny (53). O ile znak ΔS^* w przypadku miozyny, trypsyny i pepsyny wydaje się zwią-

* Nie należy mylić pojęcia kompleksu aktywnego z kompleksem Michaelisa, ES. Na drodze reakcji 1—2 występują dwa maksima energii potencjalnej: pierwsza z nich odpowiada kompleksowi aktywnemu $(E + S)^*$ w stadium powstawania kompleksu Michaelisa, drugie kompleksowi aktywnemu $(ES)^*$ w stadium 2; między tymi maksimami leży minimum energii potencjalnej, odpowiadające związkowi chemicznemu ES. Kompleks aktywny nie jest natomiast związkiem chemicznym, lecz konfiguracją nietrwałą.

zany ze zubożeniem ładunków elektrycznych, o tyle ujemne entropie aktywacji w pozostałych przypadkach zdają się wskazywać na większą polarność kompleksu aktywnego niż substancji wyjściowych.

Entropia aktywacji stadium rozpadu kompleksu Michaelisa, reakcji 2, jest z reguły ujemna. Nie jest wykluczone, że oprócz innych czynników należy wziąć pod uwagę zmniejszenie liczby stopni swobody wskutek powstawania nowego wiązania, między substratem związanym już innymi wiązaniami w kompleks ES a grupą funkcjonalną enzymu aktywną dopiero w stadium 2.

Energia aktywacji reakcji, ograniczonej przez szybkość dyfuzji, powinna być bardzo mała, równa energii aktywacji procesu dyfuzji, tj. około $2 \text{ kkal} \cdot \text{mol}^{-1}$ w roztworach wodnych. Doświadczalnie znaleziona wartość energii aktywacji dla stadium 1 w reakcji katalazy i H_2O_2 rzeczywiście wynosi $1,5 - 2 \text{ kkal} \cdot \text{mol}^{-1}$, zaś w reakcji peroksydazy i H_2O_2 — jest praktycznie równa zeru (10).

Energia aktywacji rzędu kilkunastu lub więcej $\text{kkal} \cdot \text{mol}^{-1}$ wskazuje na powstawanie lub rozrywanie trwałych wiązań chemicznych. W przypadku gdy energia aktywacji jest mała, choć reakcja jest znacznie wolniejsza od procesu dyfuzji — można przypuszczać, że w stadium tym powstają lub zanikają tylko słabe wiązania typu Van der Waalsa-Londona.

Szczególnie ciekawy przypadek stanowi proces termicznej denaturacji białek. Jest to proces silnie endotermiczny, o energii aktywacji rzędu kilkudziesięciu $\text{kkal} \cdot \text{mol}^{-1}$, ale zarazem o bardzo dużej dodatniej entropii aktywacji, od 50 do 300 j.e. Denaturacja miozyny przy $\text{pH} = 7,0$ wykazuje $W = 70 \text{ kkal} \cdot \text{mol}^{-1}$ oraz $\Delta S^* = + 150 \text{ j.e.}$ (65). Ponieważ w procesie denaturacji nie stwierdzono skądinąd wyraźnych zmian ładunku, tak wysoką wartość ΔS^* przypisuje się zmianom strukturalnym. Najprawdopodobniej ulegają w wyższej temperaturze rozrywaniu liczne wiązania wodorowe, następuje rozwinięcie cząsteczki i zanik uporządkowania jej wtórnej struktury (55.f).

3. Wpływ pH

Aktywność enzymu wykazuje z reguły maksimum przy pewnej optymalnej wartości pH . Zmniejszenie aktywności po obu stronach maksimum może być związane bądź z nieodwracalną dezaktywacją enzymu w roztworach silnie alkalicznych lub silnie kwaśnych (o której mówić tu nie będziemy), bądź ze zmianami odwracalnymi. Te ostatnie przypisać można zmianom chemicznym, a mianowicie dysocjacji kwasowej lub zasadowej enzymu, substratu, lub kompleksu enzym-substrat.

Dysocjacja substratu jest łatwa do zbadania i uwzględnienie jej zwykle nie sprawia trudności w analizie kinetycznej. Istotnym postępowaniem było stworzenie metodyki badania dysocjacji grup aktywnych en-

zymów (55, 25, 2). W tym referacie ograniczymy się do przedstawienia pewnych sposobów analizy wyników.

Zmianie ładunku pod wpływem zmiany pH może ulec grupa enzymu aktywna w procesie wiązania substratu w stadium 1 (jon H^+ lub OH^- jako inhibitor kompetycyjny) lub grupa strukturalna kompleksu ES, aktywna w stadium 2 (hamowanie niekompetycyjne). Zastosowanie metod izolacji poszczególnych stałych kinetycznych przy różnych pH pozwala na rozróżnienie obu typów hamowania. Punkty załamania krzywej na wykresie $\log V$ względem pH wyznaczają wartości pK grup kompleksu ES, aktywnych w stadium 2. Pamiętać przy tym należy, że stężenie substratu, przy którym następuje praktyczne nasycenie enzymu substratem i szybkość reakcji zbliża się do wielkości granicznej V , zmienia się wraz z pH , bo zmianie ulega i wartość stałej Michaelisa. Wartość jej zależną od pH oznaczamy symbolem \tilde{K}_M , w odróżnieniu od K_M , stałej odnoszącej się do optymalnych warunków dysocjacji grup aktywnych.

Jeżeli dwie grupy (a i b) enzymu, aktywne w środkowym obszarze pH , dosocjują tracąc aktywność odpowiednio przy $pH > pK_a$ i przy $pH < pK_b$, to stężenie formy aktywnej enzymu będzie proporcjonalne do ułamka $1/f$, gdzie

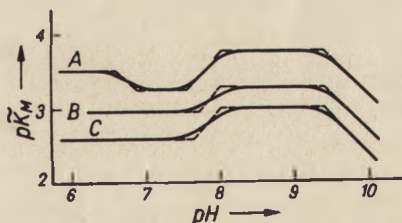
$$f = 1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b} \quad 48$$

Funkcję f nazywamy funkcją pH Michaelisa dla takiej właśnie formy aktywnej enzymu (63). Funkcja pH Michaelisa może mieć różną postać zależnie od tego, ile jest możliwych stopni dysocjacji i w którym z nich cząsteczka jest aktywna.

Wprowadzając odpowiednio funkcje f_E , f_{ES} , f_S dla aktywnych form enzymu, kompleksu ES oraz substratu, do równania 11, otrzymamy:

$$\tilde{K}_M = K_M \frac{f_S f_E}{f_{ES}} \quad 49$$

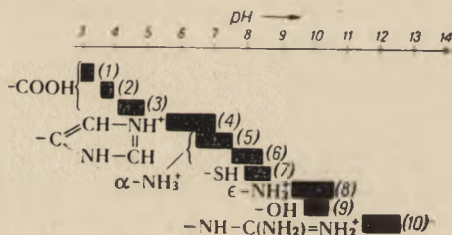
Dixon (24) wprowadził wygodną metodę analizy danych doświadczalnych na podstawie wykresu zależności $p\tilde{K}_M$ od pH ($p\tilde{K}_M \equiv -\log \tilde{K}_M$) Przykłady takich wykresów dla reakcji arylosulfatazy z kilkoma substratami (26) podano na rys. 5.



Rys. 5. Wykres zależności $p\tilde{K}_M$ arylosulfatazy od pH (26). Substraty: A — siarczan nitrokatecholu; B — siarczan p -nitrofenylu; C — siarczan p -acetylofenylu

Jak wynika z równania 49, załamania „wypukłe” na krzywych odpowiadają wartościom pK grup aktywnych enzymu lub substratu, załamania „wkłęsłe” — wartościom pK kompleksu Michaelisa. Na rys. 5 łatwo rozpoznać dwie wartości pK_E (8,1 oraz 9,4) i jedną wartość pK_{ES} (7,5—7,8), wspólne dla wszystkich trzech substratów. Ponadto na krzywej A widoczne są dodatkowe załamania, odpowiadające dysocjacji grupy fenolowej substratu wolnego ($pK = 6,5$) oraz grupy fenolowej substratu związanego w kompleks ES ($pK = 6,9$). W kompleksie Michaelisa kwasowość tej grupy OH uległa więc zmniejszeniu, prawdopodobnie w wyniku przesunięcia gęstości elektronowej, indukowanego przez przyłączenie atomu siarki grupy sulfonowej do elektroujemnej grupy aktywnej enzymu.

Analiza wartości pH grup aktywnych enzymu, substratu oraz kompleksu enzym-substrat pozwala czasem na identyfikację grup enzymu aktywnych w poszczególnych stadiach procesu. Znalezione wartości pK porównuje się z wartościami, charakteryzującymi poszczególne grupy dysocjujące spotykane w białkach (p. rys. 6), stosując w przypadkach wątpliwych dodatkowe kryteria wyboru. Takim dogodnym kryterium



Rys. 6. Wartości pK typowych grup kwasowych występujących w białkach: 1) grupa $-\text{COOH}$ w α -aminokwasach; 2) grupa $-\text{COOH}$ kwasu asparaginowego; 3) grupa $-\text{COOH}$ kwasu glutaminowego; 4) grupa imidazolowa histydyny; 5) grupa $\alpha-\text{NH}_3^+$ α -aminokwasów; 6) grupa $\alpha-\text{NH}_3^+$ cystyny; 7) grupa $-\text{SH}$ cysteiny; 8) grupa $\epsilon-\text{NH}_3^+$ lizyny; 9) grupa $-\text{OH}$ tyrozyny; 10) grupa guanidyniowa arginy.

uzupełniającym jest np. wyznaczenie wielkości ΔH^0 danej reakcji dysocjacji z zależności pK od temperatury:

$$\Delta H^0 = 2,3 R \frac{dpK}{d(1/T)} = -2,3 RT^2 \frac{dpK}{dT} \quad 50$$

i porównanie jej z opisanymi w literaturze wielkościami ΔH^0 dysocjacji grup kwasowych, wchodzących ewentualnie w rachubę.

Tą metodą stwierdzono np. że grupą, której dysocjacja hamuje reakcje papainy w roztworach alkalicznych, jest grupa tiolowa, $-\text{SH}$ (74). Krzywe $\log k_2$ względem pH wykazują załamanie, wskazujące na wielkość $pK_{ES} = 8,0-8,2$, a z danych w różnych temperaturach wynika $\Delta H^0 = 5-6 \text{ kkal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Ponieważ wielkości te są charakterystyczne dla grupy $-\text{SH}$, a skądinąd wiadomo, że papaina zawiera gru-

py tiolowe, można to uznać za identyfikację jednej z grup uczestniczących w stadium 2 hydrolizy. W ostatnich latach zidentyfikowano tymi metodami znaczną liczbę grup aktywnych w różnych enzymach.

Warto jednak zaznaczyć, że nie zawsze można opierać się na danych porównawczych tego typu co zestawione na rys. 6. Pod wpływem innych grup strukturalnych w cząsteczce wielkość pK danej grupy kwasowej może ulec daleko idącej zmianie; i tak pK grupy fenolowej, zwykle 9—10, wynosi w *p*-nitrofenolu zaledwie 7, a w pirydoksalu maleje aż do 5 (86).

Badania wpływu pH wykazały, że w procesie enzymatycznym z reguły uczestniczą co najmniej dwie grupy dysocjujące, przy czym w postaci aktywnej są one często obdarzone przeciwnymi ładunkami, jak $-\text{COO}^-$ oraz $-\text{NH}_3^+$. Ciekawy model takiego dwufunkcjonalnego działania łącznego znaleziono w przypadku kwasowo-zasadowej katalizy reakcji mutarotacji glikozy. Katalizatory kwasowo-zasadowe wykazują tym większą aktywność, im silniejszymi są kwasami lub zasadami. Mutarotacja glikozy katalizowana jest m. in. przez fenol oraz przez pirydynę. Otóż 2-hydroksypirydyna, łącząca w sobie grupy funkcjonalne obu tych związków, ale będąca kwasem słabszym od fenolu, a zasadą słabszą od pirydyny, katalizuje mutarotację glikozy 7.000 razy efektywniej niż mieszanina fenolu i pirydyny (77).

Na podstawie badania wpływu pH można dziś już stwierdzić, że tego rodzaju działanie łączne grup strukturalnych, z osobna pozbawionych własności katalitycznych, ale odpowiednio zorientowanych przestrzennie, stanowi często podstawę aktywności enzymatycznej białek.

LITERATURA

1. Alberty R. A., *Adv. Enzymol.* **17**, 1 (1956).
2. Alberty R. A., *J. Cell. Comp. Physiol.* **47**, Suppl. 1, 245 (1956).
3. Alberty R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1775 (1958).
4. Alberty R. A., w: *The Enzymes*, tom I; red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback; wyd. 2, Nowy York 1959; str. 143.
5. Alberty R. A., Hammes G. G., *J. Phys. Chem.*, **62**, 154 (1958).
6. Alberty R. A., Hammes G. G., *Z. Elektrochem.* **64**, 124 (1960).
7. Alberty R. A., Pierce W. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1526 (1957).
8. Bernhard S. A., *Discuss. Faraday Soc.*, **20**, 305 (1955).
9. Bernhard S. A., Gutfreund H., w: *Progress in Biophysics and in Biophysical Chemistry*, tom X; red. J. A. V. Butler, B. Katz; Oxford 1960; str. 115.
10. Bonnicksen R. K., Chance B., Theorell H., *Acta Chem. Scand.*, **1**, 685 (1947).
11. Brezina M., Zuman P., *Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy*, Nowy York 1958, str. 687.
12. Briggs G. E., Haldane J. B. S., *Biochem. J.* **19**, 338 (1925).

13. Büнау G. v., De Maeyer L., Matthies P., *Z. Elektrochem.*, **64**, 14 (1960).
14. Chance B., *J. Franklin Inst.*, **229**, 455, 613, 737 (1940).
15. Chance B., *Rev. Sci. Instruments* **22**, 619 (1951).
16. Chance B., w: Investigation of Rates and Mechanisms of Reactions, red. L. S. Friess, A. Weissberger (tom VIII Technique of Organic Chemistry, red. A. Weissberger), Nowy York 1953; (a) str. 627; (b) str. 690.
17. Chance B., *Z. Elektrochem.*, **64**, 7 (1960).
18. Chance B., Greenstein D. S., Higgins J., Yang C. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **37**, 322 (1952).
19. Chance B., Greenstein D. S., Roughton F. J. W., *Arch. Biochem. Biophys.*, **37**, 301 (1952).
20. Chodkowski J., Wstęp do polarografii teoretycznej, Warszawa 1958; (a) str. 120.
21. Christiansen J. A., *Z. physik. Chem.*, B **28**, 303 (1935); B **33**, 145 (1936).
22. Czerliński G., *Z. Elektrochem.*, **64**, 78, 131 (1960).
23. Czerliński G., Diebler H., Eigen M., *Z. physik. Chem. N. F.*, **19**, 246 (1959).
24. Dixon M., *Biochem. J.*, **55**, 161 (1953).
25. Dixon M., Webb E. C., *Enzymes*, Londyn 1958; (a) str. 62; (b) str. 107.
26. Dodgson K. S., Spencer B., Williams K., *Biochem. J.*, **61**, 374 (1955).
27. Eigen M., *Discuss. Faraday Soc.*, **17**, 194 (1954).
28. Eigen M., *Z. Elektrochem.*, **64**, 115 (1960).
29. Eigen M., De Maeyer L., *Z. Elektrochem.*, **59**, 986 (1955).
30. Foster R. J., Niemann C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **39**, 999 (1953).
31. Foster R. J., Niemann C., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1886, 3370 (1955).
32. Frieden C., Wolfe R. G., Alberty R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1523 (1957).
33. Frost A. A., Pearson R. G., *Kinetics and Mechanisms*, Nowy York 1953.
34. Gibson Q. H., *J. Physiol.* **117**, 49 P (1952)..
35. Gibson Q. H., *Discuss. Faraday Soc.*, **17**, 137 (1954).
36. Glasstone S., Laidler K. J., Eyring H., *The Theory of Rate Processes*, Nowy York 1941.
37. Grabowski Z. R., Prace Konferencji Polarograficznej, Warszawa 1956, str. 91.
38. Grabowski Z. R., w: J. Chodkowski, Wstęp do polarografii teoretycznej, Warszawa 1958, str. 178.
39. Gutfreund H., cytowany przez F. J. W. Roughtona, *Discuss. Faraday Soc.*, **17**, 116 (1954).
40. Gutfreund H., *Discuss. Faraday Soc.*, **20**, 167 (1955).
41. Gutfreund H., Sturtevant J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **42**, 719 (1956).
42. Gutfreund H., Sturtevant J. M., *Biochem. J.*, **63**, 656 (1956).
43. Hammes G. G., Alberty R. A., *J. Phys. Chem.*, **63**, 274 (1959).
44. Hammes G. G., Alberty R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1564 (1960).
45. Hartridge H., Roughton F. J. W., *Proc. Roy. Soc.*, **A 104**, 376 (1923).
46. Hearon J. Z., Bernhard S. A., Friess S. L., Botts D. J., Morales M. F., w: *The Enzymes*, tom I, red. P. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, wyd. 2, Nowy York 1959, str. 49.
47. Henri V., *Lois générales de l'action des diastases*, Paryż 1903.
48. Heyrovsky J., Zuman P., Wstęp do polarografii praktycznej, Warszawa 1956.

- 48a. Higgins J., w: Investigation of Rates and Mechanisms of Reactions, red. S. L. Friess, E. S. Lewis i A. Weissberger (tom VIII cz. 1) wyd. 2, Nowy York 1961, str. 285.
49. Klug A., Roughton F. J. W., *Discuss. Faraday Soc.*, **20**, 287 (1955).
50. Koutecky J., *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **18**, 311 (1953).
51. Koutecky J., Brdička R., Hanuš V., *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **18**, 611 (1953).
52. Laidler K. J., *Canad. J. Chem.*, **33**, 1614 (1955).
53. Laidler K. J., *Discuss. Faraday Soc.*, **20**, 83 (1955).
54. Laidler K. J., *Discuss. Faraday Soc.*, **20**, 277 (1955).
55. Laidler K. J., *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Oxford 1958; (a) str. 113; (b) str. 94; (c) str. 187; (d) str. 205; (e) str. 279; (f) str. 336.
56. Laidler K. J., Ethier M. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **44**, 338 (1953).
57. Lineweaver H., Burk D., *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).
58. Liunggren S., *Acta Chem. Scand.*, **12**, 1834 (1958).
59. Lumry R., *Discuss. Faraday Soc.*, **20**, 257 (1955).
60. Lumry R., w: *The Enzymes*, tom I, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck; wyd. 2, Nowy York 1959; str. 157.
61. Maeyer, L. De, *Z. Elektrochem.*, **64**, 65 (1960).
62. Meiboom S., *Z. Elektrochem.*, **64**, 50 (1960).
63. Michaelis L., Davidsohn H., *Biochem. Z.*, **35**, 386 (1911).
64. Michaelis L., Menten M. L., *Biochem. Z.*, **49**, 333 (1913).
65. Ouellet L., Laidler K. J., Morales M. F., *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**, 37 (1952).
66. Peller L., Alberty R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5907 (1959).
67. Prince R. H., *Z. Elektrochem.*, **64**, 13 (1960).
68. Roughton F. J. W., w: Investigation of Rates and Mechanisms of Reactions, red. S. L. Friess, A. Weissberger (tom VIII, *Technique of Organic Chemistry*, red. A. Weissberger), Nowy York 1953; str. 669.
69. Roughton F. J. W., *Z. Elektrochem.*, **64**, 3 (1960).
70. Sangster M., *Discuss. Faraday Soc.*, **20**, 277 (1955).
71. Segal H. L., w: *The Enzymes*, tom I; red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck; wyd. 2, Nowy York 1959; str. 1.
72. Slater E. C., *Discuss. Faraday Soc.*, **20**, 231, 308 (1955).
73. Slater E. C., Bonner W. D., *Biochem. J.*, **52**, 185 (1952).
74. Smith E. L., *J. Biol. Chem.*, **233**, 1392 (1958).
75. Snoke J. E., Neurath H., *J. Biol. Chem.*, **182**, 577 (1950).
76. Strehlow H., Becker M., *Z. Elektrochem.*, **63**, 457 (1959).
77. Swain C. G., Brown J. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2538 (1952).
78. Swoboda P. A. T., *Discuss. Faraday Soc.*, **20**, 275 (1955).
79. Swoboda P. A. T., *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 70 (1957); **25**, 132 (1957).
80. Tamm K., *Z. Elektrochem.*, **64**, 73 (1960).
81. Theorell H., *Discuss. Faraday Soc.*, **20**, 224 (1955).
82. Theorell H., Chance B., *Acta Chem. Scand.*, **5**, 1127 (1951).
83. Theorell H., Nygaard A. P., *Acta Chem. Scand.*, **8**, 877, 1649 (1954).
84. Wall M. C., Laidler K. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 299 (1953).
85. Weissman S. I., *Z. Elektrochem.*, **64**, 47 (1960).
86. Zuman P., informacja prywatna.

CHEMIA
ANALITYCZNA

DWUMIESIĘCZNIK

Tom VI - 1950/51

WARSZAWA 1951
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

IRENA SZUMIEL*

Stereospecyficzność enzymów

The Stereospecificity of Enzymes

The problem of enzymes stereospecificity is surveyed with special emphasis on ogston's three-point attachment- and Schwartz and Carter's meso-carbon atom theories.

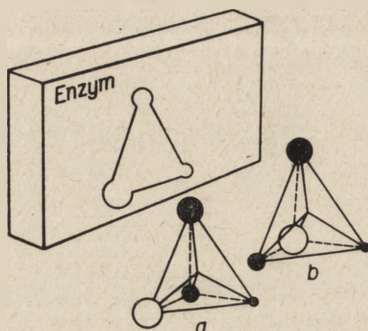
Znajomość zjawiska stereospecyficzności enzymów jest starsza niż sama nauka o enzymach. Jako pierwszy zaobserwował to zjawisko Pasteur w 1858 roku — a więc w 43 lata po odkryciu czynności optycznej związków organicznych przez Biota — poddając fermentacji mieszaninę kwasu winowego prawo- i lewoskrętnego. „Bez wątplenia” — napisał wtedy Pasteur — „rodzaj asymetrii właściwy budowie cząsteczkowej lewoskrętnego kwasu winowego jest jedyną przyczyną powodującą, że kwas ten nie ulega fermentacji w warunkach, w których kwas prawoskrętny ulega rozkładowi” (31).

Opracowanie teorii czynności optycznej związków organicznych przez Van't Hoffa i Le Bela (1874) i jednoczesny rozwój badań nad reakcjami enzymatycznymi umożliwiły w 1894 roku sformułowanie pierwszej teorii specyficzności enzymów. Emil Fischer obserwując różnice w powinowactwie do enzymu, zależne od budowy poddawanych fermentacji związków chemicznych (7, 8, 10) wysuwa hipotezę, że — aby zaszła reakcja — enzym i substrat muszą być wzajemnie dopasowane jak klucz do zamka (rys. 1). Oznacza to, że z dwóch „kluczy” czyli enancjomerycznych substratów — (antypodów optycznych) mających się do siebie jak przedmiot do swego odbicia — tylko jeden może pasować do otworu „zamka” — enzymu.

W ten sposób powstało pierwsze ujęcie stereospecyficzności enzy-

* Mgr, asystent Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

matycznej jako zdolności enzymu do reagowania z jedną tylko odmianą optycznie czynnego substratu.



Rys. 1. Schemat ilustrujący teorię „klucza-zamka” Fischera. Substrat *a* „pasuje” do otworu w powierzchni enzymu jak klucz do zamka; *a* i *b* — enancjomery.

I. Synteza asymetryczna

W ostatnich latach XIX wieku szczególną uwagę chemików zwracały związki optycznie czynne. Był to okres, kiedy entuzjaści teorii Van't Hoffa i Le Bela dostarczali coraz to nowych, potwierdzających ją faktów, kiedy gorączkowo badano znane związki asymetryczne i próbowano otrzymywać nowe. Otrzymanie enancjomerów związków optycznie czynnych było niełatwym zadaniem, ponieważ stosowane wówczas metody ich syntez prowadziły do mieszanin racemicznych. Rozdział tych mieszanin przeprowadzano przez stosowanie jednej z trzech klasycznych metod Pasteura. Były to: 1) mechaniczne oddzielanie kryształów odmian lewo- i prawoskrętnej, 2) rozłożenie jednej z odmian działaniem mikroorganizmów, 3) wytworzenie połączeń obu enancjomerów ze związkiem optycznie czynnym i frakcjonowana krystalizacja otrzymanych diastereoizomerów.

W tym okresie czasu stwierdzono, że w organizmach żywych związki optycznie czynne występują z reguły w postaci jednej odmiany. Zaczęto więc interesować się możliwościami otrzymywania czystych enancjomerów drogą chemiczną, bez stosowania metod rozdzielania racematów. Synteza dająca w wyniku zamiast mieszaniny racemicznej tylko jeden z enancjomerów, bądź też niejednakowe ilości enancjomerycznych produktów ze znaczną przewagą jednego z nich — zasługiwałaby na nazwę syntezy asymetrycznej. W 1901 roku, kiedy podjęto pierwsze próby takiej syntezy znany był już fakt, że przy powstaniu nowego asymetrycznego atomu węgla w cząsteczce optycznie czynnego związku teoretycznie możliwe formy nie muszą się bynajmniej tworzyć w jed-

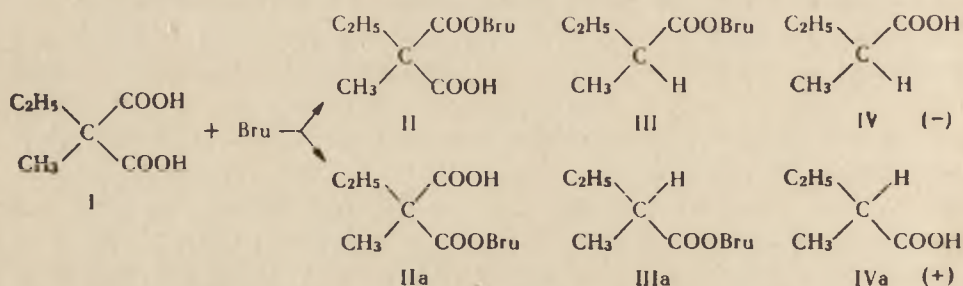
nakowych ilościach. Potwierdził to wielokrotnie Fischer w pracach nad przedłużaniem łańcucha węglowego aldoz. Dobudowa nowego asymetrycznego atomu węgla do związku optycznie czynnego o określonej konfiguracji może dać 2 epimery, z których jeden będzie przeważał. Reakcja taka często nazywana jest również syntezą asymetryczną, mimo, że jej produkty nie są enancjomerami mającymi się do siebie jak przedmiot do odbicia — lecz diastereoizomerami. Tak więc istnieją dwie definicje syntezy asymetrycznej. W pierwszej, pojętej szerzej — termin ten oznacza każdą reakcję, w której w sposób stereospecyficzny pojawia się lub znika atom asymetryczny. Druga, węższa, wprowadzona przez Marckwalda (24) określa jako asymetryczną każdą przemianę, w której symetryczny substrat w wyniku pośredniego działania optycznie czynnego katalizatora przechodzi w jeden z dwóch możliwych enancjomerów produktu. Obie te definicje są dziś używane, będziemy jednak posługiwać się tą, którą sformułował Marckwald. Różnicę sformułowania wyjaśnimy na następującym przykładzie. Synteza mannononozy przeprowadzona przez Fischera (6) w wyniku dobudowy do mannozy kolejno trzech atomów węgla nie jest z punktu widzenia Marckwalda syntezą asymetryczną mimo, że prowadzi do wytworzenia nowych centrów asymetrii. Natomiast reakcja rozszczepienie wytworzonej mannononozy do heksozy i triozy byłaby w tym ujęciu syntezą asymetryczną, bowiem prowadziłaby do wytworzenia jednego z enancjomerów triozy.

Fischer próbował wykorzystać zjawisko tworzenia się niejednakowych ilości diastereoizomerów do syntezy asymetrycznej (9). Otrzymywał on krystaliczną cyjanohydrynę helicyny, posiadającą wszystkie cechy jednorodnej substancji i próbował otrzymać z niej cyjanohydrynę aldehydu salicylowego, przewidując, że produkt ten będzie optycznie czysty. Okazało się jednak, że powstający związek niezwykle łatwo hydrolizuje, uniemożliwiając określenie skręcalności.

Podobne próby również zakończone niepowodzeniem przeprowadzili Cohen i Whiteley, Kipping oraz Fischer i Slimmer (cyt. wg 23).

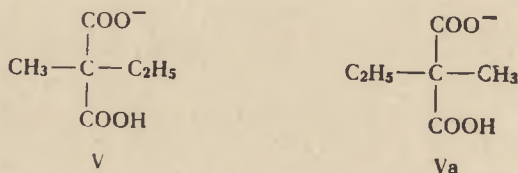
Dopiero w 1904 roku powiodła się synteza asymetryczna W. Marckwaldowi (23). Polegała ona na otrzymaniu kwasów (-) i (+)izowalerianowego (schemat 1, IV i IV a) z kwasu metyloetylomalonowego (I). Kwas ten powinien tworzyć z optycznie czynną zasadą dwie diastereoizomeryczne odmiany soli (II i IIa). W wyniku ich dekarboksylacji powinny powstać dwie diastereoizomeryczne odmiany soli brunecynowej kwasu izowalerianowego (III i IIIa). Sól tę Marckwald rozłożył rozcieńczonym kwasem siarkowym i uwolniony kwas izowalerianowy oddestylował z parą wodną. Otrzymał produkt optycznie czynny o skręcalności $[\alpha_D] = -1,7^\circ$ a zatem nie był on mieszaniną racemiczną. Ponieważ skręcalność właściwa kwasu (-)izowaleriano-

wego wynosi $[\alpha_D] = -17,85^\circ$, a zatem uzyskany kwas izowalerianowy zawierał o 10% więcej odmiany (-) niż odmiany (+). Na podstawie tej właśnie reakcji Marckwald sformułował wspomnianą poprzednio definicję syntezy asymetrycznej.



Schemat 1. Asymetryczna synteza kwasów (-) i (+) izowalerianowego według Marckwalda (43). Bru — brucyna.

Cohen i Patterson (cyt. wg 24) zaprotestowali przeciw nazwaniu syntezy Marckwalda asymetryczną, twierdząc, że roztwór kwasu metyloetylomalonowego zawiera dwa enancjomeryczne jony (V i Va)

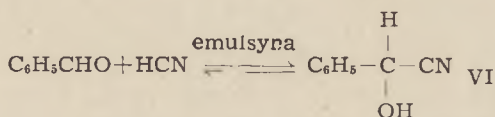


i że metoda Marckwalda jest po prostu odpowiednikiem sposobu rozdzielania racematu, opisanego przez Pasteura. Jednakże zarzut ten nie jest słuszny bowiem sól brucyny i kwasu metyloetylomalonowego powstaje również w środowisku eteru lub chloroformu, tak, że tworzenie soli nie musi być poprzedzone dysocjacją kwasu (24).

Nad syntezą asymetryczną pracowało następnie wielu znanych chemików (25). W ostatnich latach liczne prace z tej dziedziny wykonano w pracowni Preloga (34, 37—40), interesujące wyniki badań ogłosili też Doering (55) i Mosher (56, 57). Celem obecnie prowadzonych prac jest głównie wyjaśnienie mechanizmu syntezy asymetrycznej na podstawie analizy konformacyjnej i określenie konfiguracji związków pośrednich i produktów (35). Stwierdzono na przykład, że przyłączenie nowego podstawnika do atomu α węgla estru α -ketokwasu i optycznie czynnego alkoholu następuje od tej strony, z której znajduje się najmniejszy z podstawników przy asymetrycznym atomie węgla. Wpływ tego podstawnika na stereospecyficzność reakcji przyłączenia jest tym większy, im bardziej różni się on wymiarami od pozostałych podstawników i im bliżej atomu α -C kwasu leży centrum asymetrii alkoholu.

W ten sposób reakcja przebiega głównie poprzez najbardziej korzystny energetycznie produkt pośredni, z wytworzeniem niejednakowych ilości dwóch enancjomerów. Prawdopodobnie ta, stwierdzona przez C r a m a, pozwala przewidzieć, który z enancjomerów będzie przeważał w produkcji reakcji (3).

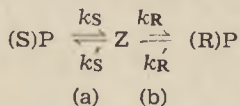
W cztery lata po opublikowaniu przez Marckwalda metody asymetrycznej syntezy kwasu izowalerianowego R o s e n t h a l e r (1908) (42, 53) przeprowadził pierwszą enzymatyczną syntezę asymetryczną *in vitro*. Była to reakcja otrzymywania (+)nityrylu kwasu migdałowego (VI) z aldehydu benzoowego i cyjanowodoru pod działaniem emulsyny — enzymu wydzielonego z migdałów. Reakcja miała następujący przebieg:



Jakkolwiek w reakcji aldehydu benzoowego z cyjanowodorem możliwe jest powstanie dwóch enancjomerycznych związków, emulsyna wykazuje absolutną stereospecyficzność, ponieważ optycznie czysty (+) nityryl jest jedynym produktem przemiany. W następnych latach stwierdzono, że emulsynę można zastąpić tak prostymi substancjami jak chinina i chinidyna, które jednak działają mniej skutecznie (B r e d i g i współpracownicy 1932—35 cyt. wg 18).

Na podstawie analizy kinetyki i termodynamiki procesów enzymatycznych W. K u h n (17) podaje teoretyczne wyjaśnienie możliwości otrzymania niejednakowych ilości enancjomerów z symetrycznego prekursora w reakcji z udziałem optycznie czynnego katalizatora.

Rozważmy taką reakcję:



Z — substrat (odpowiadający aldehydowi benzoowemu w syntezie R o s e n t h a l e r a — 42, 43)

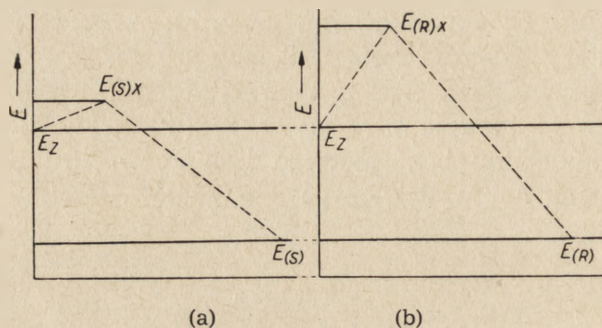
X — optycznie czynny katalizator

(S)P i (R)P — produkty o konfiguracji (S) i (R)*

Pierwszym etapem reakcji będzie utworzenie się kompleksu Z—X. Ponieważ cząsteczka katalizatora jest asymetryczna — powstaną dwa diastereoizomeryczne kompleksy (S)X i (R)X. Ich rozpad daje odpowiednio enancjomeryczne produkty (S)P i (R)P, znajdujące się na tym samym poziomie energetycznym. Synteza tak jednego jak drugiego prze-

* Sposób oznaczania konfiguracji przyjęty według C a h n a, I n g o l d a i P r e l o g a (1); jego omówienie można znaleźć w artykule C ie ś l a k a (2).

biega z takim samym spadkiem energii swobodnej. Powstawałyby więc one w wyniku reakcji w jednakowych ilościach, gdyby nie kompleks Z—X, istniejący w dwóch odmianach diastereoizomerycznych różniących się energetycznie (rys. 2).



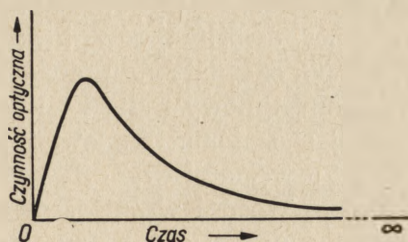
Rys. 2. Zmiany energii w czasie przebiegu syntezy asymetrycznej z wytworzeniem (S)formy i (R)formy produktu według (18); (a) — synteza (S)formy, (b) — synteza (R)formy. E_Z — poziom energetyczny substratu. $E_{(S)X}$ i $E_{(R)X}$ — poziomy energetyczne diastereoizomerycznych produktów pośrednich. $E_{(S)}$ i $E_{(R)}$ — poziomy energetyczne enancjomerów produktu końcowego.

Stałe równowagi reakcji (a) i (b) są jednakowe, ale różnice energetyczne między produktami pośrednimi reakcji pociągają za sobą różnice w stałych szybkości tworzenia (R)P i (S)P. Ilustrują to wzory:

$$K_{(a)} = \frac{k_S}{k'_S}; \quad K_{(b)} = \frac{k_R}{k'_R}; \quad K_{(a)} = K_{(b)} = K; \quad k_S \neq k_R$$

Katalizator nie wpływa na wartości $K_{(a)}$ i $K_{(b)}$, zwiększając k i k' w tym samym stopniu, im większa jednak różnica w energii produktów pośrednich, tym bardziej różnią się od siebie stałe szybkości k_S i k_R oraz k'_S i k'_R . W omawianym przykładzie (por. rys. 2) ustalenie się stanu równowagi między Z a (S)P następuje szybciej niż między Z a (R)P, co daje przewagę syntezie (S)P. W momencie kiedy w reakcji (a) ustali się równowaga pomiędzy (S)P i Z — a staje się to bardzo szybko, bowiem k_S ma dużą wartość liczbową — w reakcji (b) ciągle jeszcze istnieje przewaga przemiany Z w (R)P. Jeżeli zatem przeważająca forma produktu reakcji — (S)P — nie jest usuwana ze środowiska, zaczyna się ona przekształcać w formę enancjomeryczną (R)P, dopóki nie ustali się równowaga przemiany (b). Po pewnym czasie (tym dłuższym, im wyższa jest wartość stałej równowagi K) wystąpi stan równowagi między obiema formami produktu — wyrażający się spadkiem czynności optycznej. Na rys. 3 pokazana jest zależność między czasem kontaktu substratu i produktu z katalizatorem a czynnością optyczną powstałej mieszaniny enancjomerów. W układzie zamkniętym synteza asymetryczna możliwa jest więc tylko w pierwszej fazie reakcji, kiedy zwiększona w wyniku działania katalizatora szybkość przemiany (a)

pozwała jej wyprzedzić przemianę (b) w osiągnięciu stanu równowagi. Natomiast w układach biologicznych synteza asymetryczna jest niemal regułą, bowiem stan równowagi reakcji nie zostaje tu osiągnięty ze względu na szybkie usuwanie powstającego produktu.



Rys. 3. Zależność między czynnością optyczną powstałej mieszaniny enancjomeryów a czasem kontaktu substratu i produktu z katalizatorem według (18).

II. Enzymatyczne rozróżnienie dwóch jednakowych grup symetrycznego związku

1, Teoria Ogstona trójpunktowego przyłączenia substratu do enzymu

Dwadzieścia lat temu pojawiły się prace, których wyniki rozszerzyły pojęcie stereospecyficzności enzymów. Były to badania przemian enzymatycznych przy użyciu izotopów. Symetryczne substraty tych reakcji znakowano i śledzono losy grup zawierających atom znakowany. Wprowadzenie izotopu do jednego z dwóch identycznych podstawników w cząsteczce umożliwiało ich chemiczne rozróżnienie. Okazało się również, że możliwe jest rozróżnienie takich podstawników w reakcjach enzymatycznych. Wniosek o zdolności enzymów do wykrywania izotopów w podstawnikach substratu byłby jednak zbyt nieprawdopodobny, starano się więc wskazać taki przebieg reakcji, który tłumaczyłby obserwowany udział tylko z dwóch identycznych grup reagującej cząsteczki.

Pierwszą pracą tego typu były badania Wooda i współpracowników (52) nad przemianą metabolitów cyklu kwasów trójkarboksylowych przy użyciu znakowanego kwasu szczawiooctowego. Kwas ten (VII, schemat 2) otrzymali oni w reakcji przyłączenia znakowanego za pomocą ^{13}C dwutlenku węgla do pirogronianu. Oznaczając ^{13}C w wydzielonym w czasie przemian oddechowych dwutlenku węgla Wood i współpracownicy stwierdzili, że znaczne ilości $^{13}\text{CO}_2$ powstają w czasie oksydatywnej dekarboksylacji kwasu α -ketoglutarowego. Na podstawie tego faktu badacze ci wykluczyli udział kwasu cytrynowego w cyklu kwasów trójkarboksylowych, motywując swój wniosek następująco. Gdyby rozpatrywana przemiana zachodziła z udziałem kwasu cytrynowego (VIII) jako produktu pośredniego — powstałyby dwa typy

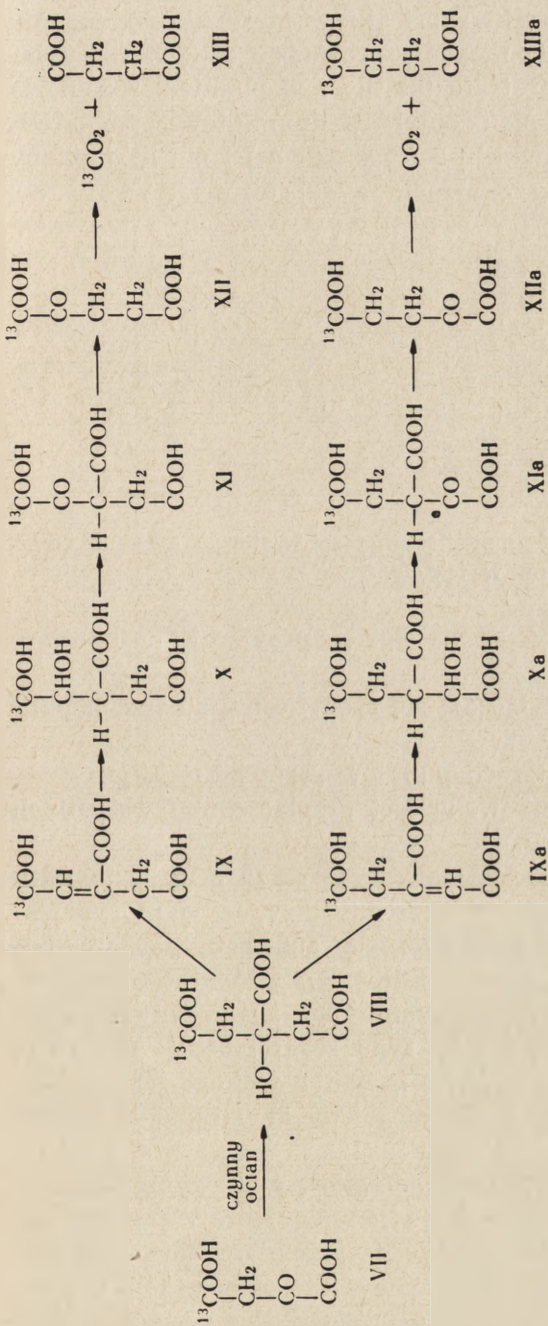
cząsteczek kwasu ^{13}C -akoniowego (IX i IXa) oraz dwa typy cząsteczek kwasu ^{13}C -izocytrynowego: jeden — z ^{13}C zawartym w grupie karboksylowej sąsiadującej z grupą $>\text{CHOH}$ (X) i drugi — z ^{13}C w grupie karboksylowej, sąsiadującej z grupą $>\text{CH}_2$ (Xa). Byłoby to następstwem symetrii cząsteczki kwasu cytrynowego. Dalsze przemiany doprowadziłyby do powstania dwóch typów kwasu α -ketoglutarowego (XII i XIIa), z których po oksydatywnej dekarboksylacji powstałby dwutlenek węgla i kwas bursztynowy (XIII i XIIIa) zawierające po połowie ilości wprowadzonego izotopu. Ponieważ w wyniku doświadczenia wykryto w dwutlenku węgla prawie całą ilość izotopu włączonego w kwas ^{13}C -szczawiooctowy, Wood i współpracownicy wyrazili pogląd, że kwas izocytrynowy musi powstawać z asymetrycznego prekursora, nie może nim być przeto kwas cytrynowy.

Rozumowanie to okazało się błędne; dziś wiemy, że kwas cytrynowy bierze bezpośredni udział w przemianach cyklu kwasów trójkarboksylowych (32, 33). Praca Wooda i współpracowników mimo błędnych wniosków była jednak bardzo cenna dla dalszego rozwoju badań nad stereospecyficznością enzymów.

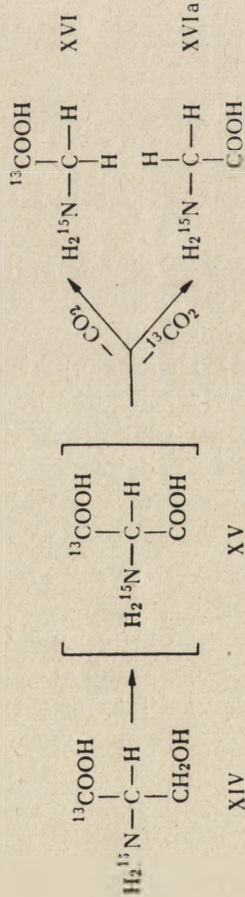
Podobne rozumowanie jak Wood i współpracownicy przeprowadził Shemin (45) interpretując wyniki badań nad przemianą L-seryny w glicynę. Do doświadczenia użyto L-seryny (XIV, schemat 3), zawierającej ^{13}C w grupie karboksylowej i ^{15}N w grupie aminowej. W powstałej glicynie (XVI) znaleziono znaczne ilości obu izotopów w tych samych grupach i na tej podstawie Shemin wykluczył możliwość przebiegu reakcji według schematu 3 — z symetrycznym kwasem aminomalonowym (XV) jako produktem pośrednim. Wniosek Shemina okazał się słuszny: kwas aminomalonowy nie jest istotnie produktem pośrednim przemiany seryny w glicynę, mimo iż rozumowanie jego było błędne, podobnie jak rozważania Wooda i współpracowników nad możliwością udziału kwasu cytrynowego w cyklu kwasów trójkarboksylowych.

W 1948 roku w *Nature* ukazała się krótka notatka Ogstona (29), w której podaje on hipotezę trójpunktowego przyłączenia substratu do enzymu, wyjaśniającą możliwość rozróżnienia przez enzym dwóch jednakowych podstawników symetrycznego substratu. Ogston przyjął mianowicie, że substrat przyłącza się do powierzchni enzymu w trzech punktach; dzięki temu położenie cząsteczki substratu wobec enzymu jest określone jednoznacznie.

Dla rozważanej przez Shemina dekarboksylacji kwasu aminomalonowego możliwość trójpunktowego połączenia z enzymem przedstawiona jest na rys. 4. Punkty 1, 2 i 3 oznaczają grupy czynne enzymu. Mogą one łączyć się specyficznie z odpowiednimi grupami substratu: 1 i 3 z $-\text{COOH}$, zaś 2 z $-\text{NH}_2$. Dekarboksylacja mogłaby mieć miejsce po przyłączeniu wszystkich trzech grup substratu, zachodząc wyłącznie w jednym punkcie na powierzchni enzymu, oznaczonym na rysunku

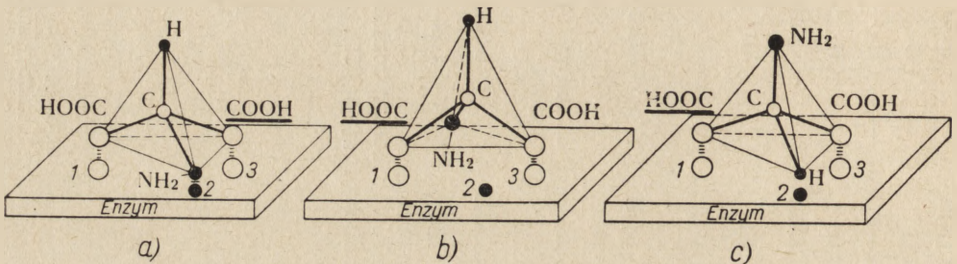


Schemat 2. Rozważany przez Woda i współpracowników schemat rozmieszczenia ¹³C w metabolitach cyklu kwasów trójkarboksylowych (52).



Schemat 3. Rozważany przez Shemina (45) schemat rozmieszczenia atomów izotopowych w produktach przemiany seryny w glicynę.

jako 3. Jedyne możliwe połączenie enzym-substrat spełniające omówione warunki — przedstawione jest na rys. 4a; dekarboksylacji uległaby tylko jedna z dwóch grup $-\text{COOH}$ (zaznaczona tłustym drukiem). Inne możliwe ustawienie cząsteczki substratu w stosunku do enzymu nie spełnia tych warunków i nie mogłoby prowadzić do dekarboksylacji. Gdyby obrócić cząsteczkę substratu tak, by nad punktem 3 znalazła się grupa $-\text{COOH}$, zaznaczona drukiem normalnym, to grupa $-\text{NH}_2$ nie mogłaby przyłączyć się do punktu 2 (rys. 4b i 4c) i nie nastąpiłoby trójpunktowe połączenie między enzymem a substratem.



Rys. 4. Teoria Ogstona trójpunktowego przyłączenia substratu do enzymu. Objasnienia w tekście.

W teorii trójpunktowego przyłączenia Ogston przyjmuje następujące założenia:

- 1) Trzy grupy substratu przyłączają się specyficznie do trzech punktów na powierzchni enzymu.
- 2) Tylko w jednym z tych trzech punktów zachodzi reakcja.
- 3) Możliwość reakcji uwarunkowana jest przyłączeniem wszystkich trzech grup substratu do enzymu.

Po spełnieniu tych trzech założeń zawsze ta sama grupa substratu przyłączona byłaby do miejsca na powierzchni enzymu, w którym zachodzi reakcja. W ten sposób z symetrycznego substratu mogłaby powstać tylko jedna odmiana produktu. Jeżeli jeden z identycznych podstawników substratu ulegających przemianie był znakowany atomem izotopowym — w produkcie zależnie od typu reakcji będzie całkowita ilość izotopu, lub nie będzie go wcale. Na przykład reakcja dekarboksylacji przedstawiona na schemacie 3 przebiegałaby albo tylko z wytworzeniem związku XVI, albo tylko związku XVIa.

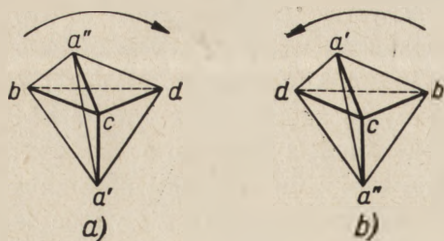
Rozważania Ogstona nad powstawaniem glicyny w wyniku dekarboksylacji kwasu aminomalonowego mają jedynie teoretyczne znaczenie, gdyż jak obecnie wiadomo enzymatyczna przemiana seryny w glicynę nie zachodzi na tej drodze, lecz w wyniku przeniesienia atomu węgla β seryny na kwas foliowy. Teoria Ogstona tłumaczy natomiast dobrze mechanizm działania akonitazy w przedstawionych na schemacie 2 przemianach metabolitów VIII—X. Możliwość rozróżnienia

dwóch identycznych połówek cząsteczki symetrycznego kwasu cytrynowego (VIII) prowadzi wyłącznie do kwasu *cis*-akonitowego (IX) o wiązaniu podwójnym sąsiadującym ze znakowaną grupą karboksylową, a następnie — w wyniku przyłączenia cząsteczki wody — wyłącznie do kwasu izocytrynowego (X). Dalsze jego przemiany dają kwas α -ketoglutarowy (XII) z grupą ketonową sąsiadującą ze znakowanym karboksylem. Oksydacyjna dekarboksylacja kwasu XII powoduje odszczenie $^{13}\text{CO}_2$, pochodzącego z atomu węgla, który na początku przemian zawarty był w grupie γ -karboksylowej cząsteczki kwasu szczawiooctowego. Przypuszczenie Ogstona o możliwości udziału kwasu cytrynowego w cyklu kwasów trójkarboksylowych doczekało się bardzo szybko potwierdzenia doświadczalnego (32, 33). Natomiast sama teoria stała się przedmiotem żywej dyskusji i dalszych modyfikacji.

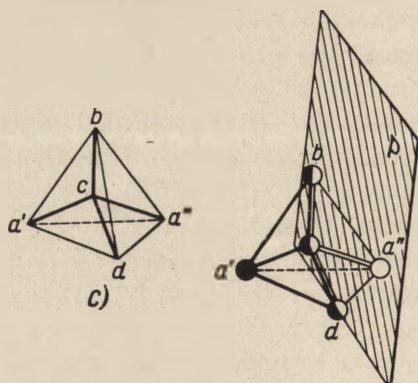
2, Teoria mezo-węgla Schwatza i Cartera

Pogląd o równowartości przestrzennej dwóch jednakowych podstawników a w cząsteczce typu $\text{Ca}'a''bd$, przyjmowany w chemii od wielu lat, poddano rewizji w latach pięćdziesiątych. Na podstawie wyników różnego typu badań Hirschman (12), Racusen i Arnoff (41). Schartz i Carter (44) oraz Wilcox (51) sformułowali zasady zachowania się związku, posiadającego dwa jednakowe podstawniki, w reakcji z odczynnikiem optycznie czynnym. W opublikowanej w 1954 roku pracy Schwartz i Carter (44) wykazali możliwość odróżnienia grupy a' od a'' w cząsteczce $\text{Ca}'a''bd$. Jeżeli spojrzymy na jej centralny atom węgla od strony podstawnika a' (rys. 5a), to zobaczymy grupy b , a'' i d w uszeregowaniu, którego kierunek zgodny jest z kierunkiem ruchu wskazówek zegara. Jeśli natomiast popatrzymy na atom węgla od strony drugiego z jednakowych podstawników — a'' — ujrzymy grupy b , a' i d ułożone w kierunku przeciwnym kierunkowi ruchu wskazówek zegara (rys. 5b). Możemy stwierdzić z całą pewnością, że jeśli ustawimy model cząsteczki w określony sposób (na przykład jak na rys. 5c — podstawnik b nad d i podstawnik d z przodu) — to niezmiennie a' będzie z „lewej”, a'' z „prawej” strony. Skoro więc można oba podstawniki a odróżnić od siebie wzrokowo, nie mają one zatem identycznego położenia przestrzennego.

Schwartz i Carter wprowadzili termin „atom mezo-węgla”. Termin ten oznacza centralny atom węgla takiej cząsteczki, którą płaszczyzna przechodząca przez ten atom węgla i podstawniki b i d dzieli na dwie połowy stanowiące przedmiot i jego odbicie (rys. 6). Przypadek taki występuje wówczas, gdy a' i a'' oznaczają jednakowe podstawniki, zaś b i d — różne od a i od siebie, natomiast nie wystąpi w cząsteczkach typu Caaab i Caabb .

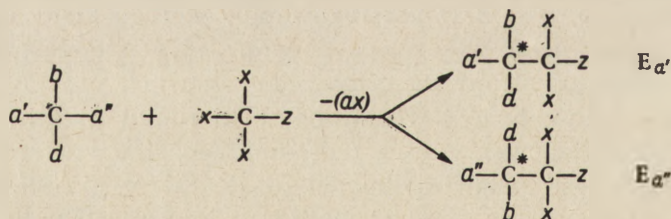


Rys. 5. Położenie przestrzenne dwóch jednakowych grup a związku $Ca'a''bd$.

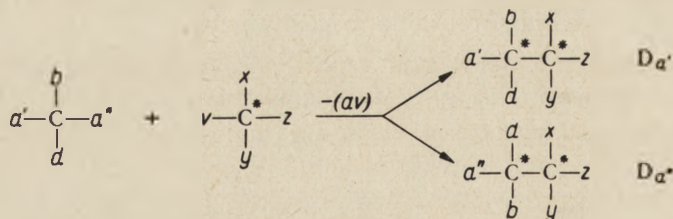


Rys. 6. Podział cząsteczki zawierającej atom mezo-węgla na dwie części stanowiące przedmiot i odbicie. P — płaszczyzna podziału. Część zaczerwniona — przedmiot. Część niezaczerniona — odbicie.

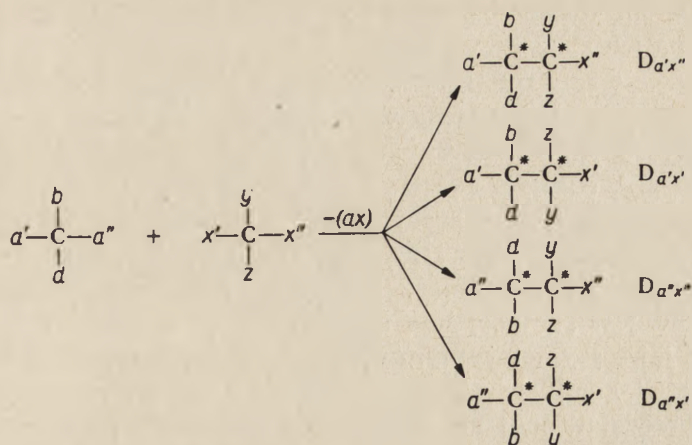
Cząsteczka zawierająca jeden lub więcej atomów mezo-węgla w eliminującej podstawnik a reakcji z odczynnikiem optycznie nieczynnym daje równe ilości dwóch enancjomerów Ea' i Ea'' (schemat 4). Natomiast w takiej samej reakcji z odczynnikiem optycznie czynnym powstaną różne ilości diastereoizomerycznych produktów Da' i Da'' (schemat 5), bowiem każdy z dwóch jednakowych podstawników a przy atomie mezo-węgla reaguje z odczynnikiem z inną szybkością. Jeśli oba



Schemat 4. Eliminacja podstawnika a związku zawierającego mezo-węgiel w reakcji z optycznie nieczynnym odczynnikiem. C^* — atomy węgla asymetrycznego.



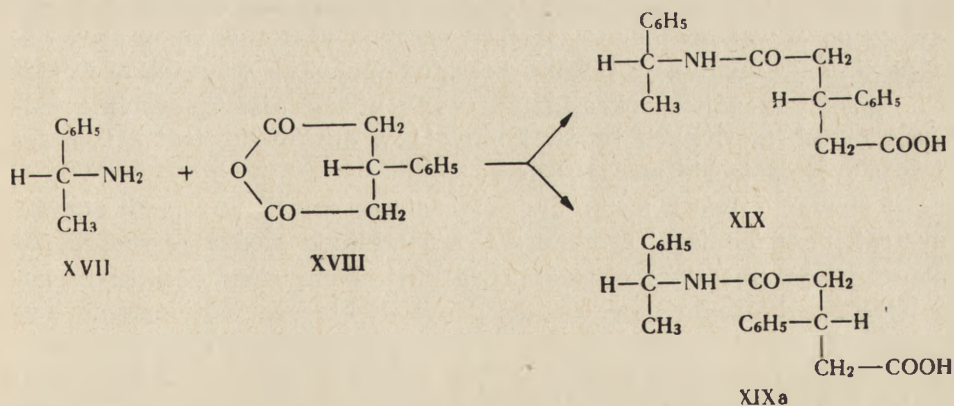
Schemat 5. Eliminacja podstawnika a związku zawierającego atom mezo-węgla w reakcji z optycznie czynnym odczynnikiem. C^* — atomy węgla asymetrycznego.



Schemat 6. Eliminacja podstawników a i x w reakcji dwóch związków zawierających atomy *mezo*-węgla. C^* — atomy węgla asymetrycznego.

reagujące związki zawierają atomy *mezo*-węgla, w wyniku eliminacji powstają cztery diastereoizomery $D_{a'x'}$, $D_{a'x''}$, $D_{a''x'}$ i $D_{a''x''}$ (schemat 6).

Na poparcie swej hipotezy Schwartz i Carter podają jako przykład reakcję między bezwodnikiem kwasu β -fenyloglutarowego (XVII) i (2S) α -fenyloetyloaminą (XVIII, schemat 7). W myśl teorii *mezo*-węgla w wyniku reakcji powinny powstać różne ilości dwóch optycznie czynnych diastereoizomerów (XIX i XIXa). Produkt reakcji udało się istotnie rozdzielić na dwa składniki, z których jeden — trudniej rozpuszczalny w wodzie, o skręcalności $[\alpha_D]^{27} = -83,3^\circ$ otrzymano z wydajnością 60%, a drugi zaś o skręcalności $[\alpha_D]^{27} = -49,4^\circ$ — z wydajnością 40%. Reakcja bezwodnika kwasu β -fenyloglutarowego z (2S) α -fenyloetyloaminą jest wyjątkowo szczęśliwym przykładem dla wykazania różnicy w ilościach diastereoizomerycznych produktów reakcji — zazwyczaj odchylenia od sto-



Schemat 7. Reakcja między bezwodnikiem kwasu β -fenyloglutarowego i (2S) α -fenyloetyloaminą według (44).

sunku 1:1 dla obu diastereoizomerów są niewielkie i trudne do wykrycia ze względu na ich zbliżone własności.

Teoria *mezo*-węgla tłumaczy w wystarczający sposób chemiczną syntezę asymetryczną i pozwala na wyjaśnienie mechanizmu szeregu reakcji enzymatycznych. Niektórzy autorzy starali się nawet zastąpić nią teorię Ogstona. Według Korkesa (15) teoria atomu *mezo*-węgla może dostatecznie wyjaśnić stereospecyficzność enzymów w stosunku do substratów typu *Caabd* — wystarczy więc przyjąć jednopunktowe połączenie między takim substratem a enzymem. Atom *mezo*-węgla w cząsteczce *Caabd* jest „potencjalnie asymetryczny”, a zatem w chwili połączenia się jej z asymetrycznym enzymem zmienia się on w nowe centrum asymetrii kompleksu enzym-substrat. Zachodzi przemiana analogiczna do przedstawionej na schemacie 5. Powstają dwie diastereoizomeryczne odmiany kompleksu enzym-substrat, bowiem obrót którejkolwiek części otrzymanych połączeń wokół wiązania pojedynczego nie może doprowadzić do przejścia jednego z nich w drugie. Jeżeli różnice energetyczne między diastereoizomerycznymi odmianami kompleksu są wystarczająco duże, w wyniku reakcji powstaje jeden produkt optycznie czynny. Jeśli natomiast są one mniejsze — zachodzi reakcja enzymatyczna o niższej stereospecyficzności wobec produktu, prowadząc do powstania dwóch odmian optycznie czynnego związku. Istnienie wspomnianych różnic energetycznych można wyjaśnić działaniem zawady przestrzennej, utrudniającej powstanie jednego z diastereoizomerów kompleksu enzym-substrat. Zdaniem Korkesa konsekwencją przyjęcia trójpunktowego przyłączenia substratu do enzymu jest absolutna stereospecyficzność, która jednak nie zawsze jest regułą w reakcjach biochemicznych. W istocie jednak wniosek Korkesa nie wydaje się słuszny — połączenie enzym-substrat należy pojmować jako wzajemne oddziaływanie między enzymem a substratem, prowadzące do jednoznacznie określonego ich położenia względem siebie (30). Oddziaływanie to może polegać na wytwarzaniu wiązań o różnej wartości energetycznej — począwszy od kowalencyjnego a skończywszy na wodorowym, a brak oddziaływania — wynikać z zawady przestrzennej. Tak więc teoria Ogstona bardziej szczegółowo określa przyczyny utrudniające powstanie jednego z dwóch możliwych typów kompleksów enzym-substrat a tym samym uzupełnia teorię *mezo*-węgla.

Powstawanie dwóch izomerów optycznie czynnych w reakcji enzym-substrat, przebiegającej zgodnie z teorią Ogstona można w sposób dostateczny wytłumaczyć, zakładając, że obok kompleksu o niższym poziomie energetycznym może istnieć drugi — którego wytworzenie wymaga większego wkładu energii; w ten sposób obok jednego enancjomeru jako głównego produktu reakcji powstaje drugi — występujący w mniejszości. Dokładne metody analityczne wykazały (26), że zjawisko to zachodzi nawet w przypadku enzymów o bardzo wysokiej stereo-

specyficzności, należałoby zatem przyjąć, że w przebiegu reakcji mogą zdarzać się — choć bardzo rzadko — odstępstwa od założeń 1) lub 3) teorii Ogstona. Obecnie teoria ta uległa dalszym modyfikacjom i prowadzone są próby wyjaśnienia stereospecyficzności enzymów przy założeniu nie trójpunktowego lecz dwupłaszczyznowego oddziaływania między enzymem a substratem (36).

III. Stereochemia przenoszenia wodoru w reakcjach z udziałem nukleotydów pirydynowych

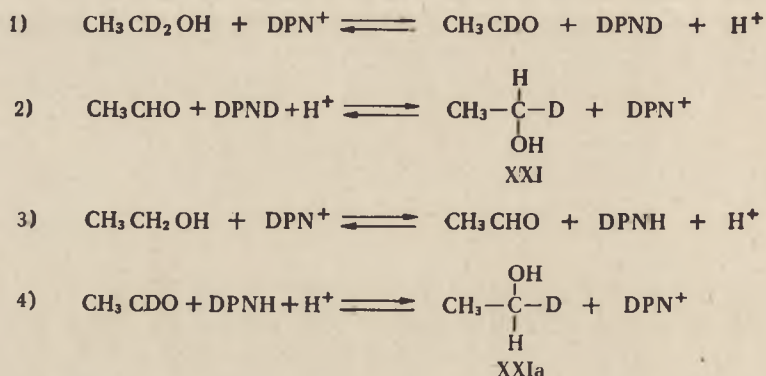
Badania nad enzymatycznym przenoszeniem wodoru z różnych substratów na DPN lub TPN i z DPNH lub TPNH na różne produkty ulegające uwodorowaniu doprowadziły do stwierdzenia stereospecyficzności tej reakcji.

W 1951 roku Westheimer, Fisher, Conn i Vennesland (49) używając znakowanego deuterem etanolu o budowie $\text{CH}_3 \cdot \text{CD}_2 \cdot \text{OH}$ stwierdzili, że pod działaniem dehydrogenazy alkoholowej drożdży następuje bezpośrednie przeniesienie deuteru z substratu na koenzym z wytworzeniem DPND i $\text{CH}_3 \cdot \text{CDO}$ (schemat 8, reakcja 1). W wyniku utlenienia otrzymanego w ten sposób DPND za pomocą nieznakowanego aldehydu octowego powstał nieznakowany DPN^+ , zaś obecność deuteru stwierdzono w wytworzonym alkoholu etylowym (11). Wynik reakcji można by wyjaśnić większą szybkością rozszczepienia wiązania C—D niż C—H, stwierdzono jednak zjawisko przeciwne — dla wiązania C—D szybkość ta jest sześć razy mniejsza niż dla C—H — wobec tego przypuszczenie takie nie może być słuszne. Jedynym wytłumaczeniem przenoszenia wyłącznie deuteru w tej reakcji przez dehydrogenazę mogła być stereospecyficzność jej działania. W celu potwierdzenia słuszności tego przypuszczenia redukcję aldehydu octowego przeprowadzono przy użyciu DPND przygotowanego przez redukcję chemiczną DPN^+ działaniem czterotlionianu sodu w środowisku ciężkiej wody. Tym razem około 50% deuteru znaleziono w powstałym alkoholu, a około 50% — w otrzymanym DPN^+ .

Na podstawie tych doświadczeń nad przenoszeniem deuteru z DPND na aldehyd octowy można było stwierdzić, że dehydrogenaza alkoholowa drożdży wyróżnia jedno z dwóch możliwych położenia przestrzennych wodoru w pozycji 4 zredukowanego pierścienia amidu kwasu nikotynowego. W związku tym każdy z atomów wodoru w położeniu 4 znajduje się po innej stronie płaszczyzny pierścienia pirydynowego, toteż w przypadku DPND mogą powstać dwa izomery XX i XX a.

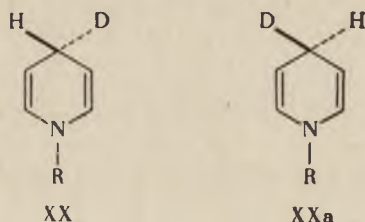
W reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę alkoholową drożdży dla substratu dostępna jest tylko jedna strona pierścienia (nazwana A)

i tylko jeden z atomów wodoru w pozycji 4 może ulec wymianie. W DPND powstałym w reakcji z etanolem znakowanym za pomocą deuteru w wyniku jej stereospecyficznego przebiegu atom deuteru znaj-



Schemat 8. Otrzymywanie dwóch enancjomerów α -monodeuteroetanolu według (20). Wszystkie reakcje katalizowane przez dehydrogenazę alkoholową drożdży.

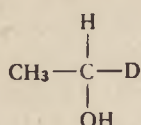
duje się wyłącznie po stronie A i dlatego zostaje przeniesiony na aldehyd. Natomiast DPND powstały na skutek niestereospecyficznego redukcji chemicznej składa się z 50% postaci zawierającej atom deuteru po stronie A i 50% postaci zawierającej atom deuteru po stronie przeciwnej, nazwanej B. Tylko pierwsza postać w reakcji z aldehydem octo-



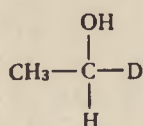
wym traci deuter, natomiast druga — wodór, a zatem tylko 50% deuteru zostaje przeniesione na aldehyd, zaś 50% pozostaje w DPN.

Dotychczas nie została jeszcze ustalona absolutna konfiguracja dwóch możliwych form DPND i nie wiadomo, która z nich odpowiada wzorowi XX, a która XXIa. W związku z tym przestrzenne określenie strony A i strony B nie jest jeszcze możliwe; jako stronę A przyjmuje się takie położenie deuteru w DPND, w jakim jest on wykorzystywany przez dehydrogenazę alkoholową drożdży.

Dalsze badania wykazały, że redukcja aldehydu octowego pod wpływem zredukowanego enzymatycznie DPND daje tylko jeden z dwóch możliwych enancjomerów α -monodeuteroetanolu (XXI i XXIa). Reakcja 1 schematu 8 przedstawia sposób otrzymania DPND, użytego następnie w reakcji 2 do redukcji nieznakowanego aldehydu octowego. Pod działaniem dehydrogenazy alkoholowej drożdży powstaje enancjo-

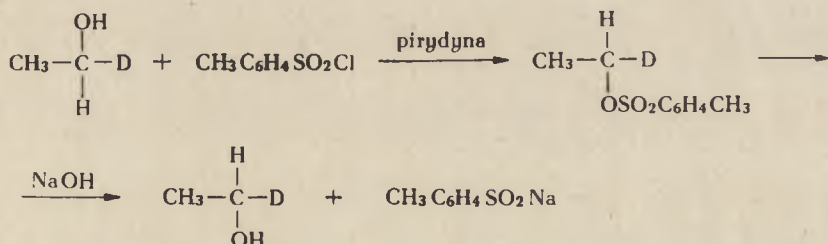


XXI



XXIa

mer XXI i DPN⁺. Czystość powstałego produktu sprawdzono przeprowadzając reakcję 2 w przeciwnym kierunku to jest ponownie utleniając etanol od aldehydu octowego. Stwierdzono, że deuter przeniesiony uprzednio z DPND na aldehyd, został po odwróceniu reakcji ponownie włączony do nukleotydu pirydynowego. Fakt ten świadczy o występowaniu α -monodeuteroetanolu, który jest produktem reakcji 2 w jednej odmianie enancjomerycznej. Druga odmiana α -monodeuteroetanolu (XXIa) powstaje przez redukcję znakowanego deuterem aldehydu octowego pod działaniem dehydrogenazy alkoholowej drożdży i DPNH przygotowanego przez redukcję enzymatyczną w sposób podany w reakcji 3. Czystość enancjomeru XXIa sprawdzono enzymatycznie przeprowadzając reakcję 4 w przeciwnym kierunku. Tym razem stwierdzono, że dehydrogenaza przenosi z alkoholu na DPN⁺ tylko wodór, zaś deuter pozostaje w utworzonym aldehydzie octowym, tak więc i produkt reakcji 4 (XXIa) występuje w jednej odmianie enancjomerycznej. Przeprowadzono inwersję jednego z tych enancjomerów w drugi w reakcji chlorkiem *p*-toluenosulfonowym w pirydynie (schemat 9) i zmianę konfiguracji potwierdzono w reakcji enzymatycznej.



Schemat 9. Inwersja enancjomeru α -monodeuteroetanolu w reakcji z chlorkiem *p*-toluenosulfonowym w pirydynie według (20).

W roku 1957 ustalono, że α -monodeuteroetanol powstający pod działaniem dehydrogenazy alkoholowej drożdży i nieznakowanego DPN z aldehydu octowego zawierającego deuter w grupie aldehydowej (schemat 8, reakcja 4) — ma konfigurację (R) (20).

Stereospecyficzność enzymatycznego przenoszenia wodoru stwierdzono następnie dla dehydrogenaz kwasu mlekowego (19) i jabłkowego (22). Oba te enzymy przenoszą wodór ze strony A pierścienia pirydynowego DPN. W 1955 roku odkryto pierwszy enzym przenoszący na substrat atom wodoru, znajdujący się po stronie B — była to dehydro-

genaza β -hydroksysteroidów, indukowany enzym z *Pseudomonas* (47). Do chwili obecnej ustalono stereospecyficzność 40 dehydrogenaz (55). Niektóre z nich podane są w tabl. 1 i 2. Stwierdzono, że oprócz dehydrogenazy alkoholowej A-stereospecyficzne są dehydrogenazy α -hydroksykwasów. Zależność ta, jak się wydaje, nie jest związana z konfiguracją substratów. Dehydrogenazy węglowodanów, ich pochodnych oraz steroidów — to jest substratów o dość dużych wymiarach cząsteczek są B-stereospecyficzne.

Tablica 1

A-stereospecyficzne dehydrogenazy współdziałające z nukleotydem pirydynowym (wg 55)

Dehydrogenaza	Pochodzenie	Katalizowana reakcja	Koenzym
mrówczanowa	z nasion grochu	mrówczan \rightleftharpoons CO ₂	DPN
alkoholowa	z drożdży	etanol \rightleftharpoons aldehyd octowy	„
„	z <i>Pseudomonas</i>		„
„	z wątroby		„
„	z drożdży	propanol-2 \rightleftharpoons aceton	„
aldehydu octowego	z wątroby	aldehyd octowy \rightleftharpoons octan	„
D-mleczanowa	z <i>Lactobacillus arabinos.</i>	D-mleczan \rightleftharpoons pirogronian	„
L-mleczanowa	„ „	L-mleczan \rightleftharpoons pirogronian	„
„	z mięśnia sercowego		„
„	z mięśnia szkieletowego		„
„	z bulwy ziemniaczanej		„
D-glicerynianowa	z mięśnia szkieletowego	D-glicerynian \rightleftharpoons hydroksypirogronian	„
L-glicerynianowa	z liści pietruszki	L-glicerynian \rightleftharpoons hydroksypirogronian	„
L-jabłczanowa	z kielków pszenicy	L-jabłczan \rightleftharpoons szczawiooctan	„
„	z mięśnia sercowego		„
dwuhydroorotanowa	z <i>Zymobacterium oroticum</i>	L-dwuhydroorotan \rightleftharpoons orotan	„
izocytrynianowa	z mięśnia sercowego	izocytrynian \rightleftharpoons ketoglutaran + O ₂	TPN
L-jabłczanowa	z wątroby	L-jabłczan \rightleftharpoons pirogronian + CO ₂	„
dwuhydroorotanowa	z obligatoryjnego aerobu	L-dwuhydroorotan \rightleftharpoons orotan	„

Tablica 2

Niektóre B-stereospecyficzne dehydrogenazy współdziałające z nukleotydem pirydynowym (wg 55)

Dehydrogenaza	Pochodzenie	Katalizowana reakcja	Koenzym
α -fosforanu glicerolu fosfotriozy	z mięśnia „ „	α -fosforan L-glicerolu \rightleftharpoons fosfodwuhydroksyaceton	DPN
„	z drożdży	3-fosforan aldehydu D-glicerynowego + PO \rightleftharpoons 1,3-dwufosforan glicerynianu	„
L-glutaminianowa	z wątroby	L-glutaminian \rightleftharpoons α -ketoglutaran + NH_4^+	„
D-glikozowa β -hydroksysteroidu	„ „ z <i>Pseudomonas</i>	D-glikoza \rightleftharpoons lakton kwasu D-glikonowego testosteron \rightleftharpoons 4-androsten, 3,17-dion.	„
reduktaza DPNH-cytochrom c	z mitochondriów wątroby	cyt. c (Fe^{+++}) \rightleftharpoons cyt. c (Fe^{++})	„
oksydaza DPNH	z <i>Pneumococcus</i>	DPNH + $1/2 \text{O}_2$ \rightleftharpoons DPNH+	„
reduktaza glutationu	z drożdży	G-S-S-G \rightleftharpoons 2 GSH	„
„ „	z <i>Escherichia coli</i>		TPN
dehydrogenaza L-glutaminianu	z wątroby	L-glutaminian \rightleftharpoons α -ketoglutaran + NH_4^g	„
6-fosforanu glikozy	z drożdży	6-fosforan D-glikozy \rightleftharpoons lakton 6-fosforanu kwasu D-glikonowego	„
6-fosforanu D-glikonianu	„ „	6-fosforan D-glikonianu \rightleftharpoons 5-fosforanu D-r ₃ bulozy + CO_2	„

III. Stereospecyficzność a budowa przestrzenna miejsca aktywnego enzymu

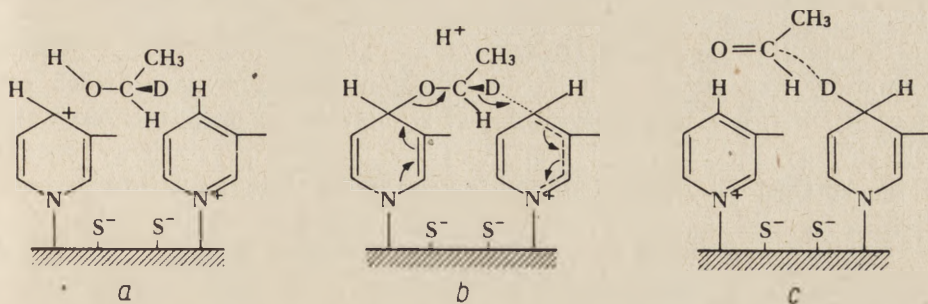
Jakkolwiek od czasu Fischera przyjmuje się, że stereospecyficzność enzymu zależy od budowy przestrzennej białka enzymatycznego, jednak ustalenie struktury miejsca aktywnego enzymów natrafia na poważne trudności. Udało się wprawdzie w kilku przypadkach określić sekwencję aminokwasów sąsiadujących z tak zwanymi aminokwasami kontaktowymi, czyli wiążącymi substrat (16); jest to jednak niepełna informacja o budowie miejsca aktywnego, gdyż mogą składać się na nie aminokwasy leżące w oddalonych od siebie miejscach łańcucha peptydowego, zbliżonych przestrzennie dzięki odpowiedniemu jego sfałdowaniu. Dlatego też konieczne jest ustalenie sekwencji aminokwasów

w całej cząsteczce enzymu i poznanie budowy przestrzennej jego formy aktywnej. Dopiero odszukanie aminokwasów kontaktowych w takim modelu pozwoliłoby na dokładne odtworzenie budowy miejsca aktywnego. Jak trudne jest to zadanie świadczy przykład rybonukleazy, składającej się tylko z 126 reszt aminokwasowych, a więc zbudowanej w porównaniu z innymi enzymami stosunkowo prosto. Mimo iż znana jest jej budowa pierwszorzędowa, na dość duże trudności napotyka utworzenie przestrzennego modelu cząsteczki enzymu, będącego w zgodzie ze wszystkimi danymi doświadczalnymi o jego własnościach (46, 50). Stwierdzono na przykład, że przekształcenie reszty asparaginy, będącej piętnastym aminokwasem w łańcuchu peptydowym licząc od końca aminowego, w resztę kwasu asparaginowego powoduje całkowitą utratę aktywności enzymu. Podobnie inaktywuje rybonukleazę działanie jodooctanu przy pH 5,5—6. Analiza unieczynnionego w ten sposób enzymu wykazuje, że z jodooctanem reagowała tylko jedna z czterech obecnych w cząsteczce reszt histydyny — oznaczona numerem 119. W modelu cząsteczki rybonukleazy, który zaproponował Scheraga (cyt. wg 50), obie te reszty aminokwasowe są do siebie bardzo oddalone, a zatem nie mogą jednocześnie znajdować się w miejscu aktywnym.

Budowa pierwszorzędowa dehydrogenaz, których koenzymami są nukleotydy pirydynowe, jest mało zbadana, jednak poznanie mechanizmu reakcji odwodorowania przy ich udziale pozwala na stworzenie hipotetycznego modelu centrum aktywnego. Prowadzone przez szereg lat badania Valle i współpracowników nad rolą cynku w dehydrogenazie alkoholowej drożdży wykazały w 1960 roku (14), że enzym ten składa się z czterech podjednostek o ciężarze cząsteczkowym 36000 przy czym każda podjednostka zawiera jeden atom cynku i jedną cząsteczką DPN. Atomy cynku wiążą cztery podjednostki w jedną całość i utrzymują odpowiednią ich konformację. Każda z cząsteczek DPN prawdopodobnie przyłączona jest trójpunktowo do dwóch sąsiadujących podjednostek i do atomu cynku. Przypuszcza się, że cynk wiąże się z białkiem enzymu poprzez grupy SH, co wskazywałoby na obecność cysteiny w miejscu aktywnym.

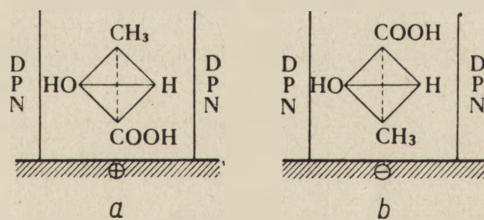
W 1958 roku Van Eys, San Pietro i Kaplan (53) zaproponowali interesującą hipotezę mechanizmu działania dehydrogenaz alkoholowej i kwasu mlekowego, zawierających parzystą liczbę cząsteczek DPN. Przyjmują oni, że każde dwa nukleotydy umieszczone są w ten sposób w cząsteczce enzymu, że ich pierścienie pirydynowe znajdują się blisko siebie. Cząsteczka substratu (na przykład alkoholu) zostaje przyłączona z uwolnieniem jonu H^+ w pozycji 4 jednego z pierścieni pirydynowych (schemat 10a), podobnie jak cyjanek, siarczek lub inne substancje nukleofilne, tworzące sole pirydyniowe. Następnie jeden z atomów wodoru (oznaczony na schemacie jako D) zostaje dołączony

do pierścienia pirydynowego drugiego nukleotydu; powstaje połączenie cząsteczki substratu z dwoma nukleotydami (schemat 10b). Z takiego połączenia uwalnia się produkt reakcji (aldehyd octowy), przy czym pierwszy nukleotyd wraca do formy utlenionej, natomiast drugi zostaje zredukowany (schemat 10c).



Schemat 10. Mechanizm działania dehydrogenazy alkoholowej według Van Eysa, San Pietro i Kaplana (53). Objasnienia w tekście.

Proponowany mechanizm jest zgodny ze stwierdzonymi doświadczalnie faktami: bezpośrednim przeniesieniem wodoru z substratu na DPN i spadkiem aktywności enzymu wraz ze wzrostem stężenia substratu. Jest bowiem rzeczą oczywistą, że powyżej pewnego stężenia substrat będzie przyłączał się do obu pierścieni pirydynowych DPN stając się inhibitorem. Wspomniane poprzednio wyniki badań Vallee również potwierdzają hipotezę Van Eysa, San Pietro i Kaplana. W związku z tym bardzo interesujące jest stwierdzenie przez Wallenfelsa (48), że cząsteczka dehydrogenazy alkoholowej drożdży może w pewnych warunkach przyłączyć dwadzieścia trzy atomy cynku, wiążąc jednocześnie dodatkowe cząsteczki DPN i osiągając w ten sposób większą aktywność.



Schemat 11. Rola białka enzymatycznego w specyficzności dehydrogenazy kwasu mlekowego według (53); (a) — dehydrogenaza kwasu D-mlekowego, (b) — dehydrogenaza kwasu L-mlekowego.

Van Eys, San Pietro i Kaplan są zdania, że oddziaływanie wzajemne białka enzymatycznego i alkoholu nie jest niezbędne. Wydaje się jednak, że grupa metylowa etanolu jest w jakiś określony sposób zorientowana w stosunku do enzymu. Vennelsland (54, 21) przypuszcza, że dzięki działaniu zawady przestrzennej grupa metylowa skierowa-

na jest w stronę zagłębienia w powierzchni enzymu, w którym zatrzymują ją siły Van der Waalsa i siły kohezji wody. To przypuszczenie potwierdzałyby dane o redukcji alkoholu izopropylowego i metanolu pod działaniem dehydrogenazy alkoholowej drożdży (35). Jeśli maksymalną szybkość, z jaką reaguje etanol przyjmujemy za 100, to szybkość reakcji izopropanolu wynosi 39 a metanolu tylko 4.

Przyjmując, że etanol przyłącza się grupą alkoholową i jednym z atomów wodoru grupy CH_2 do pierścieni pirydynowych dwóch cząsteczek DPN, a grupa metylowa jest zorientowana przestrzennie wskutek zawady przestrzennej i sił Van der Waalsa uzyskujemy zgodnie z teorią Ogstona obraz trójpunktowego połączenia substratu z enzymem.

Stereospecyficzność dehydrogenazy kwasu mlekowego w stosunku do kwasu D- lub L-mlekowego, Van Eys, San Pietro i Kaplan wyjaśniają różnicę w ładunku na powierzchni białka enzymatycznego (schemat 11). Niedawno Dennis i Kaplan (4) otrzymali dehydrogenazy kwasu L- i D-mlekowego z *Lactobacillus arabinosus*. Okazało się, że oba enzymy mają bardzo zbliżoną budowę, bowiem nie rozdzielają się one elektroforetycznie, a z trudem — chromatograficznie. Najbardziej uderzającą różnicą między obydwoma dehydrogenazami jest niejednakowa szybkość ich reakcji z pochodnymi DPN (tablica 3). Zjawisko to jest niewątpliwie spowodowane ukształtowaniem miejsca aktywnego. Na przykład duży podstawnik (benzyl) w pozycji 3 pierścienia pirydynowego DPN z wyraźnym trudem mieści się w centrum aktywnym dehydrogenazy kwasu L-mlekowego, podczas gdy z tą samą pochodną dehydrogenaza D-mlekowego reaguje 2,15 raza szybciej niż z DPN.

Tablica 3

Szybkość reakcji dehydrogenaz kwasów D- i L-mlekowego współdziałających z pochodnymi DPN (wg 13)

Pochodne DPN	Wielokrotność szybkości reagowania normalnego enzymu	
	Dehydrogenaza kwasu D-mlekowego	Dehydrogenaza kwasu L-mlekowego
3-acetylopirydyno-DPN	4,30	13,00
3-benzylpirydyno-DPN	2,15	0,13
deamino-DPN	0,60	0
3-aldehydopirydyno-DPN	0,07	0,57
amid kwasu tionikotynowego-DPN	0,52	1,85

Brak grupy aminowej w adeninie wchodzącej w skład DPN tylko zmniejsza szybkość reagowania dehydrogenazy kwasu D-mlekowego, natomiast uniemożliwia reagowanie dehydrogenazy kwasu L-mlekowego.

Najwidoczniej oba białka enzymatyczne różnią się budową nie tylko w miejscu przyłączenia pierścienia pirydynowego, lecz i adeninowego tego nukleotydu. W świetle tych danych schemat 11, odzwierciedla tylko częściowo zależność między stereospecyficznością a strukturą białka enzymatycznego dehydrogenazy kwasu mlekowego. Trwające obecnie intensywne prace nad budową trzeciorzędową enzymów pozwolą być może w niedługim czasie na odtworzenie struktury przestrzennej miejsca aktywnego. Przed badaczami stereospecyficzności enzymów otwiera się wówczas nowe możliwości.

Pani prof. dr I. Chmielewskiej składam serdeczne podziękowanie za pomoc w opracowaniu tego artykułu.

L I T E R A T U R A

1. Cahn R. S., Ingold C. K., Prelog V., *Experientia* **12**, 81 (1956).
2. Cieślak J., *Post. Biochem.* **7** (1961).
3. Cram D. J., Elhafez F. A., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5828 (1952).
4. Dennis D., Kaplan N. O., *Fed. Proc.* **18**, 213 (1959).
5. Doering W. E., Young R. W., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 631 (1960).
6. Fischer E., *Ber.* **27**, 323 (1894).
7. Fischer E., *Ber.* **27**, 2985 (1894).
8. Fischer E., *Z. physiol. Chem.* **26**, 60 (1898).
9. Fischer E., *Ber.* **34**, 629 (1901).
10. Fischer E., Thierfelder H., *Ber.* **27**, 2031 (1894).
11. Fischer H. F. Conn E. E., Vennesland B., Westheimer F. H., *J. Biol. Chem.* **202**, 687 (1953).
12. Hirschmann H., w *Essays in Biochemistry*, red. Graff S., New York 1956, str. 156.
13. Kaplan N. O., w *Steric Course of Microbiological Reactions* red. Wolstenholme G. E., O'Connor C. M., London 1959, str. 79.
14. Kägi J. H., Vallee B. L., *J. Biol. Chem.* **235**, 3188 (1960).
15. Korkes S., *Ann. Rev. Biochem.* **25**, 685 (1956).
16. Koshland D. E., jr., *Adv. Enzymol.* **22**, 45 (1960).
17. Kuhn W., *Erg. Enzymforsch.* **5**, 1 (1909).
18. Kuhn W., *Adv. Enzymol.* **20**, 1 (1958).
19. Loewus F. A., Ofner P., Fischer H. F., Westheimer F. H., Vennesland B., *J. Biol. Chem.* **202**, 699 (1953).
20. Levy H. R., Loewus F. A. Vennesland B., *J. Am. Chem., Soc.* **79**, 2949 (1957).
21. Loewus F. A. Westheimer F. H., Vennesland B., *J. Am. Chem. Soc.* **75** 5018 (1953).
22. Loewus F. A., Tchen T. T., Vennesland B., *J. Biol. Chem.* **212**, 787 (1955).
23. Marckwald W., *Ber.* **37**, 349 (1904).
24. Marckwald W., *Ber.* **37**, 1368 (1904).
25. Mc Kenzie A., *Erg. Enzymforsch.* **5**, 49 (1936).

26. Meister A., Lewintow L., Kingsley K. B., Greenstein J. P., *J. Biol. Chem.* **139**, 483 (1941).
27. Mosher H. S., La Combe E., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 3994 (1950).
28. Mosher H. S., La Combe E., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4991 (1950).
29. Ogston A. G., *Nature* **162**, 963 (1948).
30. Ogston A. G., *Nature* **181**, 1462 (1958).
31. Pasteur L., *C. R. Acad. Sci.* **46**, 615 (1858).
32. Potter V. R., Heidelberger C., *Nature* **164**, 180 (1949).
33. Potter V. R., Heidelberger C., Wilcox P. E., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 5019 (1950).
34. Prelog V., *Helv. Chim. Acta* **36**, 308 (1953).
35. Prelog V., *Bull. Soc. chim. Fr.* 987 (1956).
36. Prelog V., w Steric Course of Microbiological Reactions, red. Wolstenholme G. E., O'Connor C. M. London 1959, str. 79.
37. Prelog V., Meier H. L., *Helv. Chim. Acta* **36**, 320 (1953).
38. Prelog V., Tsatsas G., *Helv. Chim. Acta* **36**, 1178 (1953).
39. Prelog V., Wilhelm M., Bright D. B., *Helv. Chim. Acta* **37**, 221 (1954).
40. Prelog V., Wilhelm H., *Helv. Chim. Acta* **37**, 1634 (1954).
41. Racusen D. N., Aronoff S., *Arch. Biochem. Biophys.* **34**, 218 (1951).
42. Rosenthaler L., *Biochem. Z.* **14**, 238 (1908).
43. Rosenthaler L., *Biochem. Z.* **26**, (1909).
44. Schwartz P., Carter H. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. US* **40**, 499 (1954).
45. Shemin D., *J. Biol. Chem.* **162**, 297 (1946).
46. Stein W. H., Moore S., preprint nr 76, symp. IV, V International Congress of Biochemistry.
47. Talalay P., Loewus F. A., Vennesland B., *J. Biol. Chem.* **212**, 801 (1955).
48. Wallenfels K., w Steric Course of Microbiological Reactions red. Wolstenholme G. E., O'Connor C. M., London 1959, str. 10.
49. Westheimer F. H., Fisher H. F., Conn E. E., Vennesland B., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 2402 (1951).
50. Westheimer F. H., preprint nr 62, symp. IV, V International Congress of Biochemistry.
51. Wilcox P. E., *Nature* **164**, 757 (1949).
52. Wood H. G., Werkman C. H., Hemingway A., Nier. A. D., *J. Biol. Chem.* **139**, 483 (1941).
53. Van Eys J., San Pietro A., Kaplan N. O., *Science* **127**, 1443 (1958).
54. Vennesland B., *J. cell. comp. Physiol.* **47**, Suppl. 1, 201 (1956).
55. Vennesland B., preprint nr 145, symp. V., V. International Congress of Biochemistry.

ZOFIA KASPRZYK*

Reakcje fotochemiczne w fotosyntezie

The Primary Reactions in Photosynthesis

A review of recent investigations and hypotheses concerning the primary reactions in photosynthesis is presented.

„Od chwili odkrycia przez Wooda i Werkmana przed 25 laty pierwszej reakcji karboksylacji dokonano ogromnego postępu w badaniu tej części procesu fotosyntezy, która wyjaśnia ciąg reakcji zachodzących po reakcjach fotochemicznych. Stwierdzono, że tak zwane „ciemne reakcje”, to jest włączanie dwutlenku węgla i jego redukcja, reakcje fosforylacji jak również uwalnianie tlenu mogą być odgraniczone od pierwotnego procesu fotochemicznego bez zmiany jego istoty. Zidentyfikowano wiele metabolitów pośrednich, enzymów i kofaktorów biorących udział w biochemicznych przemianach procesu fotosyntezy. Jesteśmy obecnie bardzo dobrze zorientowani w typach egzoergicznych reakcji enzymatycznych, wykorzystujących energię uchwyconą przez kompleksy barwników. Zadziwiająco mało wiemy natomiast o chemizmie reakcji świetlnej i nadzwyczaj wydajnym magazynowaniu tej energii. Innymi słowami daleko jeszcze do wyjaśnienia samego procesu fotochemicznego niezależnie od innych reakcji metabolicznych”.

Tymi słowami rozpoczął Gaffron swój referat na V Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym w Moskwie. Nic też dziwnego, że aż trzy spośród czterech sesji sympozium poświęconego fotosyntezie zajmowały się fotochemią tego procesu i zagadnieniami ściśle z nią związanymi.

Zagadnienia te można podzielić na dwie grupy.

1) Zjawiska zachodzące z udziałem barwników światłoczułych (typy barwników, ich struktura w żywej komórce, przemiany zachodzące w nich pod wpływem światła).

* Doc. dr, samodzielny pracownik Katedry Biochemii UW.

2) Zjawiska spowodowane bezpośrednio przez uczulone barwniki (przenoszenie elektronów przez hemoproteidy, utlenianie wody i foto-fosforylacje).

Do wyjaśnienia tych zagadnień stosuje się bardzo różnorodną metodykę jak spektroskopię we wszystkich zakresach, konduktometrię, badania izotopowe, badania kinetyki reakcji itp.

Dotychczas poznane fakty pozwalają na podanie następującego schematu procesu fotochemicznego: światło zaabsorbowane przez cząsteczki barwników światłoczułych powoduje powstanie pary związków utlenionego i zredukowanego o takiej różnicy potencjałów, która pozwala na redukcję nukleotydów pirydynowych, nagromadzenie wysokoenergetycznych wiązań fosforowych w ATP oraz, w przypadku roślin zielonych, na wydzielenie odpowiedniej ilości tlenu cząsteczkowego. Jednak szczegółowe mechanizmy tych procesów są ciągle jeszcze w mniejszym lub większym stopniu przedmiotem hipotez.

I. Barwniki światłoczułe i ich fotochemia

1. Typy barwników i ich struktura w żywej komórce

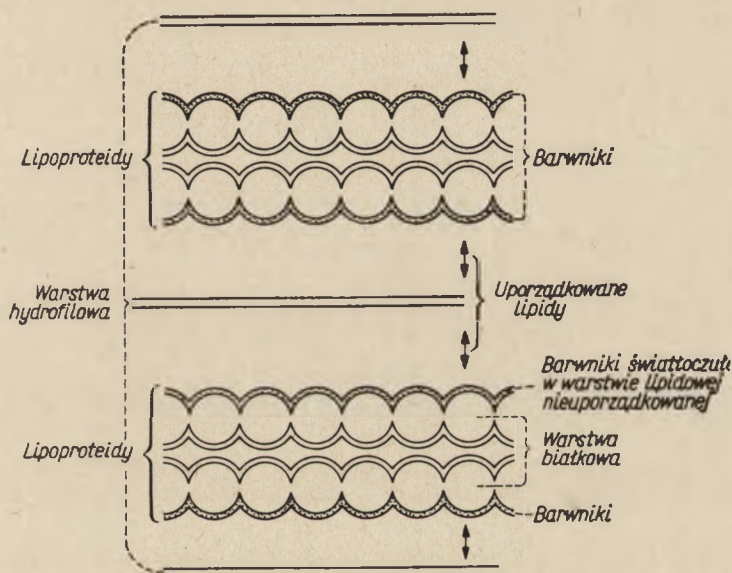
Barwniki światłoczułe występujące w roślinach i bakteriach fotosyntetyzujących podane są w tablicy 1. Powszechnie uważa się, że podstawowym barwnikiem światłoczułym jest w roślinach zielonych chlorofil, a w bakteriach fotosyntetyzujących — bakteriochlorofil. U roślin wyższych chlorofilowi *a* towarzyszą zawsze karotenoidy, u glonów fikobiliny. Wszystkie rośliny wyższe i glony zawierają ponadto chlorofil *b*, glony brązowe i okrzemki — chlorofil *c*.

Tablica 1
Barwniki światłoczułe występujące w roślinach
i bakteriach fotosyntetyzujących

Barwnik	Główne prążki absorpcyjne w m μ		
Bakteriochlorofil			850
Chlorofil <i>a</i>			683
Fikocyjanina			625
Fikoerytryna	495	550	570
Fukoksantol		540	
Karotenoidy	481		
Chlorofil <i>b</i>	481		
Chlorofil <i>c</i>	470		620

Badania Thomasa (37) wykazały, że cząsteczki chlorofilu zarówno w chloroplastach roślin zielonych, jak i w nie posiadających chloroplastów bakteriach ułożone są w monomolekularnych warstwach na

powierzchni błonek lipoproteidowych. Cząsteczki lipidów tworzące taką błonkę zgrupowane są chaotycznie, natomiast z drugiej strony warstwy barwnikowej znajduje się inna strefa lipidów o regularnie ułożonych cząsteczkach. Karotenoidy jako bardziej lipofilne od chlorofilu występują prawdopodobnie między warstwą chlorofilu a strefą uporządkowanych lipidów, a bardziej hydrofilne fikobiliny — w nieuporządkowanej warstwie lipoproteidowej. Grubość całej błonki złożonej z podwójnej warstwy lipoproteidów otoczonych z obu stron warstwami barwników i strefami uporządkowanych lipidów wynosi 200 Å. Jej budowa jest przedstawiona zgodnie ze schematem podanym przez Goedheera (17) na rys. 1. Struktura warstwowa chloroplastów jest doskonale widoczna na fotografiach z mikroskopu elektronowego; jest ona niezbędnym warunkiem umożliwiającym przenoszenie energii między cząsteczkami barwników.



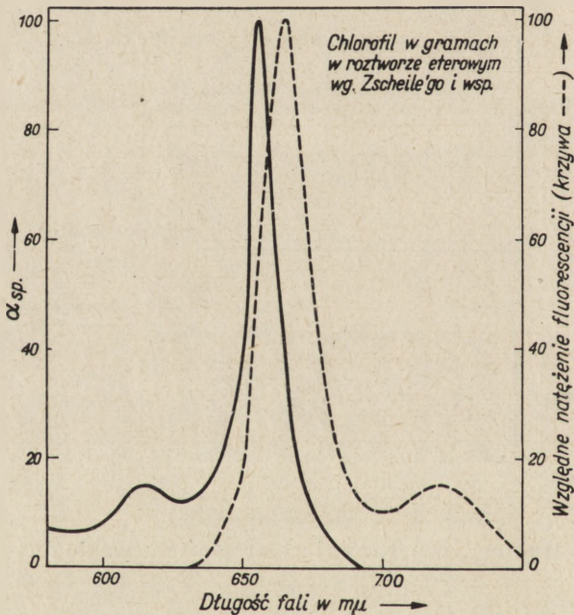
Rys. 1. Schemat struktury warstwowej chloroplastów według Goedheera (17)

2. Przenoszenie energii

Przenoszenie energii pobudzenia barwników światłoczułych może zachodzić na zasadzie rezonansu między sąsiadującymi ze sobą cząsteczkami tych barwników. W przypadku różnych cząsteczek tego samego barwnika mówimy o homogennej wędrówce energii, natomiast przenoszenie energii między różnymi barwnikami nazywamy wędrówką heterogenną.

W 1951 r. Foerster (13) podał, że prawdopodobieństwo wędrówki energii na zasadzie rezonansu objawia się przesunięciem prążka emi-

syjnego cząsteczki będącej donatorem energii w kierunku dłuższych fal świetlnych w stosunku do prążka absorpcyjnego cząsteczki będącej akceptorem energii. Takie przesunięcie jest zazwyczaj większe między cząsteczkami różnych barwników niż między identycznymi cząsteczkami tego samego barwnika. Wyjątkowo jednak w przypadku chlorofilu *a* prążek fluorescencyjny (emisyjny) jest znacznie przesunięty w stosunku do prążka absorpcyjnego (rys. 2), co wskazuje na przeniesienie energii między jego cząsteczkami. Przenoszenie energii między różnymi barwnikami zachodzi zawsze z cząsteczek, których prążki absorpcyjne są zbliżone do fioletowej części widma, na cząsteczki, których absorpcja jest przesunięta w kierunku czerwieni. Zatem w naturalnej mieszaninie barwników światłoczułych energia zaabsorbowana przez karotenoidy jest przenoszona na fikoerytrynę, energia pobudzenia fikoerytryny — na fikocyjaninę, potem na chlorofil *c* lub *b* i w końcu na chlorofil *a* lub bakteriochlorofil.



Rys. 2. Prążki absorpcyjny i fluorescencyjny chlorofilu *a* w roztworze eterowym

Oprócz przesunięcia prążków absorpcyjnych barwników istnieją jeszcze inne dowody wskazujące na wędrówkę energii. Jednym z takich dowodów na istnienie homogennej wędrówki energii jest zaobserwowana przez Goedheera (17) depolaryzacja spolaryzowanej fluorescencji w fikobilinach. Fluorescencja jest wówczas spolaryzowana, gdy barwnik został pobudzony światłem spolaryzowanym w płaszczyźnie; jeżeli zachodzi wędrówka energii między jego cząsteczkami, fluorescencja ulega częściowej lub całkowitej depolaryzacji. Dowodem

na przenoszenie energii między cząsteczkami różnych barwników jest występowanie tak zwanej fluorescencji uczulonej. Zjawisko to polega na tym, że kwanty świetlne zaabsorbowane przez jeden barwnik są emitowane jako fluorescencja innego barwnika, co jest związane ze zmianą położenia prążka absorpcyjnego. Uczuloną fluorescencję w komórkach fotosyntetyzujących odkryli Dutton, Manning i Duggar (10) a zbadał ją ilościowo Duysens (11) w odniesieniu do chlorofilu *a* w glonach i bakteriochlorofilu w bakteriach. Wyniki tych pomiarów podane są w tablicy 2. Według danych z tej tablicy ostatecznym akceptorem energii pobudzenia świetlnego jest w roślinach zielonych chlorofil *a*, w bakteriach — bakteriochlorofil czyli barwniki absorbujące przy najdłuższej fali świetlnej.

Tablica 2

Wydajność przenoszenia energii między barwnikami

Barwnik absorbujący energię świetlną	Barwnik emitujący fluorescencję	% przeniesionych kwantów pobudzających
Chlorofil <i>b</i>	chlorofil <i>a</i>	96
Fikocyjanina	chlorofil <i>a</i>	90
Fikoerytryna	fikocyjanina	80
Fukoksantol	chlorofil <i>a</i>	70
Karotenoidy	chlorofil <i>a</i>	40—50
Bakteriochlorofil 850	bakteriochlorofil 900	100
Bakteriochlorofil 850	bakteriochlorofil 850	100
Karotenoidy	bakteriochlorofil	40

Ostatnio Kok (22, 23) wykrył barwnik światłoczuły, absorbujący przy jeszcze dłuższych falach świetlnych a mianowicie przy 700 m μ i uczulany chlorofilem *a*, chlorofilem *b* oraz fikocyjaniną. Jest on bardzo rozpowszechniony w świecie roślinnym i występuje w ilości jednej cząsteczki na tak zwaną jednostkę fotosyntetyczną, składającą się z 200 do 300 cząsteczek chlorofilu. Kok sądzi, że barwnik ten, nazwany przez niego P₇₀₀, zbiera energię wielu pobudzonych cząsteczek chlorofilu *a* i jest ostatnim ogniwem w łańcuchu barwników przenoszących energię. Trudno jednak powiedzieć dzisiaj coś pewnego o jego roli; jest on jeszcze bardzo mało zbadany, ponieważ nie udało się go dotychczas wyizolować w stanie czystym.

3. Absorpcja światła przez cząsteczkę chlorofilu

Przemiany zachodzące w cząsteczce chlorofilu pod wpływem światła są od wielu lat przedmiotem badań. Z rozważań Francka (14) wynika, że do rozłożenia cząsteczki wody z wydzieleniem 1/2 cząsteczki

tlenu potrzeba dwóch einsteinów światła czerwonego. Takiej ilości energii może dostarczyć jedynie cząsteczka podwójnie pobudzona przy założeniu, że przemiana energii świetlnej w energię chemiczną równoznaczna z rozerwaniem wiązania OH w cząsteczce wody zachodzi w jednym stadium.

To założenie, uzupełnione następnie badaniami Livingstona i Foerstera (28, 12) pozwala w następujący sposób przedstawić mechanizm pobudzenia światłem cząsteczki chlorofilu: po zaabsorbowaniu fotonu światła widzialnego lub ultrafioletowego cząsteczka chlorofilu może przejść w pobudzone stany *singletów* pierwszego i drugiego rzędu, przy czym fotony o mniejszej energii (czerwone) powodują powstanie pierwszego stanu pobudzenia a fotony o wyższej energii (niebieskie lub fioletowe) — powstanie drugiego stanu pobudzenia. Energia *singletów* może być emitowana jako czerwona fluorescencja, przy czym do emisji zdolny jest tylko pierwszy stan pobudzenia, natomiast drugi musi przedtem przejść w stan niższy w wyniku niezwiązanej z żadnym promieniowaniem przemiany. Przemiana taka nosi nazwę wewnątrzcząsteczkowej konwersji i polega na przejściu cząsteczki pobudzonej, mającej dużą energię elektronową i małą energię oscylacji, w cząsteczkę o niższym stanie elektronowym i wyższej energii oscylacji. Nadmiar energii oscylacji takiej cząsteczki zostaje bardzo szybko rozproszony w wyniku zderzeń z cząsteczkami rozpuszczalnika i dlatego widmo fluorescencji chlorofilu jest niezależne od rodzaju fotonów zaabsorbowanego światła.

Reakcja fotochemiczna może być zapoczątkowana, zgodnie z założeniem Francka, jedynie przez cząsteczki chlorofilu w stanie pobudzonego *tripletu*, który powstaje ze stanu podstawowego tripletu po otrzymaniu dodatkowej energii od pobudzonego *singletu* w wyniku wewnętrznej konwersji.

Istnienie fluorescencyjnych stanów *singletów* cząsteczek chlorofilu wynika już z samego faktu jego fluorescencji. Długość trwania tych stanów można określić mierząc fosforoskopem elektronowym okres półtrwania fluorescencji lub też jej depolaryzację. Są one bardzo krótkotrwałe: 10^{-7} sek. Bezpośrednie udowodnienie występowania cząsteczek chlorofilu w bardziej długotrwałym stanie tripletu, którego istnienie jest postulowane w hipotezie Francka, jest bardzo trudne. Istnienie stanu półtrwałego o okresie 10^{-5} — 10^{-3} sek. postulował również Terenin (35) twierdząc, że wędrówka energii między cząsteczkami chlorofilu na zasadzie rezonansu nie mogłaby zachodzić przy krótszym stanie pobudzenia. Rzeczywiście, wystąpienie cząsteczki w stanie trwającym dłużej niż 10^{-5} sek. zwiększa prawdopodobieństwo współdziałania cząsteczek w czasie, natomiast sprzężenie energetyczne między dwoma rezonującymi cząsteczkami jest bez porównania słabsze w czą-

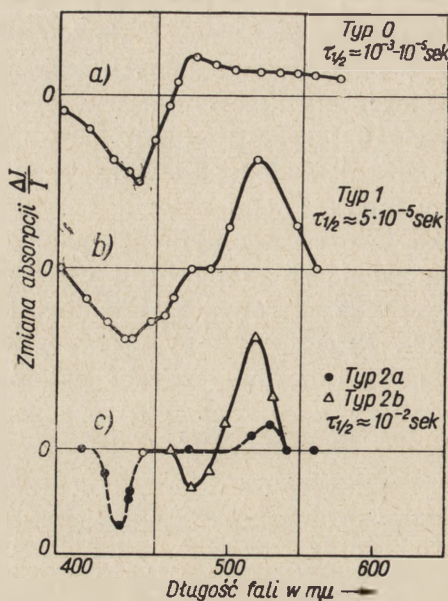
steczkach półtrwałych (tripletach) niż w występujących w krótkotrwałym fluorescencyjnym stanie singletów.

Ostatnio Witt (24, 40) badał fotochemiczne przemiany chlorofilu *in vivo*, pobudzane błyskami przerywanego światła o różnej długości.* Widmo różnicowe zmiany między absorpcją barwnika na świetle i w ciemności pozwoliło na uzyskanie danych wskazujących na istnienie w organizmach fotosyntetyzujących półtrwałego stanu pobudzenia chlorofilu *a* trwającego 10^{-5} sek. Stan ten Witt zaklasyfikował jako przemianę typu 1 w odróżnieniu od przemiany typu 0, odpowiadającej stanowi tripletu, który nie jest jednak identyczny ze stanem półtrwałym a może być tylko jego szczególnym przypadkiem. Na pojawienie się półtrwałego stanu pobudzenia chlorofilu *a* wskazuje zmiana absorpcji przy 520 m μ zachodząca również w temperaturze -200° , a nie zachodząca powyżej 60° . Ponadto zmiany absorpcyjne typu 1 zupełnie nie zachodzą w gazach paramagnetycznych, natomiast pojawiają się po przywróceniu atmosfery gazu diamagnetycznego. Jako gazy paramagnetyczne stosowano w tych badaniach O_2 i NO_2 a reakcję przeprowadzano na komórkach liofilizowanych. Specyficzna zdolność gazów paramagnetycznych jest również typowa dla pobudzonych stanów półtrwałych. Stan tripletu (typ 0), różniący się od stanu półtrwałego, można wykryć jedynie niszcząc uporządkowanie cząsteczek chlorofilu w chromatoforach i uniemożliwiając wędrówkę energii, która powoduje przejście stanu tripletu w stan półtrwały. Zniszczenie uporządkowania cząsteczek chlorofilu zachodzi np. w braku azotanów w układzie lub po dodaniu detergentów jak np. dygitoniny. W tych warunkach następuje znaczny spadek stężenia chlorofilu w chromatoforze (do 1% pierwotnej ilości). Po zniszczeniu stanu uporządkowania pojawia się zmiana absorpcji przy 460 m μ , trwająca 10^{-3} sek. i charakterystyczna dla chlorofilu *a*. W komórkach, które zawierają tylko chlorofil *a* (glony czerwone, brunatne, niebieskie i okrzemki), obserwuje się tylko zmiany związane z chlorofilem *a*, natomiast w komórkach zawierających ponadto chlorofil *b* obserwuje się zmiany absorpcji dla obu barwników. Po przywróceniu normalnego uporządkowania chlorofilu, np. przez dodanie azotanów, zmiany związane ze stanem tripletu znikają, a pojawiają się zmiany charakterystyczne dla stanu półtrwałego. W stanie tripletu występuje tylko niewielka ilość znajdujących się w chromatoforach cząsteczek chlorofilu *a* i *b*. Widma różnicowe dla stanów typu 0 i typu 1 podane są na rys. 3.

Badania Witta wyjaśniają zatem zależność między strukturą chromatoforów, wędrówką energii i stanami pobudzenia światłem chloro-

* Stosowanie błysków o zmiennej długości (5.10 $^{-6}$ sek. do 1 sek.) pozwala na dokładne ustalenie czasu trwania badanej reakcji.

filu. Dostarczają w każdym razie bardziej bezpośredniego niż badania kinetyczne dowodu na istnienie stanów długotrwałych. Omówione przemiany są przedstawione w pierwszej części schematu 1.



Rys. 3. Widma różnicowe czterech różnych typów zmian absorpcyjnych u roślin.

4. Fotoprzewodnictwo

Absorpcja światła przez cząsteczki chlorofilu może powodować nie tylko ich pobudzenie do wyższych poziomów elektronowych, lecz również — zdaniem niektórych badaczy — uwalnianie pobudzonych elektronów z cząsteczek i wytworzenie wolnych rodników z dodatnim ładunkiem. Oba powstałe w taki sposób *ekscytony* (jak je nazwał Frenkel — 15) mogą przesuwać się w kryształach chlorofilu. Przyjmując taki mechanizm można opisać wędrówkę energii jako międzycząsteczkowe przesuwanie się ekscytonów, przy czym elektrony i rodniki dodatnie pozostają w tej samej cząsteczce, ale ładunki dodatnie i ujemne zostają rozdzielone na odległość większą niż wielkość cząsteczki. Pod działaniem sił elektrycznych taki ekscyton może dysocjować i ładunki wywędrówują wtedy z układu warstwy chlorofilowej i zostają rozdzielone na obu jej stronach. Wytworzenie międzycząsteczkowych ekscytonów, ich wędrówka i dysocjacja przedstawione są na rys. 4.

Pierwszymi badaczami, którzy podali tę hipotezę, byli Katz (22) oraz Calvin i Bradley (5). Ich zdaniem po rozdeleniu ładunków dodatnich i ujemnych po dwóch stronach warstwy chlorofilowej

pierwszy proces redukcji (to jest przeniesienie elektronu na jakiś akceptor) zachodzi w innym miejscu cząsteczki niż pierwszy proces utlenienia (to jest przyjęcie elektronu z innej cząsteczki reagującej). Takie rozdzielenie dwóch pierwszych substratów fotosyntezy zapobiegałoby ich natychmiastowej rekombinacji i wyjaśniało wysoką wydajność procesu fotochemicznego, gdyż w odpowiednich warunkach prawie wszystkie zaabsorbowane kwanty świetlne mogłyby być wykorzystane. Dowodem przemawiającym za tą hipotezą było, zdaniem niektórych badaczy, wykrycie zarówno w chlorofilu krystalicznym (4), jak i w roślinach (8) zjawiska rezonansu paramagnetycznego, wskazującego na obecność wolnych elektronów lub rodników.



Rys. 4. Schemat międzycząsteczkowej wędrówki ekscytonów; 1) wytworzenie ekscytonu, 2) i 3) jego wędrówka, 4) jego dysocjacja.

Elektrony wolne w polu elektrycznym przyłożonym do kryształu chlorofilu powinny powodować powstanie zjawiska fotoprzewodnictwa. Zjawisko takie zaobserwowano rzeczywiście w błonkach suszonych chloroplastów, ekstraktów barwników roślinnych i chlorofilu (35, 29). Badania Terenina i Jewstigniejewa (19a) wykazały, że w kontakcie błonek chlorofilowych z roztworem zawierającym związek utleniający elektrony rozdzielone i zebrane na powierzchni błonki pod wpływem światła są wychwytywane w roztworze związków zdolnych do ich przyjęcia, a powstałe równocześnie rodniki dodatnie wędrują do drugiego krańca błonki chlorofilowej i ładują dodatnio elektrodę, na której błonka jest osadzona. Model ten wykazuje, że istnieje przestrzenne rozdzielenie ładunków w naświetlonej błonce barwnika. Czy jednak analogiczne zjawisko zachodzi w warstewkach chlorofilowych *in vivo* — trudno powiedzieć. Wydajność kwantowa wytwarzania wolnych elektronów w naświetlonych błonkach chlorofilowych jest bardzo niska a wysoka wydajność fotosyntezy pozwala brać pod uwagę jedynie procesy zachodzące z dużą wydajnością. Ponadto w czasie przewodzenia ładunków w błonce chlorofilowej *in vitro* zachodzi znaczne przesunięcie absorpcji czerwonego prążka chlorofilu z 670—680 m μ do 740 m μ , czego nie obserwuje się nigdy *in vivo*. Przesunięcie to wzrasta w miarę wzrostu wielkości kryształów chlorofilu, ponieważ jednak większość tego barwnika w komórkach żywych nie posiada regularnej struktury krystalicznej można przyjąć jedynie, że tylko w niewielkiej jego części, która występuje w postaci drobnych kryszta-

ków może zachodzić zjawisko oddzielania wolnych elektronów od rodników dodatnich i że zmiana absorpcji tym wywołana jest praktycznie niedostrzegalna.

Rosenberg (33) natomiast sądzi, że fotoprzewodnictwo nie musi być związane z wielkimi zmianami absorpcji, jeżeli poziom przewodnictwa nie wynika ze współdziałania nietrwałych fluorescencyjnych stanów pobudzenia pojedynczych cząsteczek, a ze zlania się półtrwałych stanów tripletów. Absorpcja w czerwonym prążku chlorofilu *in vivo* podnosiłaby chlorofil do stanu pobudzenia odpowiadającego pojedynczym cząsteczkom, ale elektrony spadałyby równocześnie na niższy poziom przewodnictwa wynikający ze zlewania się poziomów tripletów. Hipoteza ta jest interesująca nie dlatego, że dowodzi istnienia fotoprzewodnictwa *in vivo*, ale że przyjmuje istnienie dwóch różnych niefluorescencyjnych stanów chlorofilu o różnych poziomach emergencyjnych, przy czym w jednym z nich cząsteczki o wyższej energii nie mogą ze sobą współdziałać, natomiast w drugim — o niższym poziomie energetycznym — „zlewają się”. Ta hipoteza znajduje potwierdzenie w omówionych już doświadczeniach Witta; zgodnie z jego wynikami wyższemu stanowi odpowiadałby stan tripletu typu 0, a stanowi, w którym cząsteczki ze sobą współdziałają — stan półtrwały typu 1.

5. Fotoredukcja

W odróżnieniu od autorów teorii fotoprzewodnictwa Krasnowski (27) twierdzi, że udział chlorofilu w reakcji fotochemicznej polega na jego zdolności do pobierania w stanie zaktywowanym światłem elektronu i protonu od odpowiedniego akceptora. Jak wykazały jego doświadczenia do odwracalnej redukcji są zdolne roztwory chlorofilu lub innych barwników z układem sprzężonych wiązań podwójnych w pierścieniach zawierających heteroatomy (O lub N) i zdolnych do wytworzenia w wyniku dysmutacji związków z wszystkimi wartościami wysyconymi. Są to chlorofile *a* i *b*, bakteriochlorofil, bakterio-wirydyna, protochlorofil, odpowiednie feofityny, etylochlofilidy, różne porfiryny i barwniki grupy ftalocyjaniny. Natomiast związki nie posiadające odpowiedniego układu jak fikobiliny i karotenoidy nie podlegają fotoredukcji.

Roztwór chlorofilu w rozpuszczalniku organicznym (dwuoksan, pirydyna itp.) w atmosferze beztlenowej i w obecności odpowiedniego środka redukującego (kwasu askorbinowego), niezdolnego do redukcji barwnika w ciemności, przechodzi pod wpływem światła w zredukowaną formę, tak zwany eozynofil, posiadający różowe zabarwienie i różniący się widmem absorpcyjnym od chlorofilu wyjściowego. Po usunięciu światła w obecności odpowiednich utleniaczy, takich jak

ryboflawina, nukleotydy pirydynowe, safranina lub tlen cząsteczkowy zachodzi regeneracja chlorofilu do formy wyjściowej. Doświadczenie to wykazuje, że w czasie fotoredukcji energia świetlna może być magazynowana w produktach reakcji, która może zachodzić w kierunku odwrotnym do spadku potencjału, np. redukcja ryboflawiny przez kwas askorbinowy. Fotoredukcji towarzyszy powstawanie wolnych rodników, które można wykryć przez pomiar rezonansu paramagnetycznego. Powyższe doświadczenie jest bardzo interesującym modelem funkcjonowania chlorofilu w fotosyntezie, gdzie katalizuje on redukcję grup karbonylowych do karbonylowych przez wodę.

Coleman i Rabinowitch (7) badając widmo różnicowe *Chlorelli* przy różnych natężeniach światła stwierdzili spadek absorpcji przy 680 m μ (odpowiada to absorpcji przy 660 m μ) dla chlorofilu w roztworach), charakterystyczny dla zredukowanej formy chlorofilu. Jednak przy natężeniu światła niższym niż $3,3 \cdot 10^{14}$ kwantów/cm² sek. zmiany tej nie obserwowano. Fakt, że zmniejszenie absorpcji nie zachodzi w słabym świetle Rabinowitch tłumaczy przyjmując, że dopóki reakcja enzymatyczna powodująca utlenienie chlorofilu zachodzi równoległe z procesem fotochemicznym, dopóty odwracalna redukcja chlorofilu nie wychodzi poza stadium pośredniego wolnego rodnika i praktycznie jest bez przerwy odwracalna. Dopiero po zahamowaniu reakcji enzymatycznej rodniki chlorofilowe nagromadzają się w dostatecznym stężeniu, aby w wyniku dysmutacji ulec przemianie w bardziej trwałe, całkowicie zredukowany eozynofil, co wyraża się zmniejszeniem absorpcji przy 680 m μ . Równocześnie spada wydajność fotosyntezy i ustala się tak zwane nasycenie świetlne.

II. Przemiana energii świetlnej w energię chemiczną

1. Udział cytochromów

Na udział hemoproteidów w fotosyntezie zwrócono uwagę po odkryciu w 1951 roku przez Hilla i Scarisbricka (18) zmodyfikowanej formy cytochromu c. Następnie stwierdzono, że cytochromy tego typu są bardzo rozpowszechnione w organizmach fotosyntetyzujących, a mianowicie: glonach (9), pierwotniakach (31) i bakteriach (21, 30). U roślin zielonych występuje cytochrom typu c zwany cytochromem f oraz cytochrom typu b zwany cytochromem b₆. Zarówno cytochrom f, jak i cytochrom b₆ występują w chloroplastach w stężeniu 1 mola na 300—400 moli chlorofilu. Nie wykryto natomiast w chloroplastach oksydazy f-cytochromowej.

Chance (6) twierdzi, że trudno jest zbadać, które z cytochromów są związane wyłącznie z oddychaniem, a które wyłącznie z fotosyntezą i czy te funkcje dają się zawsze rozdzielić. Chance (32) badając

szczegółowo zmiany barwników hemowych u *Bacterium chromatium* wywołane ich utlenieniem pod wpływem światła stwierdził, że zmiana absorpcji jednego z cytochromów, a mianowicie cytochromu c_2 , jest zupełnie niewrażliwa na bardzo niską temperaturę, podczas gdy wszystkie inne barwniki (cytochromy i karotenoidy) nie wykazywały zmiany absorpcji pod wpływem światła w temperaturze niższej od -20° . Natomiast wielkość zmiany absorpcji cytochromu c_2 przy 423,5 m μ jest niezależna od temperatury; jest on zatem zdaniem Chance'a ściśle związany z pierwotną reakcją fotochemiczną.

Witt mierząc widma różnicowe przy zastosowaniu światła przerywanego stwierdził w chromatoforach roślin zielonych zmiany absorpcji podobne do wykrytych uprzednio przez Duysensa (11) dla fotosyntezy w świetle ciągłym. Zmiany te zachodzą przy 420, 475 i 515 m μ i trwają 10^{-2} sek. Można je rozdzielić na dwie różnego typu, oznaczone przez autora jako typ 2a (przy 420 m μ) i typ 2b (przy 475 i 515 m μ). Po wyekstrahowaniu chromatoforów eterem naftowym zmiana typu 2b znika, natomiast zmiana typu 2a ulega przesunięciu z 420 do 425 m μ . Absorpcja typu 2b pojawia się na nowo, gdy ekstrakt dołączy się z powrotem do chromatoforów. Po oziębieniu chromatoforów do temperatury -150° absorpcja typu 2b zanika również, natomiast zmiana typu 2a zostaje przesunięta do 425 m μ . Ponieważ po przerywaniu światła przy -150° zmiana absorpcji nie ustępuje, Witt twierdzi, że jest ona wywołana obecnością związku, który jest jednym z pierwszych produktów reakcji fotochemicznej uwięzionym w niskiej temperaturze. Może on być uwolniony dopiero po podniesieniu temperatury powyżej 0° , co objawia się przywróceniem zdolności reagowania zmianami absorpcji na przerywane błyski świetlne. Zdaniem Witta związek wykazujący zmianę absorpcji przy 420—425 m μ jest identyczny z cytochromem utlenionym, analogicznym do wykrytego uprzednio przez Chance'a w *Bacterium chromatium*. Widma różnicowe dla przemian typów 2a i 2b są podane na rys. 3, same przemiany są przedstawione na schemacie 1.

Zatem u roślin zielonych, u których nie znaleziono oksydazy f-cytochromowej i w których — jak wykazały badania Witta naświetlenie powoduje bardzo szybkie utlenienie cytochromów sprzężone ze zmniejszeniem absorpcji chlorofilu oraz powstaniem zredukowanych nukleotydów pirydynowych (34), najprawdopodobniej rolę oksydazy odgrywa sam chlorofil po pobudzeniu światłem. Fotoutlenienie składnika cytochromowego przez pobudzony chlorofil należało by więc uważać za pierwszy proces chemiczny w fotosyntezie. Czynnikiem redukującym w tej reakcji byłby sam zredukowany chlorofil lub jakiś inny donator elektronów. Mechanizm zamiany energii świetlnej w energię chemiczną zdaniem Kamena (20) można sobie wyobrazić w następujący sposób. Absorpcja kwantu świetlnego przez cząsteczkę chlorofilu powo-

duje pobudzenie chelatu tetrapiroloowo-magnezowego do stanu pobudzonego singletu, z którego energia pobudzenia może wędrować aż do cząsteczek chlorofilu sąsiadujących z grupami hemowymi hemoproteidów. Energia pobudzenia chlorofilu w takich chlorofilowo-hemowych kompleksach powoduje przeniesienie ładunku czyli wędrówkę elektronu z hemu (chelate żelazowy) na chlorofil (chelate magnezowy) pozostawiając oba związki, tj. zredukowany chlorofil i utleniony hem, w ich stanach podstawowych. Możliwość takiego przenoszenia ładunku jest bardzo prawdopodobna dzięki podobieństwu strukturalnemu chlorofilu i hemu, gdyż oba te związki zawierają układ sprzężonych wiązań podwójnych w tetrapirołowych chelatach z metalami.

Udział obu cytochromów związanych z reakcją fotochemiczną u roślin zielonych wyobraża sobie Hill (19) w ten sposób, że cytochrom *f* jest utleniany, a cytochrom *b₆* zredukowany w dwukwantowym procesie przenoszenia elektronów zainicjowanych absorpcją światła. Następnie w szeregu reakcji enzymatycznych zachodzi przepływ elektronów od zredukowanego cytochromu *b₆* do utlenionego cytochromu *f* i stan pierwotny zostaje przywrócony. W czasie tych reakcji mogą być wytwarzane zredukowane nukleotydy pirydynowe oraz nagromadzić się wysokoenergetyczne wiązania fosforowe.

2. Utlenianie wody

Wydzielanie tlenu u roślin zielonych jest tak ściśle związane z reakcją fotochemiczną chlorofilu, że dotychczas *in vivo* nie udało się rozdzielić tych dwóch procesów. Kompleks chlorofilowy, który utracił po wymyciu odpowiednimi roztworami zdolność włączania CO₂, redukcji nukleotydów pirydynowych i magazynowania wysokoenergetycznych wiązań fosforowych, zachowuje zdolność wydzielania tlenu. Zdolność ta nie zostaje usunięta nawet po wyekstrahowaniu rozpuszczalnikami tłuszczowymi i po liofilizacji. Ginie natomiast po mechanicznym rozdrobieniu chloroplastów na cząstki zawierające mniej niż 400 cząsteczek chlorofilu. Wydzielanie tlenu można również zahamować działając specyficznymi inhibitorami w stężeniu jednej cząsteczki na 200 cząsteczek chlorofilu (3). Zatem reakcja z wodą, jeżeli woda jest źródłem tlenu, jest ściśle związana z aktywnym kompleksem chlorofilowym. Gaffron (16) twierdzi, że również u czerwonych i zielonych bakterii fotosyntetyzujących woda jest donatorem wodoru (elektronu) potrzebnego do redukcji w fotosyntezie, chociaż nie obserwujemy u tych organizmów równoczesnego wydzielania tlenu. Na poparcie tego twierdzenia przytacza on kilka prawdopodobnych tłumaczeń popartych pewnymi dowodami doświadczalnymi.

U bakterii powstający z wody utleniony fotoprodukt może ulegać redukcji odpowiednimi donatorami wodoru, które komórka ma do dy-

spozycji, natomiast u roślin zielonych powstaje ponadto drugi utleniony fotoprodukt, który reagując z pierwszym powoduje wydzielanie tlenu. Działanie specyficznych inhibitorów można by tłumaczyć przyjmując, że reagują one tylko z drugim z tych związków. W bakteriach może również brakować jednego lub więcej enzymów potrzebnych do ukończenia przemiany pierwszego produktu utlenienia w wolny tlen. Pewnymi dowodami przemawiającymi za istnieniem jakiegoś enzymu związanego z manganem i warunkującego wydzielanie tlenu w czasie fotosyntezy byłyby dwa zjawiska, a mianowicie bardzo małe zapotrzebowanie bakterii purpurowych na ten pierwiastek (100 do 1000 razy mniejsze niż u roślin zielonych) oraz zanik zdolności wydzielania tlenu u glonów zielonych rosnących na pożywkach ubogich w mangan. W tym ostatnim przypadku wszystkie inne procesy fotosyntetyczne przebiegają normalnie (24, 39). Inhibitory hamujące specyficznie wydzielanie tlenu u roślin zielonych nie wywierają żadnego wpływu na metabolizm bakterii purpurowych (2).

Za udziałem wody we wszystkich znanych rodzajach fotosyntezy komórkowej przemawia ponadto zdolność adaptacji niektórych glonów do fotoredukcji dwutlenku węgla w atmosferze wodoru oraz stałość liczby kwantowej reakcji świetlnej, niezależna od zmiany energii swobodnej takiej reakcji.

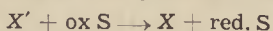
Przeszło 20 lat temu Gaffron (16) stwierdził, że wiele glonów zielonych po okresowej inkubacji w atmosferze wodoru zmienia odwracalnie właściwy sobie typ redukcji dwutlenku węgla, związany z wydzielaniem tlenu, na charakterystyczny dla bakterii purpurowych typ fotosyntezy beztlenowej. W zaadaptowanych glonach stwierdzono uaktywnienie się w okresie inkubacji beztlenowej odpowiedniej dehydrogenazy, która katalizowała reakcję redukcji powstałego w procesie fotochemicznym utlenionego produktu przy pomocy wodoru cząsteczkowego. Po przywróceniu atmosfery tlenowej glony zaczynały z powrotem wydzielać tlen w czasie fotosyntezy. Zatem w zaadaptowanych glonach intensywność światła i równowaga oksydoredukcyjna katalizatora (najprawdopodobniej cytochromu) są czynnikami wpływającymi w różnych warunkach, tj. w atmosferze tlenu lub wodoru, na przesunięcie pierwszego produktu utlenienia do układu wydzielającego tlen lub do układu dehydrogenazy katalizującego redukcję. Glony jako organizmy na wyższym stopniu rozwoju ewolucyjnego posiadają, oprócz odziedziczonego po fotosyntetyzujących bakteriach beztlenowych układu dehydrogenazy, także układ działający w sposób podobny do katalazy lub peroksydazy w warunkach tlenowych. Większość roślin utraciła już całkowicie układ dehydrogenazy i może przeprowadzać fotosyntezę jedynie w warunkach tlenowych.

Zgodnie z powyższą hipotezą fotochemiczna reakcja z wodą czyli fotoliza, polegająca na oderwaniu elektronu od grupy OH wody i pod-

niesienia go do potencjału czynnika silnie redukującego, jest reakcją zachodzącą powszechnie w kompleksach barwnikowych zarówno roślin zielonych, jak i bakterii fotosyntetyzujących. Różnica między fotosyntezą bakterii i roślin zielonych polega na różnicy w potencjałach utlenionych w procesie fotochemicznym barwników hemowych. U roślin zielonych światło czerwone, zaabsorbowane przez cząsteczki chlorofilu w najniższym stanie pobudzenia (około 1,8 EV), wystarcza do wytworzenia zredukowanego chlorofilu o potencjale wynoszącym od $-0,7$ do $1,0$ V i utlenionego hemu o potencjale około $+0,8$ V. Jeżeli hem ten jest podobnym do katalazy kompleksem żelazowym, to jego wysoki potencjał elektrochemiczny wystarcza do wydzielenia tlenu z powstałych z wody wolnych rodników OH. W bakteriach powstają kompleksy hemowe o niższym potencjale niż odpowiadający katalazie, niezdolne do wydzielenia tlenu z rodników OH, które wobec tego zostają zredukowane w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę.

Jeżeli zatem woda jest donatorem elektronów w reakcji fotochemicznej we wszystkich organizmach fotosyntetyzujących, musi istnieć jakiś mechanizm odrywający elektrony od grup OH i powodujący równoczesne powstanie odpowiednich wolnych rodników. Coraz więcej zwraca się ostatnio uwagi na chinony jako możliwe katalizatory tej reakcji. Vishniac (35) przeprowadzając fotosyntezę z fragmentami chloroplastów w wodzie znaczonej trytem stwierdził występowanie radioaktywności w chlorofilu *a* i w dwóch chinonach, jednym o maximum absorpcyjnym przy 255 m μ a drugim przy 277 m μ . Sądzi on, że są to związki o budowie podobnej do koenzymu Q lub plastochinonu, których utlenienie i redukcja prowadzi do pośredniego wytwarzania się pierścienia chromanowego, co powoduje włączanie trytu w stałe położenia w łańcuchu bocznym.

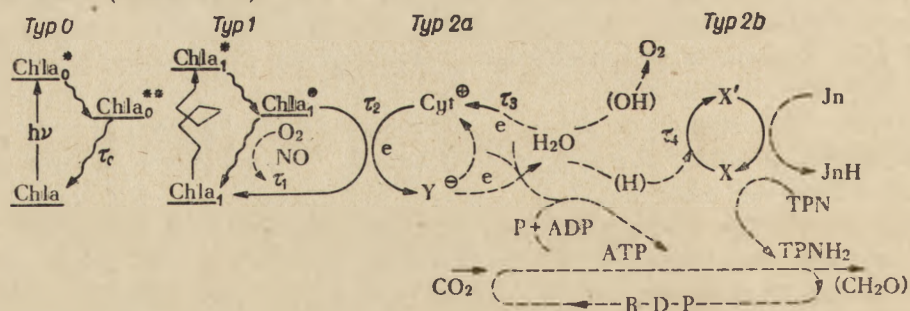
Witt badając widmo różnicowe typu 2b o okresie trwania 10^{-2} sek. dochodzi do wniosku, że jest ono wywołane powstaniem jakiejś substancji x' (co jest związane ze zwiększeniem absorpcji przy 515 m μ) z substancji x (której zanik jest związany ze zmniejszeniem absorpcji przy 475 m μ). Zmiana ta jest uzależniona od obecności wody i nie zachodzi w komórkach liofilizowanych. Wrażliwość na temperaturę powyżej 50° wskazuje na enzymatyczny charakter związku x . Po wyekstrahowaniu chloroplastów wodą pewne typy barwników zawierających utleniony atom siarki, jak indofenol, błękit metylenowy, tionina itp., o potencjale oksydoredukcyjnym do 0 V, mogą ulegać sprzężeniu z substancją x' . W wyniku tego reakcja przeciwna $x' \rightarrow x$ zostaje znacznie skrócona (do 10^{-4} sek.), ponieważ związek x jest utleniany przez barwniki zgodnie z reakcją:



Zatem x jest substancją redukcyjną, a x' — jej formą zredukowaną. Potencjał oksydoredukcyjny układu x/x' wynosi około 0 V, a stężenie $(x) = (x')$ równie 10^{-3} stężenia chlorofilu. Po wyekstrahowaniu chlo-

roplastów eterem naftowym zmiana typu 2b nie zachodzi, a pojawia się na nowo po połączeniu ekstraktu z wyekstrahowaną pozostałością. Na tej podstawie Witt sądzi, że związek x może być identyczny z plastochinonem, który również można wyekstrahować eterem naftowym. Ponieważ jednak chinon nie wykazuje absorpcji przy 515 i 475 m μ , zdaniem Witta zmiany te mogą wynikać pośrednio ze zmian absorpcji jakiegoś innego związku, np. jednego z kartoneidów, w czasie redukcji x do x' .

W ostatnich czasach coraz powszechniej przyjmuje się istnienie dwóch form chlorofilu biorących udział w fotosyntezie. W 1959 r. wyniki badań F r e n c h a (4a) potwierdziły przypuszczenie, że istnieją dwie formy chlorofilu, a , gdyż udało mu się wykazać istnienie dwóch maximumów przy 670 i 680 m μ . Witt badając zależność zmian typu 2a i 2b od długości fali światła pobudzającego stwierdził, że działanie światła o długości 670 m μ powoduje poburzenie zarówno absorpcji chlorofilu 670, jak i chlorofilu 680 z powodu nakładania się obu prążków. Natomiast naświetlenie światłem o długości 710 m μ powoduje wyłącznie pobudzenie chlorofilu 680. W pierwszym przypadku obserwuje się zmianę typu 2a i typu 2b, w drugim jedynie zmianę typu 2b. Wyniki te wskazywałyby, że fotosynteza może być związana z dwoma odrębnymi reakcjami fotochemicznymi, uczulanymi przez dwie formy chlorofilu a ; jedna z nich polegałaby na utlenieniu cytochromu przez chlorofil 680 (typ 2a), druga na redukcji związku x (czyli plastochinonu) przez chlorofil 670 (typ 2b). Łącznikiem między reakcjami 2a i 2b byłaby woda służąca do redukcji zarówno związku x (plastochinonu), jak i cytochromu. W schemacie zaproponowanym przez Witta chinon wyrywa z wody elektron pozostawiając rodnik OH. Rodnik ten jest źródłem elektronów potrzebnych do redukcji cytochromu, który pobierając je w reakcji uczulonej przez chlorofil powoduje z jednej strony wydzielenie tlenu cząsteczkowego, a z drugiej redukcję chlorofilu i utlenienie cytochromu (schemat 1).



Prążki absorpcyjne : $Chla_0^{**}$: 460 m μ ; $Chla_1^*$: 520 m μ ; Cyt_1^+ ~ 425 m μ ; X: 475 m μ ; X': 515 m μ ; Jn: 595 m μ
 Czas trwania reakcji : $\tau_0 = 10^{-9}$ sek - 10^{-5} sek; $\tau_2 = 5 \cdot 10^{-5}$ sek; $\tau_3 = 10^{-2}$ sek; $\tau_4 = 10^{-4}$ sek. Jn - dowolny akceptor wodoru

Schemat 1 Przebieg reakcji fotosyntezy wg. Witta (41)

3. Fotofosforylacja

Fotosyntetyczna fosforylacja odkryta przez Arnona (1) w 1954 r. jest jeszcze jedną reakcją związaną ściśle z procesem fotochemicznym w organizmach fotosyntetyzujących. Arnon wyróżnia dwa typy fotofosforylacji: cykliczną i niecykliczną. Pierwsza zachodzi w warunkach beztlenowych i polega na wytworzeniu ATP z ADP i fosforanów nieorganicznych na świetle przez izolowane chloroolasty. Fosforylacja niecykliczna zachodzi z udziałem wody powodując powstanie, oprócz ATP, także zredukowanych nekleotydów pirydynowych i, w przypadku roślin zielonych, wydzielanie tlenu. Bakterie fotosyntetyzujące nie wydzielają tlenu; u roślin zielonych można również przeprowadzić fosforylację niecykliczną bez wydzielania tlenu, jeżeli zastąpi się wodę (OH^-) innym donatorem elektronów, np. zredukowanym 2,6-dwuchlorofenolo-indofenolem.

W schemacie przedstawionym przez Witta obie fosforylacje są katalizowane przez układ cytochrom — chlorofil 680, różnią się tylko miejscem odpływu energii. Fosforylacja cykliczna zachodzi na koszt utlenienia chlorofilu, zredukowanego w reakcji z cytochromem, natomiast fosforylacja niecykliczna — na koszt utlenienia rodników OH w reakcji redukcji cytochromu. Pierwsza pobiera elektrony od chlorofilu po przejściu ich przez układ cytochrom — chlorofil, druga od rodników OH przed dojściem ich do tego układu. Redukcja nukleotydów pirydynowych, według Witta, zachodzi w reakcji katalizowanej przez chinon i chlorofil 670: sprzężenie jej z fosforylacją niecykliczną polegałoby na udziale wody jako źródła elektronów w obu tych procesach. Fotosynteza bakteryjna, zdaniem Arnona, różni się od roślinnej tylko tym, że bakterie wykorzystują inne donatory elektronów niż woda, np. tiosiarczany w *Bacterium chromatium*. Trudniej natomiast wyjaśnić istnienie obu typów fosforylacji w bakteriach fotosyntetyzujących w warunkach beztlenowych, dla których jednak, jak sądzi Gaffron, woda jest źródłem elektronów jak np. u *Rhodospirillum rubrum*. Zdaniem Arnona w tym przypadku należy przyjąć odpływ elektronów od zredukowanego chlorofilu do układu dehydrogenazy. Mogą one być zużyte z powrotem do redukcji rodników OH (do wody) lub też zredukować znajdujące się w środowisku protony α (do wodoru cząsteczkowego, którego wydzielanie obserwujemy w czasie fotosyntezy wielu bakterii).

Ze wszystkich dotychczas podanych, schemat Witta tłumaczy najlepiej przemiany zachodzące w samym chlorofilu, jak i procesy ściśle z nimi sprzężone. Wyjaśnia również wiele nie dających się dotychczas wytłumaczyć sprzeczności, jednak mimo istnienia wielu faktów doświadczalnych przemawiających na jego korzyść szereg zaproponowanych przez autora przemian ma charakter hipotetyczny.

Sytuację panującą obecnie w badaniach dotyczących fotochemii fotosyntezy oraz drogę, którą należało by pójść aby ją wyjaśnić, najlepiej oddają chyba słowa Frencha wypowiedziane na Kongresie w Moskwie.

„Szczegółowe zrozumienie mechanizmu reakcji fotochemicznych w odniesieniu do prostych cząsteczek osiągnięto w wielu przypadkach przez pomiar szybkości reakcji w kontrolowanych warunkach temperatury, natężenie światła i stężenia substratów. Podobne pomiary kinetyczne próbowano często stosować badając proces fotosyntezy w roślinach. Rozważanie nagromadzonych na tej drodze faktów doprowadziło do oczywistego wniosku, że proces ten składa się ze zbyt wielu różnych reakcji, aby klasyczna analiza kinetyczna mogła doprowadzić do podania jakiegoś jednolitego i możliwego do przyjęcia, wyjaśniającego go mechanizmu.

Badania biochemiczne z zastosowaniem wskaźników radioaktywnych doprowadziły do identyfikacji metabolitów pośrednich między CO_2 a cukrowcami i ustaliły prawdopodobną drogę przemian w asymilacji CO_2 . Badania te wykazały również jasno, że ilość sprzęgających się ze sobą w tym procesie reakcji jest tak duża, że klasyczna analiza fotosyntezy jako całości nigdy by nie doprowadziła do ustalenia liczby przejść i ilości nagromadzających się metabolitów, gdyby ich nie wyodrębniono”.

Wydaje się rzeczywiście, że w obecnym stanie badań nad pierwszą częścią fotosyntezy to jest cyklem przemian fotochemicznych jedynie wyizolowanie wszystkich reagujących ze sobą związków i zbadanie zachodzących między nimi przemian może doprowadzić do ostatecznego wyjaśnienia tego cyklu, podobnie jak tylko tego rodzaju badania pozwoliły Calvinowi na wyjaśnienie drugiej części fotosyntezy to jest cyklu przemian enzymatycznych związanych z włączaniem dwutlenku węgla.

L I T E R A T U R A

1. Arnon D. I., *Nature*, **184**, 10, (1959).
2. Bartch R. G., Kamen M. D., *J. Biol. Chem.* **230**, 41 (1958).
3. Bishop N. I., *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 205 (1958).
4. Brody S. S., Newell G., Castner T., *J. Phys. Chem.* **64**, 454, (1960).
- 4a. Brown J. S., French C. S., *Plant Physiol.* **34**, 305 (1959).
5. Calvin M., Bradley D. F., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **41**, 563 (1955).
6. Chance B., Nishimura M., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **46**, 19 (1960).
7. Coleman J. W., Rabinowitch E., *J. Phys. Chem.* **63**, 30 (1959).
8. Commoner B., Heise J. Townsend J., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **42**, 710, (1956).
9. Davenport H., Hill R., *Proc. Roy. Soc. B* **139**, 327 (1952).
10. Dutton H. J., Manning W. M., Duggar B. M., *J. Phys. Chem.* **47**, 308 (1943).

11. Duysens L. N., *Science* **120**, 353 (1954).
12. Foerster T., *Ann. Physik* **2**, 55 (1948).
13. Foerster T. Fluoreszenz organischer Verbindungen, Gottingen, 1951.
14. Franck J., *Proc. Nat. Acad. Sci* **44**, 941 (1958).
15. Frenkel J. I., *Phys. Rev.* **37**, 17, 1276 (1931).
16. Gaffron H., *Biol. Rev.* **19**, 1 (1944).
17. Goedheer J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 471 (1955).
18. Hill R., Scarisbrick R., *New Phytol.* **50**, 98 (1951).
19. Hill R., Bendal F., *Nature* **186**, 136 (1960).
- 19a. Jewstigniejew W. B., Terenin A., *Dokł. Akad. Nauk SSSR*, **81**, 223 (1951).
20. Kamen M. D., *Bacteriol. Revs.* **19**, 250 (1955).
21. Kamen M. D., Vernon L. P., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 10 (1955).
22. Katz E. Rozdział w monografii „Photosynthesis in plants” Ames, Iowa 1949.
23. Kebler E., Witt H. T., *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 134 (1960).
24. Kessler E. *Planta* **49**, 435 (1955).
25. Kok B., *Biochim. Biophys. Acta* **22**, 399 (1956).
26. Kok B., *Plant Physiol.* **34**, 184 (1959).
27. Krasnowski A. A., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **11**, 369 (1960).
28. Livingston R., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2179 (1955).
29. Nelson R. C., *J. Chem. Phys.* **27**, 864 (1957).
30. Newton J. W., Kamen M. D., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 71 (1956).
31. Nishimura M. J. *Biochem (Japonia)* **46**, 216 (1959).
32. Olson J. M., Chance B., *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 40 (1960).
33. Rosenberg B., *J. Chem. Phys.* **29**, 1108 (1958).
34. Smith L., Chance B., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **9**, 449 (1958).
35. Terenin A., Ermolayev N., *Trans. Farad. Soc.* **52**, 1042 (1956).
36. Terenin A., Putseiko E., Akimow I., *J. Chim. Phys.* **54**, 716 (1957).
37. Thomas J. B., Minnaert K., Elbers P. F., *Acta Bot. Neerlandica* **5**, 315 (1956).
38. Vishniac W. „Path of Hydrogen in Photosynthesis” referat na V Kongresie Biochemicznym w Moskwie 1961.
39. Wiessner W., *Flora* **149**, 1 (1955).
40. Witt H. T. i wsp., *Z. f. Phys. Chem. N. F.* **20**, 193, 153, 283 (1959).
41. Witt H. Impuls Spectrophotometry in the Investigation of the Primary Process of Photosynthesis, referat na V Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym w Moskwie, 1961.

P O L S K A A K A D E M I A N A U K

ROCZNIKI CHEMII

(ANNALES SOCIETATIS CHIMICAE POLONORUM)

DWUMIESIĘCZNIK

TOM 35 - ZESZYT 4

WARSZAWA 1961

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

LECH WOJTCZAK*

Fosforylacja oksydacyjna

Oxidative Phosphorylation

Historic background and modern aspects of oxidative phosphorylation are reviewed.

Zasadniczym momentem w gospodarce energetycznej komórki jest zamiana swobodnej energii utleniania na energię wiązania pirofosforanowego cząsteczki ATP. Skomplikowany zespół reakcji enzymatycznych, które proces utleniania komórkowego sprzęgają z procesem syntezy ATP, oznaczamy mianem oksydacyjnej fosforylacji.

Zjawisko estryfikacji nieorganicznego fosforanu towarzyszące reakcjom utleniania zaobserwował i opisał pierwszy Kalckar (33, 34). Bielicer i Cibakowa (1, 2) stwierdzili, że na jeden atom tlenu zużytego przez miążgę z mięśnia w trakcie utleniania kwasu mlekowego przypada związaną więcej niż jednej cząsteczki ortofosforanu. Proces estryfikacji fosforanu zachodził również po zablokowaniu glikolizy, z czego autorzy (1, 2) wysnuli wniosek, że nie polega on na znanych już wówczas reakcjach syntezy ATP w toku glikolizy. Do podobnych rezultatów doszli niezależnie autorzy amerykańscy (14, 15, 50). Maksymalna wartość stosunku atomów związanego fosforanu do atomów zużytego tlenu przekraczała liczbę 2.

Obecnie przyjmuje się, że całkowite utlenienie cząsteczki glikozy połączone jest z syntezą 38 wysokoenergetycznych wiązań ATP. W toku beztlenowej glikolizy powstają netto zaledwie dwie cząsteczki ATP. Synteza pozostałych 36 cząsteczek ma miejsce podczas utleniania produktów beztlenowej glikozy, czyli kwasu mlekowego lub ewentualnie kwasu pirogronowego i powstałego w czasie glikozy DPNH. Jak z tego widać, w warunkach aerobowych glikoliza pokrywa tylko małą część zapotrzebo-

* Doc. dr, samodzielny pracownik naukowy Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

wania energetycznego organizmu; cała reszta przypada na oksydacyjną fosforylację. Średni stosunek cząsteczek związanego fosforanu do atomów zużytego tlenu (P:O) wynosi w cyklu Krebsa 3, zatem całkowitemu utlenieniu cząsteczki kwasu pirogronowego towarzyszy wytworzenie 15 cząsteczek ATP. Mimo intensywnych badań nad procesem sprzężenia reakcji syntezy ATP z reakcjami utleniania komórkowego, prowadzonych od ponad 10 lat, mechanizm większości tych reakcji nie został dotychczas całkowicie wyjaśniony.

I. Fosforylacje substratowe i fosforylacje „na poziomie łańcucha oddechowego“

Reakcją stosunkowo dobrze poznaną w zakresie fosforylacji jest powstawanie wysokoenergetycznego połączenia fosforanowego w toku utleniania aldehydu 3-fosfoglicerynowego. W reakcji tej bierze udział cząsteczka kwasu fosforowego i DPN. Jako produkty reakcji powstają: cząsteczka DPNH oraz cząsteczka kwasu 1,3-dwufosfoglicerynowego, w której wiązanie między atomem fosforu a atomem węgla 1 kwasu glicerynowego jest typu bezwodnikowego. Reakcja ta (w przeciwieństwie do reakcji powstawania kwasu 2-fosfoenolopirogronowego, która — formalnie biorąc — polega na dehydratacji kwasu 2-fosfoglicerynowego) ma charakter oksydacyjnej fosforylacji, gdyż wysokoenergetyczne wiązanie fosforanowe powstaje tu w toku procesu utlenienia. „Nośnikiem” tego wiązania jest cząsteczka utlenionego substratu, stąd tego rodzaju oksydacyjna fosforylacja nosi nazwę fosforylacji „na poziomie substratu”, lub prościej „fosforylacji substratowej”. Reszta fosforanowa przy C₁ kwasu 1,3-dwufosfoglicerynowego może być przeniesiona na cząsteczkę ADP, w rezultacie czego powstaje cząsteczka ATP.

Innym przykładem fosforylacji substratowej jest reakcja oksydacyjnej dekarboksylacji kwasu α -ketoglutarynowego do kwasu bursztynowego. W toku tej reakcji powstaje wysokoenergetyczne połączenie produktu reakcji, kwasu bursztynowego, z koenzymem A. Rozpad tego związku może być sprzężony z połączeniem się cząsteczki ADP z cząsteczką kwasu fosforowego w cząsteczkę ATP (35).

Fosforylacje substratowe stanowią jednak małą część reakcji fosforylacyjnych zachodzących w komórce. Większość z nich nie jest połączona z reakcjami oksydoredukcyjnymi „na poziomie substratu”, lecz z reakcjami zachodzącymi w obrębie tzw. „łańcucha oddechowego”. Artykuł niniejszy poświęcony jest głównie omówieniu tych właśnie procesów oksydacyjnej fosforylacji „na poziomie łańcucha oddechowego”.

II. Wydajność oksydacyjnej fosforylacji

Wydajność oksydacyjnej fosforylacji przyjęto wyrażać stosunkiem ilości cząsteczek związanego ortofosforanu do ilości atomów zużytego tlenu i oznaczać symbolem P:O. W przypadkach, gdy akceptorem elektronów nie jest tlen cząsteczkowy, wydajność fosforylacji wyraża się ilością związanego fosforanu na parę przeniesionych elektronów ($P : 2e$). Zużycie tlenu w badaniach fosforylacyjnych bądź mierzy się manometrycznie (aparatus Warburga) lub polarograficznie, bądź oblicza z ilości utlenionego substratu lub powstałego produktu utlenienia. Ilość związanego fosforanu oblicza się z ubytku ortofosforanu w środowisku lub przez bezpośredni pomiar wytworzonego ATP. Najczęściej stosowany i najdogodniejszy układ wytwarza się w ten sposób, że do środowiska inkubacyjnego dodaje się heksokinazę i glikozę. Wówczas zamiast ATP gromadzi się znacznie od niego trwalszy glikozo-6-fosforan. W tych warunkach oznaczać można również ubytek ortofosforanu w środowisku lub przyrost glikozo-6-fosforanu (54).

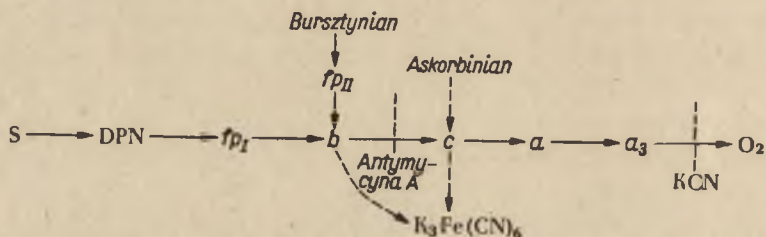
Charakter metod pomiarowych jest tego rodzaju, że oznaczenie zużycia tlenu obarczone jest zazwyczaj błędem *in plus*, natomiast oznaczenie ilości powstałego ATP lub ubytku ortofosforanu — błędem *in minus*. W rezultacie obliczony z tych danych stosunek P : O jest zazwyczaj niższy niż faktyczna wydajność fosforylacji. Jeżeli synteza ATP sprzężona jest z reakcjami utleniania poprzez procesy chemiczne, do których stosują się zasady stechiometrii, wydaje się rozsądne przypuszczać, że przeniesieniu pary elektronów z substratu na tlen powinno towarzyszyć powstanie pewnej całkowitej liczby wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych. Wychodząc z tego założenia i pamiętając o tym, że stosunek P : O obarczony jest zazwyczaj błędem *in minus*, przyjęto oznaczony doświadczalnie stosunek P : O zaokrąglając w górę do najbliższej liczby całkowitej i tak znalezionej wartość uważać za odpowiadającą rzeczywistej wydajności fosforylacji.

Jak już powiedziano poprzednio, średnia wartość P : O w cyklu Krebsa wynosi 3. Wartość tę wykazują wszystkie procesy utleniania, w których bierze udział DPN (9, 41, 56). Istnieją jednak w cyklu Krebsa dwie reakcje utleniania, dla których stosunek P : O jest różny od 3. Jest to utlenienie kwasu α -ketoglutarynowego do kwasu bursztynowego, któremu towarzyszy powstanie czterech wiązań wysokoenergetycznych ATP na jeden atom zużytego tlenu, oraz utlenienie kwasu bursztynowego do kwasu fumarowego z dwiema fosforylacjami przypadającymi na atom pobranego tlenu. Spośród czterech fosforylacji towarzyszących utlenieniu kwasu α -ketoglutarynowego jedna jest fosforylacją substratową (patrz wyżej), zaś pozostałe trzy przebiegają na poziomie łańcucha oddechowego i towarzyszą przeniesieniu pary elektronów z cząsteczki DPNH na tlen. Utlenianie kwasu bursztynowego do kwasu

fumarowego przebiega częściowo na innej drodze niż utlenianie substratów, przy udziale DPN, z czym wiąże się odmiana wydajność fosforylacji (patrz np. 55). Wartość P : O równą 2 znaleziono również dla reakcji utleniania glicerolo-3-fosforanu (53), która to reakcja także nie przebiega poprzez system nukleotydów pirydynowych.

III. Lokalizacja reakcji fosforylacyjnych w łańcuchu oddechowym

Zespół przenośników elektronów tworzący tzw. „łańcuch oddechowy” przedstawia schemat 1. Litera S symbolizuje tu substraty, które utleniane są przy udziale dehydrogenaz związanych z DPN; fp_I oznacza enzym flawinowy przenoszący elektrony z cząsteczki DPNH na układ cytochromowy; fp_{II} oznacza dehydrogenazę kwasu bursztynowego, będącą również flawoproteidem. Litery b, c, a i a_3 stanowią skróty nazw cytochromów oznaczonych tymi literami. Strzałki ciągłe wskazują normalny, „fizjologiczny” kierunek transportu elektronów w łańcuchu. Strzałki przerywane obrazują transport elektronów w przypadku użycia sztucznych donatorów lub akceptorów elektronów. Pionowe linie przerywane wskazują przypuszczalnie miejsca przerywania łańcucha oddechowego przez trucizny oddechowe.



Schemat 1. Łańcuch oddechowy

Umiejscowienia poszczególnych reakcji fosforylacji na odpowiednich odcinkach łańcucha oddechowego można było dokonać przerywając normalny bieg elektronów w różnych punktach łańcucha przez zastosowanie specyficznych inhibitorów i skierowując tok elektronów na „boczny tor” przez dodanie sztucznych, nieenzymatycznych donatorów lub akceptorów elektronów. Przede wszystkim stwierdzono (24, 40), że fosforylacja towarzyszy nie tylko utlenianiu związków cyklu Krebsa, lecz także tulenianiu dodanego DPNH. Bliższą lokalizację fosforylacji udało się osiągnąć stosując nieenzymatyczne utleniacze i reduktory cytochromu c. Do reduktorów cytochromu c należą między innymi kwas askorbinowy i adrenalina. W przypadku, gdy jako jedyne substratu dodano do zawiesiny mitochondriów askorbinianu, udało się uzyskać fosforylację, której zmierzony stosunek P : O był mniejszy od jedno-

ści (24, 32). Wykazano w ten sposób, że jedna z fosforylacji zachodzi na etapie cytochrom *c* — tlen cząsteczkowy.

Jeśli przez zatrucie łańcucha oddechowego przy pomocy cyjanku przerwano transport elektronów pomiędzy cytochromem *c* a tlenem, natomiast dodano sztucznego akceptora elektronów w postaci żelazicyjanku, otrzymano fosforylację, dla której stosunek $P : 2e$ przewyższał niekiedy wartość 1, wskazując tym samym na dwie fosforylacje na etapie pomiędzy substratem a cytochromem *c*. W przypadku przerwania transportu elektronów pomiędzy cytochromami *b* i *c* przy pomocy antymycyny A i zastosowania żelazicyjanku jako akceptora elektronów uzyskano tylko jedną fosforylację. Podobnie jedną fosforylację otrzymano na etapie bursztynian — cytochrom *c* (20).

Wyniki te, uzyskane przy zastosowaniu нефизjologicznych akceptorów i donatorów elektronów, mogą budzić pewne zastrzeżenia. Toteż ważnym osiągnięciem było wykazanie, że przy użyciu wyłącznie „fizjologicznego” akceptora i donatora elektronów w postaci zredukowanego lub utlenionego cytochromu *c*, dodanego w dużych ilościach, uzyskuje się podobne wartości $P : 2e$, mianowicie zbliżone do 2 na etapie DPNH — cytochrom *c* (22, 41) i zbliżone do 1 na etapie cytochrom *c* — O_2 (17, 49).

W rezultacie ustalono, że miejsca fosforylacji w łańcuchu oddechowym znajdują się:

- 1) między DPN a cytochromem *b*,
- 2) między cytochromem *b* a cytochromem *c*, oraz
- 3) między cytochromem *c* a tlenem cząsteczkowym.

Bardziej precyzyjną lokalizację miejsc fosforylacji dały rozważania termodynamiczne. Energia swobodna hydrolizy ATP do ADP i ortofosforanu wynosi około 12 000 kal*. Resynteza ATP wymaga zatem dostarczenia conajmniej tyleż energii. Znając wartość potencjałów oksydoredukcyjnych poszczególnych komponentów łańcucha oddechowego łatwo obliczyć energię swobodną uzyskaną przez przeniesienie elektronów z jednego przenośnika na drugi. Wynosi ona:

$$\Delta F^0 = -nf \Delta E_0$$

gdzie F^0 oznacza energię swobodną reakcji, E_0 — różnicę potencjałów oksydoredukcyjnych, n — ilość przeniesionych elektronów, f — stałą Faradaya. Podstawiając $f = 23\,063$ kal/wolt oraz $n = 2$ (przeniesienie pary elektronów) otrzymujemy:

$$\Delta F^0 = -46\,126 \cdot \Delta E_0$$

Stąd wynika, że dla uzyskania ΔF równej 12 000 kal. konieczna jest różnica potencjałów oksydoredukcyjnych wynosząca conajmniej $\Delta E_0 = 0,26$ wolta.

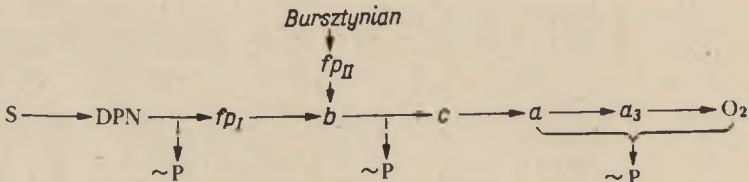
* W fizjologicznych warunkach *pH* i stężenia reagentów.

Tablica 1 zawiera wartości potencjałów oksydoredukcyjnych przenośników elektronów w łańcuchu oddechowym. Widać z niej, że do-

Tablica 1
Potencjały oksydoredukcyjne niektórych układów łańcucha oddechowego.

Nazwa układu	E'_0 (pH 7) V
DPN/DPNH	-0,32
FAD/FADH ₂	0,0
cyt. c (Fe ⁺⁺⁺)/cyt. c (Fe ⁺⁺)	+0,26
cyt. a (Fe ⁺⁺⁺)/cyt. a (Fe ⁺⁺)	+0,29
O ₂ /H ₂ O	+0,81

statecznie duża różnica potencjałów, umożliwiająca syntezę ATP, ma miejsce pomiędzy DPN a enzymem flawinowym, pomiędzy enzymem flawinowym a cytochromem c oraz pomiędzy cytochromem a a tlenem cząsteczkowym (patrz również 43). Prawdopodobnie umiejscowienie fosforylacji w łańcuchu oddechowym zgodnie z tymi rozważaniami podano na schemacie 2.



Schemat. 2. Umiejscowienie procesów fosforylacji na poziomie łańcucha oddechowego

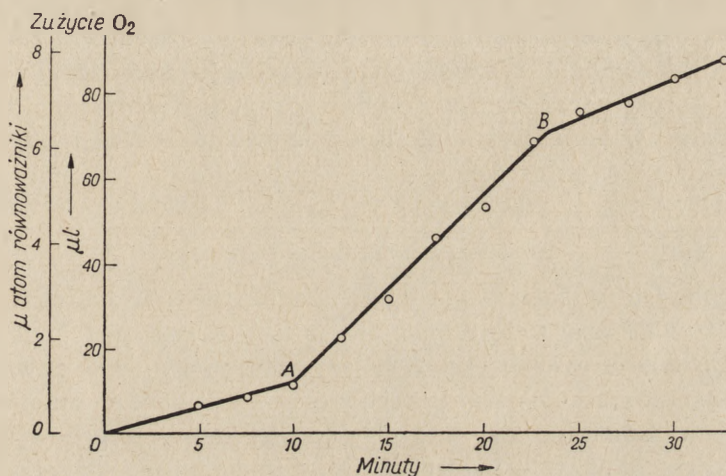
IV. Mechanizmy oksydatywnej fosforylacji

Mechanizm wiążący syntezę ATP z procesami oksydoredukcji nie jest dotychczas znany. Jednak prowadzone od szeregu lat wnikliwe badania nad samym zjawiskiem fosforylacji oraz procesami, które niewątpliwie z fosforylacją mają ścisły związek, pozwoliły na stworzenie na razie hipotetycznego schematu fosforylacji.

1. "Sprzężenie"

Olbrzymia większość procesów oddechowych komórki zwierzęcej zlokalizowana jest w mitochondriach (S ch n e i d e r, cyt wg 23, także 36). Tam też zachodzi sprzężona z utlenianiem synteza ATP. Świeżo wyizolowane i nieuszkodzone mitochondria niektórych tkanek (np. wątroby) wykazują stosunkowo słabą aktywność oddechową wobec substratów, o których wiadomo, że są energicznie utleniane przez całe komórki (7).

Szybkość utleniania jednakże gwałtownie i znacznie wzrasta, jeśli do środowiska zawierającego mitochondria i substrat oddechowy dodać ortofosforanu i ADP (7). Preparat mitochondrialny wykazujący taką właściwość nazwano „ściśle sprzężonym”, gdyż procesy utleniania są w nim sprzężone z procesem syntezy ATP i nie mogą zachodzić albo zachodzą tylko w słabym stopniu, jeśli synteza ATP nie jest możliwa (np. z powodu braku ADP lub ortofosforanu). Tę cechę „ściśle sprzężonych” mitochondriów ilustruje rys. 1.



Rys. 1. Zużycie tlenu przez „ściśle sprzężone” mitochondria wątroby szczura. Mitochondria zawieszono w roztworze buforowym fosforanów zawierającym glutaminian jako substrat oddechowy. W punkcie A dodano 6 μmoli ADP.

Na rysunku tym widać, że okres intensywnego zużycia tlenu zainicjowany zostaje przez dodatek do środowiska ADP (środowisko inkubacyjne zawierało już ortofosforan) i trwa tak długo, dopóki cały dodany ADP nie przejdzie w ATP. Wyniki doświadczenia przedstawionego na rys. 1 dają jeszcze jedną możliwość oznaczenia stosunku P : O. Wystarczy mianowicie zmierzyć ilość tlenu zużytego przez układ w czasie intensywnego utleniania, to jest od momentu dodania ADP (punkt A) do momentu jego wyczerpania (punkt B) i odnieść tę ilość do ilości dodanego ADP.

Ściśle sprzężone mitochondria stanowią niezwykle cenny materiał badania oksydatywnej fosforylacji. Miarą sprzężenia jest wrażliwość ich oddychania na dodatek ADP. Im niższe jest utlenianie substratów oddechowych przez mitochondria w nieobecności ADP i im wyższa stymulacja tego utleniania przez ADP, tym preparat jest bardziej „sprzężony”. Stosunek natężenia zużycia O_2 po podaniu ADP do natężenia zużycia tlenu w nieobecności ADP oznaczany bywa w literaturze anglosaskiej mianem *respiratory control* (kontrola oddechowca).

Stan „ściśłego sprzężenia” jest bardzo nietrwały. Już kilkunastogodzinne

przetrzywanie mitochondriów w temperaturze 0° lub kilkudziesięciominutowe w temperaturze pokojowej powoduje zazwyczaj całkowity zanik „kontroli oddechowej”. Mitochondria takie utleniają intensywnie substraty oddechowe nawet w nieobecności ADP i dodatek tego nukleotydu nie zwiększy szybkości utleniania, chociaż zdolność mitochondriów do syntetyzowania ATP nie zostaje zazwyczaj jeszcze zniesiona. Stan taki nazywamy „luźnym sprzężeniem”. Dalsze przetrzymywanie mitochondriów powoduje zanik syntezy ATP czyli „rozprężenie” fosforylacji. Oczywiście między stanem „ścisłego sprzężenia”, „luźnego sprzężenia” i „rozprężenia” istnieje szereg stadiów pośrednich. Rozprężenie fosforylacji powodują również różnego rodzaju uszkodzenia mitochondriów a także szereg substancji chemicznych. Wśród nich najczęściej stosowane są w badaniach nad fosforylacją chlorowco- i nitropochodne fenoli, np. 2,4—dwunitrofenol.

2. Adenozynotrójfosfataza (ATP-aza)

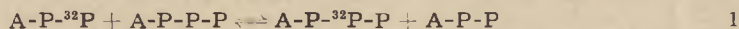
Mitochondria wykazują zazwyczaj dużą aktywność hydrolityczną wobec ATP. ATP-aza mitochondrialna aktywowana jest przez magnez i różni się właściwościami od ATP-azy miozynowej. Od dawna zauważono, że aktywność ATP-azy mitochondriów jest bardzo zmienna i w dużym stopniu zależy od sposobu ich otrzymywania, przechowywania itp. Odpowiednio delikatnie wyizolowane mitochondria wątroby nie wykazują prawie wcale własności hydrolizowania ATP (38). Jednakże przetrzymywanie takich mitochondriów przez pewien czas w temperaturze pokojowej powoduje stopniowy wzrost aktywności ATP-azy. W związku z tym ATP-azę tę nazwano utajoną czyli „latentną”. Zwrócono uwagę na fakt, że niską aktywność ATP-azy wykazują preparaty mitochondriów o wysokim stopniu sprzężenia oksydatywnej fosforylacji i że wraz z postępującym rozprężeniem aktywność enzymu narasta. Stwierdzono również, że 2,4—dwunitrofenol i inne substancje rozprężające fosforylację znacznie stymulują ATP-azę mitochondrialną czyli wyzwala ją ATP-azę utajoną. Na podstawie tych i podobnych obserwacji wysunięto przypuszczenie (39, 31), że ATP-aza mitochondrialna jest związana z systemem enzymatycznym oksydatywnej fosforylacji, jest — być może — częścią tego systemu, która pod wpływem „starzenia” lub czynników chemicznych uległa uszkodzeniu i w miejsce syntezy ATP katalizuje jego rozpad. Stymulowana przez czynniki rozprężające mitochondrialna ATP-aza jest silnie hamowana przez azydki.

3. Reakcje wymiany ATP-P i ATP-ADP

Boyer i współpracownicy (4) zauważyli, że mitochondria wątroby inkubowane w środowisku zawierającym ATP i ortofosforan znaczoney ^{32}P katalizują inkorporację radioaktywnego fosforanu do cząsteczki ATP.

W badaniach tych środowisko nie zawierało substratów oddechowych, wobec czego nie mogła zachodzić synteza ATP drogą oksydacyjnej fosforylacji. I rzeczywiście, ilość ATP w mieszaninie inkubacyjnej nie ulegała zmianom lub nawet nieco malała na skutek aktywności ATP-azy. Zatem inkorporacja ^{32}P do ATP musiała być wynikiem jakichś reakcji wymiany, a nie syntezy netto. Zauważono również (4), że wymiana ATP—P hamowana jest przez czynniki rozprzegające oksydacyjną fosforylację (2,4-dwunitrofenol), co nasunęło przypuszczenie, że proces ten stanowi — być może — jakiś etap reakcji fosforylacji (57). Na reakcję wymiany ATP—P, podobnie jak na aktywność ATP-azy, działają silnie hamująco azydki.

Spostrzeżono, że mitochondria (60) a także zdolne do fosforylacji submitochondrialne cząstki (19) mogą katalizować nie tylko wymianę ATP—P lecz również wymianę reszty fosforowanej między cząsteczkami ATP i ADP. Jeśli środowisko inkubacyjne zawiera niepromieniotwórczy ATP oraz ADP znaczone węglem ^{14}C w pierścieniu purynowym lub fosforem ^{32}P w drugiej reszcie fosforanowej, to w czasie inkubacji radioaktywność pojawia się w cząsteczce ATP. Reakcję tę można wyobrazić sobie następująco:



W świeżo przygotowanych mitochondriach lub cząstkach submitochondrialnych reakcja ta, podobnie jak wymiana ATP—P, hamowana jest przez substancje rozprzegające oksydacyjną fosforylację. W miarę „starzenia” preparatów mitochondrialnych (to znaczy dłuższego inkubowania bez substratów oddechowych i ATP), reakcja staje się stopniowo nieczuła na 2,4-dwunitrofenol (46, 61). W przeciwieństwie do wymiany ATP—P reakcja wymiany ATP—ADP jest niewrażliwa na działanie azydków. Co więcej, dodatek azydku sprawia, że reakcja staje się nieczuła na hamujące działanie 2,4-dwunitrofenolu.

4. Schemat fosforylacji

Wyżej opisane obserwacje i zależności pozwoliły na stworzenie hipotetycznego schematu reakcji wiążących proces transportu elektronów z syntezą ATP. Zjawisko „ściśłego sprzężenia” nasunęło przypuszczenie (6, 8, 9, 10) o istnieniu jakiegoś naturalnego inhibitora blokującego łańcuch oddechowy w nieobecności ADP i ortofosforanu. Inhibitor ten miałby wiązać się wiązaniem wysokoenergetycznym z którymś z komponentów łańcucha oddechowego i w ten sposób blokować transport elektronów. Dopiero przy udziale ADP i ortofosforanu połączenie to zostawałoby „roziadowane” i oddychanie mogłoby zachodzić dalej. Ten hipotetyczny inhibitor przyjęto w ostatecznych schematach oznaczać

literą I. Transport elektronów na tych etapach łańcucha oddechowego, na których zachodzi fosforylacja, wyglądałby zatem następująco:



gdzie litery A i B symbolizują reagujące ze sobą nośniki elektronów w formie utlenionej, zaś AH_2 i BH_2 — w formie zredukowanej. Jest teoretycznie możliwe, że inhibitor wiąże się bądź z utlenioną, bądź ze zredukowaną formą nośnika elektronów. Większość autorów na podstawie danych, których nie będziemy tutaj szerzej omawiać, przyjmuje za bardziej prawdopodobne łączenie się utlenionej formy nośnika z inhibitorem, jak w reakcji 2. Jedynie Chance (8) sądzi, że wysokoenergetyczne połączenie z inhibitorem tworzy zredukowana forma nośnika.

Reakcja 2 jest termodynamicznie odwracalna i zachodzi z nieznacznym tylko efektem energetycznym. Energia swobodna reakcji przeniesienia pary elektronów z nośnika o niższym potencjale oksydoredukcyjnym (A) na nośnik o potencjale wyższym (B) ulega, w myśl teorii, zmagazynowaniu w wiązaniu między A i I. W nieobecności ADP lub ortofosforanu w układzie „ściśle sprzężonym” cała dostępna ilość nośnika A ulega niemal natychmiastowemu związaniu, co tłumaczyłoby bardzo małe natężenie procesów oddychania w tych warunkach.

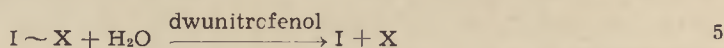
Połączenie $A \sim I$ ulega „rozładowaniu” dopiero w obecności ADP i ortofosforanu i jest sprzężone z syntezą ATP. Jednakże szereg danych doświadczalnych, między innymi brak wyraźnej zależności aktywności ATP-azy oraz reakcji wymiany $ATP \rightarrow P$ od stopnia utlenienia czy zredukowania ogniwi łańcucha oddechowego, skłaniają do przypuszczenia, że połączenie $A \sim I$ nie bierze bezpośredniego udziału w reakcji syntezy ATP. Wydawało się konieczne wprowadzenie jeszcze jednej reakcji i jeszcze jednego hipotetycznego związku X:



Dopiero połączenie $I \sim X$ reaguje ze związkami fosforowymi według schematu:

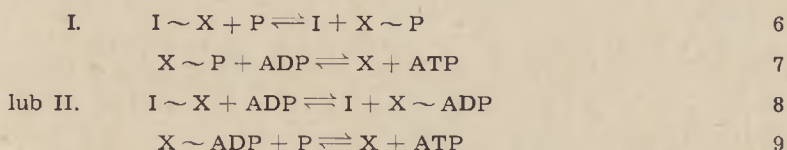


Reakcja 4 jest odpowiedzialna za obie reakcje wymiany: $ATP \rightarrow P$ i $ATP \rightarrow ADP$. Przyjmuje się następnie, że substancje rozprzegające fosforylację (np 2,4-dwunitrofenol) katalizują hydrolityczny i nieodwracalny termodynamicznie rozpad połączenia $I \sim X$:



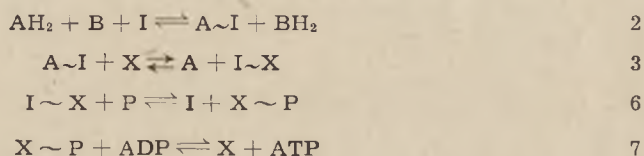
Tak więc reakcja 4 przebiegająca ze strony prawej w lewą i następująca po niej reakcja 5 stanowią o mitochondrialnej ATP-azie.

Reakcja 4 jako reakcja trójcząsteczkowa jest wypadkową dwóch procesów. Możliwe są tu następujące alternatywy:



Według alternatywy I reakcja wymiany ATP—P jest wypadkową dwóch reakcji, (tj. reakcji 6 i 7), natomiast wymiana ATP—ADP jest reakcją 7. Rzecz ma się na odwrót w przypadku alternatywy II, gdyż tutaj wymiana ATP—ADP jest rezultatem dwóch reakcji (tj. reakcji 8 i 9). Szybkość tej wymiany powinna być zależna od stężenia ortofosforanu. Wadkins i Lehninger (61) wykazali, że zależności takiej nie ma i że wymiana ATP—ADP zachodzi z maksymalną szybkością nawet w nieobecności ortofosforanu. A więc bardziej prawdopodobna wydaje się alternatywa I.

Ostatecznie więc proponowany obecnie schemat fosforylacji w najbardziej rozwiniętej formie wygląda następująco: (schemat 3).



Schemat 3. Hipotetyczny mechanizm sprzężenia syntezy ATP z reakcjami oksydoredukcji.

Schemat ten nie stoi w sprzeczności z żadnym z dotychczas znanych i udokumentowanych faktów, choć niektórych z nich nie tłumaczy lub tłumaczy je niedostatecznie. Wydaje się, że schemat ten jest znacznym uproszczeniem i że rzeczywisty ciąg reakcji jest dłuższy i bardziej skomplikowany. Czynione są próby zmodyfikowania tego schematu przez wprowadzenie dodatkowych reakcji (45). Z drugiej strony próbuje się dwie hipotetyczne substancje I i X zastąpić jedną (8, 9, 10) lub nawet pominąć je zupełnie, przyjmując, że same nośniki elektronów mogą tworzyć wysokoenergetyczne połączenia fosforanowe.

Schemat 3 łącznie z reakcją rozpadu połączenia I~X (reakcja 5) wyjaśniają dobrze wpływ czynników rozprzegających na wzrost utleniania w ściśle sprzężonych mitochondriach, jak również stymulowanie latentnej ATP-azy. Hamowanie wymiany ATP—P możnaby wyjaśnić przyjmując, że związek I~X powstający w reakcji 6 jest natychmiast hydrolitycznie rozkładany w myśl reakcji 5, wobec czego reakcja 6 nie może przebiegać z lewej strony w prawo. Sprawa ta nie jest jednak całkowicie jasna. Nie jest również jasny hamujący wpływ 2,4-dwunitrofenolu na reakcję wymiany ATP—ADP w świeżo wyizolowanych mitochondriach lub fragmentach submitochondrialnych. Należało by

przyjąć, że reakcje 6 i 7 są ze sobą w jakiś sposób sprzężone (45). Dopiero zahamowanie reakcji 6 azydkiem sprawia, że wymiana ATP—ADP (reakcja 7) staje się nieczuła na 2,4-dwunitrofenol.

Działanie azydków tłumaczy się hamowaniem reakcji 6. Takie przyjęcie wyjaśnia zarówno hamujący wpływ azydków na mitochondrialną ATP-azę, jak i hamowanie reakcji wymiany ATP-P oraz brak wpływu na reakcję wymiany ATP—ADP.

Wysuwane są przypuszczenia, że substancja X w schemacie 3 może być identyczna z wyizolowanym przez Wadkinsa i Lehningera (61) enzymem katalizującym reakcję wymiany ATP—ADP (45, 46).

V. Badania spektrofotometryczne nad oksydatywną fosforylacją

Na specjalne omówienie zasługują badania nad fosforylacją, prowadzone od szeregu lat przez Chance'a i jego grupę. Zużycie tlenu w tych badaniach oznaczane jest przez pomiar ubytku tlenu rozpuszczonego w środowisku przy pomocy wibrującej elektrody platynowej. Jednocześnie w tym samym środowisku mierzy się spektrofotometrycznie stopień utlenienia lub redukcji enzymów łańcucha oddechowego. Dzięki takiemu urządzeniu możliwe się stało uzyskiwanie w jednym doświadczeniu olbrzymiej ilości niezwykle cennych informacji dotyczących stanu i funkcji enzymów oddechowych i systemu fosforylacyjnego (8). Informacje te przedstawione są w tablicy 2.

Tablica 2

Charakterystyka różnych stanów „ściśle sprzężonych” mitochondriów według Chance'a i Williamsa (8)

Stan	Warunki inkubacji			Szybkość oddychania	Czynnik ograniczający szybkość oddychania	Stopień zredukowania nośników elektronów w procentach				
	O ₂	Poziom ADP	Poziom substratów			DPN	enzym flawinowy	cyt. b	cyt. c	cyt. a
I	+	niski	niski	mała	ADP	90	21	17	7	0
II	+	wysoki	0	mała	substrat	0	0	0	0	0
III	+	wysoki	wysoki	duża	wydolność łańcucha oddech.	£3	20	16	6	4
IV	+	niski	wysoki	mała	ADP	99	40	35	14	0
V	-	wysoki	wysoki	0	O ₂	100	100	100	100	100

Ponieważ w badaniach tych stosowano „ściśle sprzężone” mitochondria wątroby, głównym czynnikiem ograniczającym oddychanie był brak ADP. Warunki takie określamy jako stan I. Jeśli do takiej zawiesiny mitochondriów dodać ADP, następuje szybkie utlenienie endogennych substratów, po czym zużycie tlenu spada niemal do zera

na skutek wyczerpania utleniających substratów. Jest to stan II. W tym stadium obserwuje się prawie całkowite utlenienie wszystkich komponentów łańcucha oddechowego. Dodanie do środowiska substratu oddechowego wyzwało bardzo intensywne utlenianie, któremu towarzyszyła również intensywna fosforylacja (stan III). Ustawiczny „obrót” enzymów łańcucha oddechowego, ich przechodzenie z formy utlenionej w zredukowaną i na odwrót sprawia, że w widmie pojawiają się cechy charakterystyczne dla form zredukowanych. Stopień zredukowania poszczególnych enzymów, a raczej stosunek ilości formy zredukowanej do formy utlenionej jest w tym stadium stały i odzwierciedla stan dynamicznej równowagi (*steady state*), który trwa tak długo, jak długo obecne są w środowisku zarówno substrat, jak i ADP. Stopień zredukowania jest tym większy, im bliżej enzym lub koenzym stoi w stosunku do substratu, a więc jest największy dla DPN, najmniejszy dla cytochromu *a*. Stan III trwa tak długo, dopóki nie wyczerpie się obecny w środowisku ADP (substrat oddechowy jest w nadmiarze). Wówczas oddychanie gwałtownie maleje. Czynnikiem ograniczającym oddychanie jest znów niemożność fosforylacji, czyli brak ADP. Jest to stan IV. Jeśli w tym stadium dodać ADP, to uzyskuje się na powrót stan III z intensywnym oddychaniem. W wypadku dodania dużego nadmiaru ADP można doprowadzić do całkowitego wyczerpania tlenu, co daje stan V, anaerobowy. W stadium tym następuje całkowita redukcja wszystkich komponentów łańcucha oddechowego.

Dla wyjaśnienia mechanizmu oksydatywnej fosforylacji najciekawsze są stany III i IV, a ściślej mówiąc przejście od stanu IV do III. Przejście to jest momentem wyzwolenia oddychania przez dodanie ADP, czyli „odhamowanie” łańcucha oddechowego dzięki umożliwieniu fosforylacji. Chance (8, 10) wyszedł z założenia, że w stanie IV transport elektronów zahamowany jest w tych punktach łańcucha oddechowego, w których zachodzi fosforylacja. Nośniki elektronów znajdujące się w kierunku tlenu od tego punktu nie mogą być zatem zredukowane i przybiorą formę bardziej utlenioną. Na odwrót, nośniki znajdujące się ku substratowi nie mogą być na skutek zahamowania łańcucha utleniane i przybiorą formę bardziej zredukowaną. Dodanie ADP znosi zahamowanie łańcucha oddechowego i powinno sprawić, że nośniki o wyższym potencjale oksydoredukcyjnym znów będą mogły być zredukowane a nośniki o niższym potencjale — utleniane. Rozumując w ten sposób wydawało się możliwe znalezienie miejsc fosforylacji drogą dokładnej rejestracji stopnia utlenienia i redukcji poszczególnych nośników elektronów w stanie IV i ich zmian przy przejściu w stan III po dodaniu ADP. Jak widać z tablicy 2, wszystkie nośniki od DPN do cytochromu *c* przybierają przy przejściu ze stanu IV do stanu III formę bardziej utlenioną a tylko cytochrom *a* ulega pewnej redukcji. Wskazuje to, zgodnie z rozumowaniem Chance'a, na fo-

sforylację pomiędzy cytochromem *c* a cytochromem *a**. Używając innego materiału (np. wątroby świnki morskiej zamiast szczura) lub przyhamowując nieco transport elektronów za pomocą azydku udało się wykazać również obecność pozostałych dwóch miejsc fosforylacji: pomiędzy DPN i flawiną oraz między cytoc₁ i cytochromem *c*. Jak więc widać, badania te oparte na całkowicie odmiennych założeniach i prowadzone na zupełnie innej drodze dały w zasadzie podobne rezultaty co omawiane wcześniej prace innych autorów.

VI. Oksydacyjna fosforylacja a struktura mitochondriów

Mitochondria są jedynymi znanymi organellami komórek zwierzęcych, w których zachodzi proces oksydatywnej fosforylacji. Wcześniejsze badania nad izolowanymi mitochondriami pozwalały przypuszczać, że zachowanie w możliwie nienaruszonej formie struktury mitochondrionu jest niezbędnym warunkiem uzyskania preparatu zdolnego do syntezy ATP kosztem energii utleniania. Pogląd ten wynikał z licznych obserwacji, że uszkodzenie struktury mitochondriów prowadzi do całkowitego lub częściowego rozprzężenia fosforylacji.

Najmniej drastyczną zmianą strukturalną jest tzw. pęcznienie mitochondriów. Mitochondria znajdujące się w komórce mają na ogół kształt krótkich pałeczek długości od jednego do kilku mikronów; świeżo wyizolowane z zachowaniem wszelkich środków ostrożności zachowują przez pewien, krótszy lub dłuższy czas swój pałeczkowaty kształt, stopniowo jednak przybierają postać kulistą, przy czym ogólne wymiary i objętość ich znacznie wzrasta. Proces ten nosi właśnie nazwę pęcznienia. Towarzyszy mu przenikanie do wnętrza mitochondriów wody i jednoczesne „wyciekanie” z mitochondriów do środowiska rozpuszczalnych i dyfundujących składników, przede wszystkim nukleotydów (ATP, ADP, DPN). Pęcznienie zachodzi powoli i samorzutnie w czasie inkubowania mitochondriów w izotonicznych a nawet hipertonicznych roztworach soli (NaCl, KCl). Środowisko hipotoniczne znacznie przyspiesza ten proces. Podobnie działa wiele substancji chemicznych, np. tyroksyna, jony wapnia, florydzyina, kwasy tłuszczowe, czterochlorek węgla, detergenty, glutation, cysteina. Pęcznieniu towarzyszy zazwyczaj spadek zdolności fosforylacyjnych aż do całkowitego rozprzężenia.

* Jak widać z tablicy 1, różnica potencjałów oksydoredukcyjnych między cytochromem *c* a cytochromem *a* jest zbyt mała, by wystarczyła na wytworzenie wiązania fosforanowego ATP. Jednakże rejestrowany przez Chance'a prążek „a” jest wypadkową widma cytochromów *a* i *a*₃. Tak więc rezultat tych badań należy interpretować jako wykazanie fosforylacji na etapie cyt. *c* → cyt. *a* → cyt. *a*₃, co nie jest sprzeczne z danymi termodynamicznymi (potencjał oksydoredukcyjny cytochromu *a*₃ nie jest dokładnie znany).

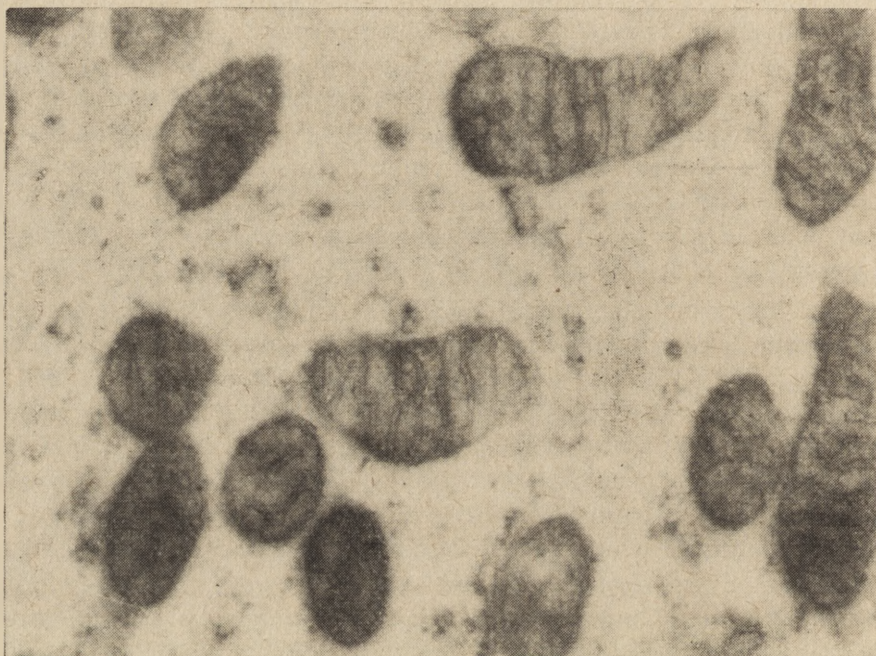
Jak wykazują ostatnie badania (44, 45, 62), pęcznienie jest zjawiskiem bardzo złożonym i prawdopodobnie wypadkową różnych procesów. Pęcznienie mitochondriów może być cofnięte przez dodanie do środowiska ATP. Następuje wówczas t. zw. „skurcz” i powrót napęczniałych mitochondriów do postaci zbliżonej do form wyjściowych (42). Nie jest dotychczas sprawą wyjaśnioną, czy „skurcz” mitochondriów jest procesem podobnym do skurczu włókienek mięśniowych i zależnym od obecności kurczliwego białka, czy też spowodowany jest on raczej „wypompowywaniem” z mitochondriów wody.

Ścisła zależność oksydatywnej fosforylacji od nietkniętej struktury mitochondriów, jak początkowo sądzono, stanowiła poważne ograniczenie w badaniach enzymatycznych mechanizmów fosforylacji. Toteż ważnym i otwierającym nowe perspektywy osiągnięciem było stwierdzenie (16) występowania sprzężonej z oddychaniem fosforylacji we fragmentach uzyskanych przez rozbicie mitochondriów działaniem digitoniny. Przy ścisłym zachowaniu empirycznie ustalonych warunków uzyskano działaniem digitoniny submitochondrialne cząstki zdolne do syntezy ATP oraz katalizujące reakcje wymiany ATP—P i ATP—ADP (19). Cząstki te wykazywały również czynność ATP-azy (18).

W ślad za tymi badaniami ukazały się doniesienia innych autorów, którzy różnymi drogami uzyskiwali zdolne do oksydatywnej fosforylacji fragmenty mitochondriów, a więc przez traktowanie mitochondriów wodnymi roztworami etanolu i fosforanu (28, 29), działanie ultradźwiękami (37), rozcieranie z krzemionką itp. Dla uzyskania cząstek zdolnych do oksydatywnej fosforylacji konieczne jest jednak ściśle przestrzeganie warunków rozbijania mitochondriów, gdyż zbyt drastyczne działanie daje w efekcie fragmenty pozbawione aktywności fosforylacyjnej. Tym prawdopodobnie tłumaczą się wcześniejsze niepowodzenia z uzyskaniem fosforylujących cząstek submitochondrialnych.

Zostało więc wykazane, że mitochondria nie są najmniejszą zdolną do fosforylacji jednostką strukturalną. Wszelkie jednak próby dalszej fragmentacji celem ostatecznego otrzymania rozpuszczalnego systemu enzymatycznego, posiadającego zdolność sprzężonej z utlenianiem syntezy ATP, nie dały dotychczas pożądanego rezultatu, chociaż osiągnięto pewne postępy w tej dziedzinie. Do nich należy niewątpliwie otrzymanie rozpuszczalnego enzymu katalizującego wymianę ATP—ADP (61), o czym była już mowa wyżej. Innym osiągnięciem jest otrzymanie z rozbitych mitochondriów rozpuszczalnej frakcji białkowej, która wprawdzie sama nie katalizuje ani oddychania ani fosforylacji (posiada jedynie aktywność ATP-azy), ale wzmacnia fosforylację (podwyższa stosunek P:O), jeśli dodać ją do fragmentów submitochondrialnych o zmniejszonej zdolności fosforylacyjnej (47, 52).

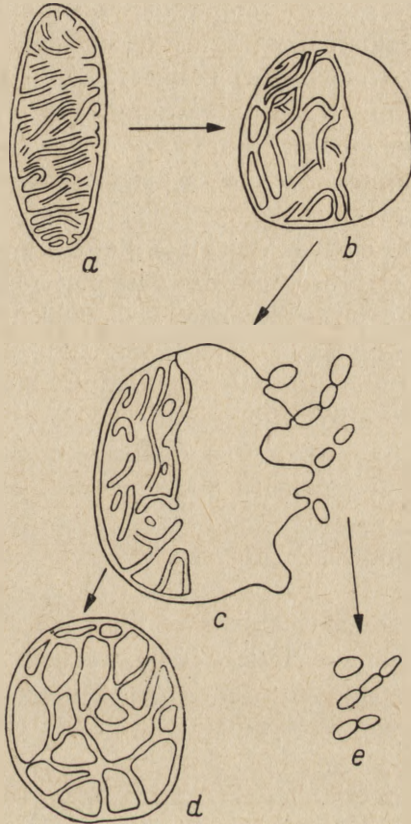
Tak więc przy obecnym stanie badań wydaje się, że istota sprzężenia syntezy ATP z transportem elektronów związana jest z istnieniem zorganizowanych i nierozpuszczalnych w wodzie elementów struktury. Najbardziej wyczerpujące badania nad strukturalnym podłożem procesów oddychania i sprzężonej fosforylacji prowadzi od szeregu lat grupa D. E. Greena z *Institute for Enzyme Research* w Madison. Prowadzone równoległe z badaniami biochemicznymi obserwacje przy pomocy mikroskopu elektronowego pozwoliły ustalić pewne zależności między strukturą fragmentów submitochondrialnych a ich zdolnością do fosforylacji.



Rys. 2. Zdjęcie elektronowo-mikroskopowe mitochondriów nabłonka jelita ludzkiego według Hartmana i współpracowników (30).

Rysunek 2 przedstawia zdjęcie elektronowo-mikroskopowe mitochondriów zaś rys. 3a — schemat struktury mitochondrionu. Jak widać, mitochondrion otoczony jest podwójną błoną a wewnątrz jego poprzeczelane jest poprzecznymi przegrodami (tzw. *cristae*). Błona mitochondrialna i przegrody zbudowane są z lipoproteidów. Substancje te redukują kwas osmowy i nadmanganian, którą to właściwość wykorzystuje się celem uwidocznienia struktur mitochondrialnych w mikroskopie elektronowym. Przestrzenie między przegrodami wypełnione są przez tzw. *matrix*, składającą się z białek rozpuszczalnych i substancji drobno-cząsteczkowych. Pęcznienie mitochondrionu polega na przenikaniu wody do wnętrza jego struktury oraz pomiędzy warstwy podwójnej błony.

ny (rys. 3b). Przegrody również mogą podlegać pęcznieniu i wakuolizacji lub zostają zepchnięte w jeden koniec mitochondrionu (rys. 3b i 3c). Dalsze pęcznienie doprowadza do pęknięcia błony mitochondrialnej i powstania większych i mniejszych fragmentów. W przypadku da-



Rys. 3. Schemat tworzenia się fragmentów submitochondrialnych według Zieglera i współpracowników (63); a — normalny mitochondrion, b — mitochondrion napęczniały; c — powstawanie fragmentów submitochondrialnych d — fragment zdolny do fosforylacji (PETP), e — fragmenty niefosforylujące (ETP).

leko posuniętej fragmentacji powstają drobne, o pojedynczej błonie pęcherzyki (rys. 3e). Pęcherzyki te tworzą się prawdopodobnie dzięki temu, że fragmenty błony mitochondrialnej i przegród, złożone z lipoproteidów a więc zawierające grupy apolarne, hydrofobne, wykazują w środowisku wodnym tendencję do tworzenia zamkniętych struktur. Pęcherzyki te zawierają cały komplet enzymów oddechowych (prócz niektórych dehydrogenaz) i mają zdolność utleniania DPNH oraz bursztynianu; nie posiadają jednak zdolności syntezy ATP. Fragmenty te zostały w związku z tym nazwane przez zespół Greena *electron transport particles*, w skrócie ETP. Przy bardziej ostrożnej i łagod-

niejszej fragmentacji część przegród nie ulega zniszczeniu, lecz po pęknięciu błony mitochondrialnej tworzy cząstkę znacznie mniejszą od mitochondrionu, lecz w zasadzie o podobnym schemacie budowy (rys. 3d). Cząstki te zachowują zdolność fosforylacji i zostały nazwane *phosphorylating electron transport particles*, w skrócie PETP (25, 26, 28, 29). Na podstawie tych i innych obserwacji wysuwa się obecnie przypuszczenie, że niezbędnym warunkiem sprzężenia oddychania z syntezą ATP jest zachowanie struktur o podwójnej błonie (PETP). Pęcherzykowate tworzy o pojedynczej błonie (ETP) pozbawione są zdolności do fosforylacji. Bardziej obszerny opis struktury mitochondriów i submitochondrialnych fragmentów został zamieszczony w jednym z wcześniejszych zeszytów *Postępów Biochemii* (64).

Badania grupy Greena rzucają światło nie tylko na rolę struktur morfologicznych w procesach oksydacyjnej fosforylacji ale również na znaczenie dla tych procesów pewnych struktur chemicznych, mianowicie sympleksów białkowo-lipidowych (27). Jak już wspomniano wyżej, lipoproteidy stanowią główny składnik błon mitochondrialnych i wewnątrzmitochondrialnych przegród. Wydaje się więc prawdopodobne, że te właśnie lipoproteidy są siedliskiem zarówno układów przenoszących elektrony w łańcuchu oddechowym jak i biorących udział w sprzężonej z tym procesem fosforylacji. Obecny stan badań pozwala na razie tylko spekulować nad możliwą rolą lipoproteidów w tych reakcjach. Wysuwane są przypuszczenia, że synteza ATP, przebiegająca z wydzieleniem cząsteczki wody, musi na pewnych etapach zachodzić w środowisku niewodnym, gdzie warunki termodynamiczne są dla takiej reakcji znacznie korzystniejsze. Tłuszczowy komponent lipoproteidów mitochondrialnych mógłby właśnie stwarzać takie środowisko.

VII. Kofaktory fosforylacji — rola witaminów i hormonów

Niewiele dotychczas wiadomo o substancjach niskocząsteczkowych, które odgrywałyby rolę pośredników lub kofaktorów w procesach oksydatywnej fosforylacji. Funkcje takie przypisują niektórzy autorzy pewnym witaminom, hormonom i innym związkom.

Najwcześniej zwrócono uwagę na możliwą rolę witaminu K. Prace Martiusa i współpracowników (48) wskazywały na obniżoną zdolność do fosforylacji mitochondriów z narządów zwierząt cierpiących na awitaminozę K. Dodatek witaminu K zarówno *in vivo* jak i *in vitro* (do izolowanych mitochondriów) przywracał pełną fosforylację. Nowsze badania Beyera (3) wykazały zanik fosforylacji w mitochondriach naświetlanych bliskim ultrafioletem lampy rtęciowej. Naświetlanie takie niszczy między innymi zawarty w mitochondriach witamin K. Do-

danie witaminu K do naświetlanych mitochondriów przywracało w sposób specyficzny zdolność fosforylacyjną. Z drugiej strony istnieje jednak szereg badań poddających w wątpliwość rolę witaminu K w oksydatywnej fosforylacji w tkankach zwierzęcych.

Drugą substancją, której przypisuje się udział w procesach fosforylacyjnych jest koenzym Q. Jest to chinon o długim łańcuchu bocznym złożonym z jednostek izoprenowych, znajdujący zawsze w mitochondriach. Rola koenzymu Q w transporcie elektronów wydaje się obecnie, głównie dzięki licznym pracom grupy Greena, niewątpliwa. Natomiast udział koenzymu Q w syntezie ATP jest na razie tylko hipotezą.

Zarówno witamin K jak i koenzym Q posiadają strukturę chinonową. Z rozważań teoretycznych jak i z doświadczeń na związkach modelowych wynika, że chinony w trakcie odwracalnej oksydoredukcji mogą tworzyć wysokoenergetyczne połączenia z kwasem fosforowym. Wysuwane są przypuszczenia, że połączenia takie powstają z koenzymem Q, witaminem K i, być może, innymi chinonami o znaczeniu biologicznym (11, 13). Zagadnienie to jak również rola koenzymu Q w łańcuchu oddechowym są obszernie omówione w specjalnych artykułach w *Postęпах Biochemii* (12, 58), dlatego też tutaj nie będziemy tych zagadnień szerzej poruszać.

Badania Slatera (56) oraz innych autorów wskazywały na możliwą rolę witaminu E (α - tokoferolu) w oksydatywnej fosforylacji. Stwierdzono, że łagodna ekstrakcja mitochondriów rozpuszczalnikami organicznymi (np. izooktanem) znosi ich zdolność fosforylacyjną. Zdolność tę przywraca w niektórych przypadkach dodanie tokoferolu. Później jednak wykazano, że nie jest to specyficzna własność witaminu E i że niektóre inne substancje o charakterze lipidowym mogą działać podobnie. Z drugiej strony jednak wiadomo, że tokoferol opóźnia rozpręganie fosforylacji w czasie „starzenia” mitochondriów, to jest preinkubowania ich bez substratu i ATP, zaś mitochondria z narządów zwierząt z awitaminozą E wykazują większą labilność fosforylacji niż w przypadku zwierząt normalnych. Wydaje się jednak, że może to być związane raczej z antyoksydacyjnym działaniem tokoferolu niż z jego udziałem jako kofaktora fosforylacji. Wiadomo mianowicie, że tokoferol ma wybitnie zaakcentowaną zdolność niszczenia nadtlenu. Wiadomo również, że nadtlenuki, w szczególności nadtlenuki kwasów tłuszczowych działają niezwykle szkodliwie na układy enzymatyczne mitochondriów (59). Tak więc rola witaminu E sprowadza się prawdopodobnie raczej do działania ochronnego.

Tyroksyna znana jest od dawna jako substancja rozprzegająca oddech i fosforylację (44). Rzeczą zastanawiającą jest jednak to, że działa ona w ten sposób jedynie na całe mitochondria, natomiast jest bez wpływu na fosforylację we fragmentach submitochondrialnych. Wiąże się to prawdopodobnie z tym, że tyroksyna niezwykle silnie

wzmaga pęcznienie całych mitochondriów. W ostatnich czasach stwierdzono, że pewne niskie stężenia tyroksyny nie tylko nie działają rozprzegająco, lecz przeciwnie, wzmagają fosforylację (podwyższają stosunek P:O) (5, 21). Tak więc nie jest wykluczona rola tego hormonu w procesie fosforylacji.

Niezwykle silnie rozprzegającymi substancjami są wolne (niezestryfikowane) długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (51). W różnych narządach i u różnych organizmów znajdowano wielokrotnie naturalne substancje rozprzegające fosforylację. Wydaje się obecnie, że są to przeważnie wolne kwasy tłuszczowe. Jest zastanawiające, że kwasy nienasycone działają o wiele silniej rozprzegająco niż nasycone. Z drugiej strony wiadomo, że lipidy mitochondrialne zawierają przewagę nienasyconych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Można więc przypuszczać, że kwasy tłuszczowe w jakiś wybiórczy, być może kompetywny sposób blokują centra aktywne fosforylacji. W czasie pęcznienia mitochondriów, zarówno spontanicznego, jak i wywołanego przez niektóre substancje, następuje gromadzenie się w nich wolnych kwasów tłuszczowych. „Skurcz” mitochondriów pod wpływem ATP związany jest z resyntezą fosfolipidów (62). Można przypuszczać, że pewne fosfolipidy mitochondrialne mogą stanowić jedno z ogniw łączących procesy oddechowe z fosforylacją.

Zagadnienie oksydatywnej fosforylacji wysuwa się obecnie na jedno z czołowych miejsc w problematyce biochemicznej. Nad zagadnieniem tym prowadzą intensywne badania liczne laboratoria na całym świecie. W chwili obecnej rozporządzamy w tej dziedzinie wielkim arsenałem faktów, lecz nie zawsze umiemy fakty te ze sobą powiązać. Zachodzi jeszcze stale potrzeba wprowadzania hipotetycznych reakcji i intermediatów. Wydaje się jednak, że niezbyt odległy jest dzień, gdy dzięki nowym odkryciom obecne luki zostaną wypełnione i będziemy w stanie w sposób jasny i zrozumiały powiązać ze sobą reakcje syntezy ATP z reakcjami utleniania komórkowego. Jedna rzecz wydaje się pewna. W mechanizmie sprzężenia syntezy ATP z procesami oddechowymi niewątpliwą rolę odgrywa struktura submikroskopowa, a być może — makromolekularna. Ugruntowuje się coraz bardziej przeświadczenie, że do rozwiązania zagadnienia oksydatywnej fosforylacji doprowadzić może tylko ścisłe powiązanie badań biochemicznych z badaniami nad ultrastrukturą mitochondriów.

LITERATURA

1. Belitzer V. A., *Enzymologia* 6, 1 (1939).
2. Bielicer W. A., Cibakowa E. T., *Biochimija* 4, 516 (1939).
3. Beyer R. E., *J. Biol. Chem.* 234, 688 (1959).

4. Boyer P. D., Luchsinger W. W., Falcone A. B., *J. Biol. Chem.* **223**, 405 (1956).
5. Bronk J. R., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 327 (1960).
- 6.* Chance B., Proc. International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto 1957, str. 295.
7. Chance B., Williams G. R., *Nature* **175**, 1120 (1955).
- 8.* Chance B., Williams G. R., *Nature* **176**, 250 (1955).
- 9.* Chance B., Williams G. R., *Adv. Enzymol.* **17**, 65 (1956).
10. Chance B., Williams G. R., Holmes W. F., Higgins J., *J. Biol. Chem.* **217**, 439 (1955).
11. Chmielewska I., *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 170 (1960).
- 12.* Chmielewska I., *Post. Biochem.* **6**, 127 (1960).
13. Clark V. M., Hutchinson D. W., Todd A., *Nature* **187**, 59 (1960).
14. Colowick S. P., Kalckar H. M., Cori C. F., *J. Biol. Chem.* **137**, 1941 (1941).
15. Colowick S. P., Welch M., Cori C. F., *J. Biol. Chem.* **133**, 359 i 641 (1940).
16. Cooper C., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **219**, 489 (1956).
17. Cooper C., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **219**, 519 (1956).
18. Cooper C., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **224**, 547 (1957).
19. Cooper C., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **224**, 561 (1957).
20. Copenhaver J. H., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **195**, 225 (1952).
21. Dallam R. D., Howard R. B., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 188 (1960).
22. Devlin T. M., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **219**, 507 (1956).
- 23.* Ernster L., Lindberg O., *Ann. Rev. Physiol.* **20**, 13 (1958).
24. Friedkin M., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **178**, 611 (1949).
- 25.* Green D. E., *Adv. Enzymol.* **21**, 73 (1959).
- 26.* Green D. E., Crane F. L., Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto 1957, str. 275.
- 27.* Green D. E., Lester R. L., *Fed. Proc.* **18**, 987 (1959).
28. Green D. E., Lester R. L., Ziegler D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 516 (1957).
29. Hatefi Y., Lester R. L., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 83 (1958).
30. Hartman R. E., Smith R. B. W., Hartman R. S., Butterworth C. E. Jr., Molesworth J. M., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 171 (1959).
31. Hülsmann W. C., Slater E. C., *Nature* **180**, 372 (1957).
32. Judah J. D., *Biochem. J.* **49**, 271 (1951).
33. Kalckar H., *Enzymologia* **2**, 47 (1937).
34. Kalckar H., *Biochem. J.* **33**, 631 (1939).
35. Kaufman S., Gilvarg C., Cori O., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **203**, 869 (1953).
36. Kennedy E. P., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **172**, 847 (1948).
37. Kielley W. W., Bronk J. R., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 448 (1957).
38. Kielley W. W., Kielley R. K., *J. Biol. Chem.* **191**, 485 (1951).
39. Lardy H. A., Wellman H., *J. Biol. Chem.* **201**, 357 (1953).
40. Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **190**, 345 (1951).
- 41.* Lehninger A. L., Harvey Lectures, New York, 1953—1954, tom 49, str. 176.
42. Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 2465 (1959).
- 43.* Lehninger A. L., *Rev. Modern Physics* **31**, 136 (1959).
- 44.* Lehninger A. L., *Ann N. Y. Acad. Sci.* **86**, 484 (1960).
- 45.* Lehninger A. L., *Fed. Proc.* **19**, 952 (1960).

- 46.* Lehninger A. L., Wadkins C. L., Cooper C., Devlin T. M., Gamble J. L. Jr., *Science* **128**, 450 (1958).
47. Linnane A. W., Titchener E. B., *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 469 (1960).
48. Martius C., Nitz-Litzow D., *Biochim. Biophys. Acta* **13**, 289 (1954).
49. Nielsen S. O., Lehninger A. L., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 3860 (1954).
50. Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **138**, 751 (1941).
51. Pressman B. C., Lardy H. A., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 482 (1955) i **21**, 458 (1956).
52. Pullman M. E., Panefsky H., Racker E., *Arch. Biochem. Biophys.* **76**, 227 (1958).
53. Sacktor B., Cochran D. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **74**, 266 (1958).
54. Slater E. C., *Biochem. J.* **53**, 157 (1953).
- 55.* Slater E. C., Proceedings of the 3rd International Congress of Biochemistry, Brussels 1955, str. 264.
- 56.* Slater E. C., Proceedings of the 4th International Congress of Biochemistry, Vienna 1958; tom 11, str. 316.
- 57.* Slater E. C., Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto 1957, str. 288.
- 58.* Szarkowska L., *Post. Biochem.* **6**, 323 (1960).
59. Tappel A. L., Zalkin H., *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 326 (1959).
60. Wadkins C. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 221 (1961).
61. Wadkins C. L., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **233**, 1589 (1958).
62. Wojtczak L., Lehninger A. L., *Biochim. Biophys. Acta* w druku (1961).
63. Ziegler D. M., Linnane A. W., Green D. E., Dass C. M. S., Ris H., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 524 (1958).
- 64.* Żydowo M., *Post. Biochem.* **7**, 341 (1961).

Gwiazdkami * oznaczono prace i artykuły przeglądowe.

EMIL NALBORCZYK*

Zastosowanie trytu w badaniach biochemicznych i biologicznych

Application of Tritium in Biochemical and Biological Investigations

The measurement of radioactivity of tritium labelled compounds, their preparation by exchange reactions, chemical synthesis and biosynthesis are reviewed.

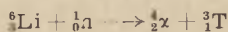
W ciągu ostatnich kilku lat nastąpił wyraźny postęp w badaniach z zastosowaniem trytu w biochemii, jak również w dziedzinach fizjologii zajmujących się zagadnieniami przemiany materii w poszczególnych organach, lokalizacji szeregu związków organicznych oraz szybkości i prawidłowości ich przemieszczania. Postęp ten jest wynikiem zarówno ulepszonych metod pomiaru, które do niedawna stanowiły główną przeszkodę w szerszym zastosowaniu trytu, jak i opracowania wielu pomysłowych sposobów syntezy związków organicznych znakowanych tym izotopem. Przy pracy z zastosowaniem trytu, ze względu na jego słabe promieniowanie wymagane jest posiadanie specjalnej aparatury pomiarowej. Ponadto należy uwzględnić — w stopniu znaczniejszym niż w przypadku innych izotopów promieniotwórczych — efekt izotopowy, spowodowany dużą różnicą masy trytu w porównaniu z wodorem. Z tego względu wyniki badań z zastosowaniem trytu w odróżnieniu od stosowanych dotychczas znacznie szerzej w biochemii i fizjologii takich izotopów promieniotwórczych jak ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{45}Ca wymagają szczególnie ostrożnej interpretacji.

I. Własności i dozymetria związków znakowanych trytem

Promieniotwórczy izotop wodoru — tryt (^3H , T) posiada okres połowicznego zaniku $12,26 \pm 0,04$ lat. Maksymalna energia promieniowania cząstek β wynosi $0,018$ MeV, średnia $0,0057$ MeV. Zasięg ich w powietrzu nie przekracza 2 mm, w wodzie 8μ , w tkankach żywych 6μ i emulsji fotograficznej 2μ . Prosta metoda otrzymywania trytu w skali

* Mgr, st. asystent Katedry Fizjologii Roślin SGGW w Warszawie.

preparatywnej polega na bombardowaniu termicznymi (spowolnionymi) neutronami jąder atomów litu. Neutron, który w trakcie bombardowania zostanie wchłonięty przez jądro litu, powoduje jego wzbudzenie i rozszczepienie na dwa fragmenty — cząsteczkę α i jądro trytu:



W powyższy sposób otrzymuje się z dużą wydajnością (dzięki dużemu przekrojowi czynnemu reakcji) ilości trytu rzędu curie. Tym samym tryt jest znacznie tańszy w porównaniu z ${}^{14}\text{C}$. Praktycznie można uzyskać aktywność właściwą do 60 curie na milimol. Pozwala to na otrzymanie drogą znakowania trytem produktów o wysokich aktywnościach właściwych.

Jeżeli znakowanym produktem są związki organiczne, ulegają one w trakcie ich przechowywania (jak to ma miejsce w wypadku znakowania innymi izotopami promieniotwórczymi) stopniowemu rozkładowi pod wpływem β promieniowania trytu. Rozkład ten przebiega jednak 8—10 razy wolniej niż w związkach znakowanych ${}^{14}\text{C}$ o analogicznej aktywności właściwej (75).

Duża różnica w masie pomiędzy H i T powoduje znaczne osłabienie wiązań X—T stosunku do X—H, co stanowi podstawę dużych między- oraz wewnątrzcząsteczkowych efektów izotopowych. I tak wewnątrzcząsteczkowy efekt izotopowy $k_{\text{H}}:k_{\text{T}}$ waha się w granicach 5—20; kinetyczny lub międzycząsteczkowy pomiędzy 1,5—2 (11, 50). Efekty izotopowe deuteru i trytu pozostają w stosunku do siebie jak: $(k_{\text{H}}:k_{\text{T}}) = (k_{\text{H}}:k_{\text{D}})^{1,442}$ (33, 73). Badanie efektów izotopowych związków znakowanych trytem nastąpiło po opracowaniu odpowiednich metod pomiaru jego aktywności odznaczających się wyjątkową dokładnością (63, 74).

Problem pomiaru trytu ze względu na słabe promieniowanie unie możliwiająca oznaczenie aktywności najczęściej stosowanymi licznikami okienkowymi ograniczał przez dłuższy czas możliwość jego szerszego zastosowania. Ostatnio opracowano szereg metod pomiaru trytu i związków nim znakowanych wewnątrz detektorów promieniowania. Badane próby wprowadzane są do licznika zależnie od jego typu oraz konsystencji związku w postaci gazu, cieczy lub ciała stałego. Zagadnienie to zostało opisane przez wielu autorów (83, 71, 67, 35).

Jednym z najprostszych i często stosowanych jest pomiar aktywności trytu w liczniku przepływowym bez okienka. Polega on na umiejscowieniu preparatu w postaci stałej bezpośrednio pod anodą licznika (20, 66). Szczególną dokładnością pomiarów tego typu odznaczają się prace Isbella i współpracowników (42), którzy przy zastosowaniu nieskończenie grubej warstwy ($0,7 \text{ mg/cm}^2$) uzyskali wydajność 4%. Według spostrzeżeń innych autorów wydajność dla prób o grubości $0,8 \text{ mg/cm}^2$ wynosi tylko 2%. Po przekroczeniu pewnej granicy grubości warstwy zawierającej tryt, wyniki pomiarów są bardzo rozbieżne.

Można je częściowo ustabilizować poprzez dodanie do próby grafitu co zwiększa jej przewodnictwo elektryczne. Przy pracy z warstwą o grubości powyżej $0,5 \text{ mg/cm}^2$ obserwowano zmniejszanie się aktywności z czasem w ciągu pierwszych 60 min. Verly i współpracownicy (84) tłumaczą to zjawisko powstawaniem na powierzchni badanej próby bariery potencjału o dodatnim ładunku elektrycznym, która nie przepuszcza słabego promieniowania β . Stopień zahamowania w danym wypadku zależy od oporu elektrycznego próby i jej aktywności. Przy pomiarach prób o warstwie kilku $\mu\text{g/cm}^2$ występuje również duży rozrzut wyników na skutek stopniowego powstawania w roztworze podczas jego suszenia na miseczkach — mikrokryształów badanej substancji, które absorbują promieniowanie trytu. Ponieważ kryształy te są charakterystyczne dla każdego związku, metoda nie pozwala na porównywanie aktywności prób zawierających różne związki. W celu uniknięcia powstałych różnic Muramatsu i Sasaki (54) poddają związki znakowane trytem spalaniu, a powstałą wodę wiążą w reakcji z bromkiem oktadecylomagnezowym. Promieniotwórczość wytworzonego $1\text{-}^3\text{H}$ -oktadekanu, zawierającego tryt badanych związków, mierzona jest przy dobrej powtarzalności wyników na miseczkach ze stali nierdzewnej w liczniku przepływowym. Przy równomiernym naniesieniu $1\text{-}^3\text{H}$ -oktadekanu na miseczkę absorpcja własna promieni β występuje dopiero w warstwie grubości powyżej $100 \mu\text{g/cm}^2$.

Znacznie większą dokładnością odznaczają się pomiary aktywności trytu przeprowadzone w fazie gazowej. Przed pomiarem związek organiczny spalany jest w tlenie do wody trytowanej, która następnie po ogrzaniu w próżni z cynkiem (93) lub magnezem (88), daje wodór trytowany. Wilzbach, Kaplan i Brown (92) zastosowali równoczesne spalanie próby organicznej i redukcję do trytowanego wodoru i metanu. Redukcję przeprowadzano w probówce ze szkła Pyrex o średnicy 1,1 cm i długości 17 cm. Każdorazowo do probówki wprowadzano 1 g cynku, 100 mg tlenku niklu, 5—6 mg wody oraz 5—10 mg związku zawierającego tryt. Wodę i substancje płynne umieszczano w małych cienkościennych ampulkach ze zwykłego szkła. Z probówki odpompuywano powietrze do 1 mm Hg, koniec jej zatapiano i po stłuczeniu ampulek oraz dokładnym wymieszaniu zawartości (przez wstrząsanie) ogrzano probówkę w pozycji poziomej w temp. $640 \pm 10^\circ$ przez 3 godz. Powstałą mieszaninę trytowanego metanu i wodoru zbierano po rozbiciu probówki w układzie próżniowym, połączonym z licznikiem.

Znacznie dogodniejszym okazało się otrzymywanie metanu trytowanego przez nagrzewanie trytowanej wody z jodkiem metylomagnezowym (31) albo węglikiem glinu (82, 36), trytowanego *n*-butanu w wyniku reakcji z bromkiem *n*-butylomagnezowym (62) lub trytowanego acetyleny — w reakcji z węglikiem wapnia (4). Związki te w celach pomiaru ich aktywności wprowadza się do komory jonizacyjnej (93)

do liczników proporcjonalnych (88, 62) lub do liczników pracujących w zakresie Geigera (31, 40). Wymienione trytowane węglowodory w mniejszym stopniu niż trytowany wodór zanieczyszczają aparaturę do spalań i wewnątrz licznika.

Bogdanow, Szalnow i Sztukkenberg (7) opracowali szybką metodę oznaczania trytu związków organicznych po ich spalaniu do wody. Badany związek lub całą tkankę umieszczano w retorcie ze stali nierdzewnej zakończonej kapilarą. Retortę wstawiano do rury kwarcowej przez którą przepuszczano strumień osuszonego tlenu. Po ogrzaniu całości do temperatury 800—900° gazowe produkty rozkładu wychodziły z retorty przez kapilarę i przy zetknięciu z tlenem wodór spalanej próby był utleniany do wody, którą wymrażano ciekłym azotem. Czas całkowitego spalania 2—3 g próby nie przekraczał 3—5 min. Aktywność trytu otrzymanej wody mierzono w postaci pary w komorze jonizacyjnej.

W zasadzie wszystkie metody pomiaru trytu w fazie gazowej dostosowane zostały do oznaczeń seryjnych, jednak ze względu na długi czas wykonania jednego oznaczenia i dość dużą ilość substancji potrzebnej do analizy ustępują one miejsca pomiarom w fazie ciekłej przy użyciu liczników scyntylicyjnych.

Obszerne dane o budowie, pracy i zastosowaniu tego typu liczników podane są w monografii Bella i Hayesa (5). Badaną próbę rozpuszcza się w roztworze scyntylicyjnym i umieszcza na okienku fotopowielacza. Jako roztwory scyntylicyjne stosuje się najczęściej roztwory 2,5-dwufenylookszolu albo 1,4[2-(5-fenylookszolilo)]-benzenu w toluenie lub ksylenie. Roztwory te emitują fotony w zakresie zbliżonym do maksymalnej czułości fotopowielacza. Promieniowanie trytu jest źródłem słabych scyntytacji, dlatego też wymagane jest zwiększenie napięcia pracy w fotopowielaczu. Prowadzi to z kolei do zwiększenia biegu własnego (tła), którego obniżenie osiąga się przez wprowadzenie układu koincydencji oraz ochłodzenie roztworu i fotopowielacza do -10°. Ostatnio do pomiaru trytu wyprodukowano układy liczące, które nie wymagają koincydencji i chłodzenia (*Nuclear Enterprises Ltd.*).

Wydażność liczenia przy użyciu liczników scyntylicyjnych dochodzi do 30%. Zależy ona jednak od rodzaju mierzonej próby, gdyż szereg związków posiada zdolność gaszenia scyntytacji wywołanej promieniowaniem trytu. Szczególnie duży efekt gaszący wykazuje tlen zawarty w roztworze scyntylicyjnym (28). Zmniejszenie tego efektu można uzyskać poprzez dodanie do próby naftalenu. Przy badaniu związków nierozpuszczalnych w toluenie lub ksylenie stosuje się szereg metod w celu wprowadzenia ich do roztworu scyntylicyjnego. Vaughan, Steinberg i Logan (77) rozpuszczali aminokwasy i białka znakowane trytem w 1 M roztworze metanolowym hydroksyhaminy. W naczyniu służącym do pomiaru aktywności, w 1 ml roztworu rozpuszcza-

no w temperaturze 55—60° przez 1—2 godz. 20 mg aminokwasów lub 10 mg białek. Następnie dodawano 10 ml roztworu dwufenylooksaolu w toluenie i po ochłodzeniu do -10° mierzono aktywność. Zarówno białka jak i aminokwasy w postaci soli (bezpośrednio po ich rozdziale chromatograficznym na kolumnie) rozpuszczały się dobrze w podanych wyżej warunkach. Jedynie aminokwasy zawierające siarkę i arginina nie rozpuszczały się w ilościach powyżej 5 mg w 1 ml metanolowego roztworu hydroksyhiaminy.

Przy wprowadzeniu do roztworu scyntylacyjnego nierozpuszczalnych w nim związków trytowych można stosować takie rozpuszczalniki pośrednie jak etanol lub dioksan. Można też wprowadzać związki nierozpuszczalne w postaci zawiesiny (26, 68). Steel opracował prostą metodę oznaczania aktywności trytu zawartego w materiale biologicznym przy użyciu licznika z płynnym scyntylatorem. Próbę do 100 mg umieszczano z tlenkiem miedziowym na dnie długiej probówki. Probówkę zatapiano i koniec z materiałem ogrzewano do wysokiej temperatury — podczas gdy przeciwległą część oziębiano do -65°. Wymrożoną wodę zawierającą tryt po rozbiciu ampułki rozpuszczano w absolutnym etanolu i wprowadzano do roztworu scyntylacyjnego. Wydajność pomiaru wynosiła 10%. Stosując podobną metodę Jacobson i współpracownicy (44) uzyskali wydajność liczenia 12—14%.

Oprócz scyntylatorów płynnych do pomiaru trytu stosuje się również scyntylatory z plastyku. Funt i Hetherington (27) zastosowali do pomiaru aktywności związków zawierających ^3H , ^{14}C , ^{32}P i ^{22}Na kapilarę wykonaną z masy plastycznej scyntylującej pod wpływem cząstek β . Roztwory wodne badanych prób wprowadza się do kapilary i używając fotopowielacza Dumont 6292 mierzy się aktywność typowym przelicznikiem elektronowym. Metoda posiada duże zalety ze względu na możliwość badania roztworów wodnych zawierających trytowe związki. Ponieważ mierzone są scyntylacje ścianek kapilary, również barwa roztworu nie jest czynnikiem ograniczającym dokonanie pomiaru. Pomiaru w przeciwieństwie do uzyskiwanych na scyntylatorach płynnych odznaczają się dużą stabilnością i powtarzalnością wyników.

Opracowano również szereg metod wykrywania lokalizacji związków zawierających tryt po ich chromatograficznym rozdziale na bibule. Wilson (89) oraz Parups i współpracownicy (59) w celu szybkiego i wyraźnego uzyskania radiochromatogramów zastosowali opryskiwanie rozwiniętych chromatogramów roztworem scyntylatora. Pozwoliło to na wykrycie po 2 tygodniach ekspozycji aktywności $0,4 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. Po zastosowaniu specjalnych czułych filmów bez warstwy ochronnej Narath i Gundlach (56) wykryli po 10 dniach próbę o aktywności $10^{-5} \mu\text{C}/\text{cm}^2$.

Dla bezpośredniego pomiaru aktywności trytu na bibule chromatograficznej spryskiwano ją roztworem antracenu ($0,3 \text{ mg/cm}^2$) i mierzono aktywność licznikiem scyntylicyjnym z wydajnością $0,8\text{—}1,5\%$ (69). Przeprowadzono również próby z zastosowaniem licznika przepływowego do pomiaru aktywności związków zawierających tryt po ich rozdziale chromatograficznym na bibule (46). Osiński (57) zbudował specjalny licznik do pomiaru ciągłego aktywności wzdłuż paska bibuły. Pasek ten przesuwany jest przy pomocy silnika synchronicznego pomiędzy dwoma bezkierunkowymi licznikami GM których nici anody umieszczone są równolegle do bibuły. Przez oba liczniki przepuszczana jest mieszanina gasząca (argon nasycony parami alkoholu propylowego). Impulsy z licznika przekazywane są na czuły aparat do pomiaru szybkości przesuwania paska z którą są synchronizowane i zapisywanie w postaci wykresu. Licznik pozwala wg autora na wykrycie aktywności $3 \text{ m}\mu \text{ C/cm}^2$ na bibule *Whatman* nr 1.

Dzięki słabemu promieniowaniu trytu, można bardzo dokładnie przy zastosowaniu autoradiografii lokalizować położenie w komórce związków nim znakowanych. Przy pomocy tymidyny znakowanej trytem badano metodą autoradiografii syntezę kwasu dezoksyrybonukleinowego w strukturach żywych komórek (85, 86), oraz podział chromosomów (74).

II. Otrzymywanie związków znakowanych trytem

1. Reakcje wymiany z trytem

Cząsteczkę związku organicznego można znakować trytem korzystając z reakcji wymiany wodoru — tryt. Wymianę tego typu przeprowadza się poprzez nagrzewanie związku nieaktywnego w wodzie trytowanej lub trytowanym kwasie octowym w obecności platyny albo palladu jako katalizatorów. Metoda ta posiada jednak tę wadę, że wymiana tryt — wodoru jest w pewnych warunkach doświadczalnych reakcją odwracalną. W trakcie reakcji może nastąpić równomierna wymiana wszystkich atomów wodoru cząsteczki (wymiana homolityczna) lub też wymiana w ściśle określonych pozycjach (wymiana heterolityczna). Szczególnie podatne na wymianę są atomy wodoru związane z tlenem, azotem lub siarką. Również sąsiedztwo grup —CO , —CN , $\text{—SO}_3\text{H}$ (lub innych elektroujemnych) zazwyczaj osłabia wiązanie wodoru z węglem i ułatwia wymianę. Szczególnie łatwo ulegają wymianie atomy wodoru związków karbonilowych zmieniające położenie w wyniku enolizacji. Tak np. kwas pirogronowy wymienia szybko atom wodoru grupy —CH_3 , wskutek enolizacji w środowisku zasadowym, jednakże wymiana ta nie zachodzi w warunkach pH żywej komórki.

W wyniku wymiany katalitycznej otrzymano znakowane trytem węglowodany (13), aminokwasy (35), steroidy (48), puryny i pirymidyny (21), nukleozydy (19), tłuszcze (47) oraz szereg innych związków.

Pomysłową metodę znakowania trytem związków organicznych drogą wymiany zastosowali Rowland i in. (96, 65). Polega ona na umieszczaniu w strumieniu neutronów termicznych mieszaniny próby podlegającej trytowaniu z solą litu, lub też na bombardowaniu związku organicznego jonami trytu przyspieszonymi różnicą potencjału 500 V (95). Powstałe w wyniku naświetlania trytony (jądra trytu) bombardują związek organiczny i wymieniają się z protonami. Metoda ta nie znalazła szerszego zastosowania, gdyż bombardowanie częściowo niszczy naświetlane związki, co powoduje konieczność starannego oczyszczenia otrzymanych produktów.

Wilzbach opisał uniwersalną metodę znakowania wszystkich związków organicznych zawierających wodór (90). Związki te zależnie od ich konsystencji umieszcza się w postaci gazu, cienkiej warstwy ciekłej lub stałej w 100 %owym T₂. Energia promieniowania trytu jest w tym przypadku wykorzystywana do stopniowej wymiany atomów wodoru cząsteczek przez tryt (51). W czasie reakcji powstaje jednak szereg produktów ubocznych, dokładne usunięcie których przedstawia duże trudności. Trytowanie metodą Wilzbacha wymaga stosowania trytu o wysokiej aktywności (rzędu curie) i długiego czasu ekspozycji. Lemon i współpracownicy (49) stwierdzili, że czynniki jonizujące (promienie γ , wyładowania elektryczne) zwiększają wymianę wodoru — tryt w związku poddawanym znakowaniu. Problem zwiększenia wymiany z trytem poprzez wprowadzenie do układu dodatkowej energii z różnych źródeł omówiony został w materiałach konferencji IAEA odbytej w Kopenhadze we wrześniu 1960 r. (29, 91). Ostatnio dostosowano metodę Wilzbacha do mniejszych aktywności trytu i skrócono czas trwania wymiany z kilku dni do kilkunastu minut (18, 43). W metodzie tej przy pomocy cewki indukcyjnej wytwarzane są wyładowania elektryczne w naczyniu próżniowym, w którym zawarta jest substancja poddawana trytowaniu wraz z trytem, i prowadzi się reakcję pod ciśnieniem 5—20 tora.

Metodą Wilzbacha otrzymano szereg ważnych dla biochemika związków znakowanych trytem, takich jak: puryny i pirymidyny (87), kwas palmitynowy (43), kwas giberelinowy (64), kwas dezoksyrybonukleinowy (10), witaminę B₁₂ (64), sacharozę (61), tetraacetylo-D-rybozę (34), morfinę (51), dekstran (39) oraz szereg białek i enzymów (72, 58, 29, 23). Aktywności tych związków zawarte były w granicach 0,5—5 mC/g.

Wszystkie trytowane związki, otrzymane drogą wymiany wodoru — tryt, zanieczyszczone są szeregiem znakowanych produktów ubocznych których usunięcie jest bardzo uciążliwe. Tak np. w wypadku trytowania

morfiny (51), 70% ogólnej aktywności było zgrupowane w około 1% towarzyszącej dwuhydromorfinie.

Oczyszczanie preparatu trytowanego winno być prowadzone do ustalenia się aktywności właściwej. W trakcie oczyszczania usuwane są również wszystkie atomy trytu zajmujące w cząsteczce miejsca labilne. Dotychczas w bardzo małym stopniu zbadano rozmieszczenie trytu przy kolejnych atomach węgla trytowych związków (61, 12) oraz mechanizm reakcji znakowania (29).

2. Synteza chemiczna

Pomimo, że opisane wyżej sposoby znakowania trytem drogą wymiany są mniej uciążliwe od syntez chemicznych, te ostatnie jednak stosowane są przez wielu badaczy. Składa się na to przede wszystkim możliwość uzyskania na ich drodze znacznie wyższej wydajności i aktywności właściwej (do 60 i 120 C/milimol) zgrupowanej w ściśle określonej pozycji oraz większa łatwość oczyszczenia produktów. Najprostszą metodą jest wodorowanie trytem związków nienasyconych w obecności katalizatora. Można je z powodzeniem przeprowadzić w skali mikro (6). W ten sposób, wychodząc z odpowiednich prekursorów, otrzymano znakowane trytem: sterole (60, 24, 32, 38), adrenalinę i noradrenalinę trytowane w pozycji β (8), dwuhydrostreptomycynę (76) itp. *Crawhall* i *Smyth* (16) uwodorowali w obecności trytu 2-fenyl-4-izopropylidenooksazol do DL- $[\alpha, \beta\text{-}^3\text{H}]$ -waliny. Ogrzewane otrzymanego związku z bezwodnikiem octowym w kwasie octowym doprowadziło do powstania DL- $[\beta\text{-}^3\text{H}]$ -waliny. DL- $[\alpha\text{-}^3\text{H}]$ walinę otrzymali autorzy w reakcji wymiany z HTO nieaktywnej DL-waliny w środowisku bezwodnika octowego.

Przy uwodorowaniu trytem związków nienasyconych nad katalizatorami istnieje jednak możliwość wymiany stabilnych atomów wodoru. Aby tego uniknąć stosuje się zamiast trytu znakowane trytem wodorki metali (9, 45, 41). Używając trytowany wodorek sodowoborowy do redukcji kwasu glikuronowego otrzymano 6-T-glikozę. W podobny sposób zsyntetyzowano szereg innych trytowych cukrów prostych (53, 25).

W przypadku niemożności wprowadzenia trytu w reakcji wodorowania stosuje się metody syntezy organicznej, podobnie jak przy znakowaniu związków ^{14}C lub ^{35}S (55). Przeprowadzona przez *Arnssteina* i *Crawhalla* (2) synteza DL- $[\beta\text{-}^3\text{H}]$ -cystyny miała przebieg przedstawiony na schemacie 1. W trakcie dekarboksylacji kwasu aminomalonowego w środowisku $^3\text{H}_2\text{O}$ powstała $[\alpha\text{-}^3\text{H}]$ -glicyna, która po dalszej dekarboksylacji w reakcji z ninhydryną tworzyła ^3H -formaldehyd. Związek ten wprowadzano do dwuetylo-N-benzylodwutiokarboni-

i współpracownicy po zastosowaniu w charakterze prekursora T-tyminy badali syntezę DN w kulturach tkankowych (86, 85). Badając włączanie ^{14}C i T w produkty fotosyntezy glonów, Moses i Calvin wykazali (52), że w trakcie fotosyntezy tryt z THO wbudowywany jest stabilnie w dużych ilościach po krótkim czasie we wszystkie związki zawierające ^{14}C . Simon i Trebst donoszą (cytowane wg 70), że na jeden atom fotosyntetycznie przyswojonego ^{14}C przypada 1,5—5 atomów trytu wbudowanych w trwałe pozycje w glikozie i innych cukrach.

Dawson i współpracownicy (17) zastosowali w charakterze prekursora nikotyny kwasy nikotynowe znakowane trytem w pozycji 2, 5 i 6, deuterem w pozycji 4, kwas nikotynowy równomiernie znakowany ^{14}C oraz kwas 6-hydroksynikotynowy znakowany ^{15}N . Wykazali oni, że wszystkie stosowane związki za wyjątkiem 6-T-kwasu nikotynowego dają analogiczną zawartość izotopów w cząsteczce nikotyny. Świadczy to o prawdopodobieństwie enzymatycznego ataku przy 6 atomie węgla kwasu nikotynowego w trakcie jego przekształceń do nikotyny. Stosując trytowany wodór, Verly dokładnie określił sugerowane przez innych badaczy biologiczne pochodzenie grupy metylowej w adrenalinie (81). W pracach Gurin i Delluva (37) z trytowaną fenylalaniną wykazano, że jest ona biologicznym prekursorem adrenaliny.

Przedstawione wyżej wyniki nie wyczerpują całości zagadnienia praktycznych możliwości zastosowania trytu w badaniach o charakterze biologicznym. Dotyczą one jedynie głównych obecnie kierunków badań w zakresie metod pomiaru i syntezy związków znakowanych trytem, które mogą zainteresować zarówno biochemików jak i fizjologów.

Znaczenie trytu dla biologii polega przede wszystkim na tym, że może on służyć do znakowania praktycznie wszystkich związków organicznych. W porównaniu z innymi izotopami podstawowych pierwiastków struktur żywych, tryt wykazuje szereg następujących zalet:

a) może być używany do znakowania związków wielokrotnie wyższymi aktywnościami niż pozwala na to ^{14}C ,

b) wprowadzony obok ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S pozwala na zwiększenie liczby znakowanych pierwiastków w związkach organicznych,

c) dzięki słabej energii promieniowania β daje bardzo dokładne obrazy autoradiograficzne,

d) jest dużo tańszy w porównaniu z innymi izotopami stosowanymi w badaniach biologicznych,

e) poza organizmem nie przedstawia niebezpieczeństwa dla człowieka.

Maksymalnie dopuszczalna ilość trytu, która może znajdować się bez szkody dla organizmu w ciele człowieka o wadze 70 kg wynosi 1 mC.

LITERATURA

1. Ahrens R. W., Sauer M. C., Willard J. E., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3285 (1957).
2. Arnstein H. R. V., Crawhall J. C., *Biochem. J.* **67**, 180 (1957).
3. Ayres P. J., Pearlman W. H., Tait J. F., Tait S. A. S., *Biochem. J.* **70**, 230 (1958).
4. Banks T. E., Crawhall J. C., Smyth D. G., *Biochem. J.* **64**, 411 (1956).
5. Bell C. G., Hayes F. N., Liquid scintillation counting. Pergamon Press, London 1958.
6. Bergström S., Lindstedt S., *Acta Chem. Scand.* **11**, 1275 (1957).
7. Bogdanow K. M., Szalnow M. I., Sztukkenberg J. M., *Biofizyka*, **4** (1956).
8. Brosse E. H., Axelrod J., Kety S. S., *Science* **128**, 593 (1958).
9. Brown W. G., Kaplan L., Wilzbach K. E., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1343 (1952).
10. Bosenfreund E., Rosenkranz H. S., Bendich A., *J. Mol. Biol.* **1**, 195 (1959).
11. Burr J. G., Tracer Applications for the Study of Organic Reactions. Interscience Publishers, New York, London 1957.
12. Cacace F., Guarino A., Montefinale G., Possagno E., *Internatl. J. Appl. Radiation Isotopes* **8**, 82 (1960).
13. Clements G. R., Hill W. T., *Science* **125**, 603 (1957).
14. Collins C. J., Lietzke M. H., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 5379 (1959).
15. Crawhall J. C., Hawkins J. D., Smyth D. G., *Biochem. J.* **69**, 286 (1958).
16. Crawhall J. C., Smyth D. G., *Biochem. J.* **69**, 280 (1958).
17. Dawson R. F., Christman D. R., Adamo A. D., Solt M. L., Wolf A. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2628 (1960).
18. Dorfman L. M., Wilzbach K. E., *J. Physic. Chem.* **63**, 799 (1959).
19. Eidinoff M. L., Cheong L., Rich M. A., *Science* **129**, 1550 (1959).
20. Eidinoff M. L., Knoll J. E., *Science* **112**, 250 (1950).
21. Eidinoff M. L., Knoll J. E., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1992 (1953).
22. Eidinoff M. L., Reilly H. C., Knoll J. E., Marrian D. H., *J. Biol. Chem.* **199**, 511 (1952).
23. Fong C. T. O., Schwartz J. L., Poenoe E. A. Silver L., Schoessler M. A., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 2592 (1959).
24. Frantz I. D., Davidson A. G., Dulit E., Mobberley M. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 2290 (1959).
25. Frush H. L., Isbell H. S., Fatiadi A. J., *J. Res. Natl. Bur. Standards* **64A**, 443 (1960).
26. Funt B. L., *Nucleonics* **14**, 83 (1956).
27. Funt B. L., Hetherington A., *Science* **129**, 1429 (1959).
28. Furst M., Kallmann H., Brown F. H., *Nucleonics* **13**, 58 (1955).
29. Ghanem N. A., Westermarck T., *Internatl. J. Appl. Radiat. Isotopes* **9**, 181 (1960).
30. Glascock R. F., *Biochem. J.* **52**, 699 (1952).
31. Glascock R. F., Isotopic gas analysis for biochemists, Academic Press, New York 1954.
32. Glascock R. F., Hoekstra W. G., *Biochem. J.* **72**, 673 (1959).
33. Glascock R. F., Reinns L. R., *Biochem. J.* **62**, 529 (1955).
34. Gordon M. P., Intrieri O. M., Brown G. B., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 5161 (1958).
35. Graul E. H., Hundeshagen H., *Atompraxis* **5**, 154 (1959).

36. Grenon M., Viillard R., *J. Chem. Phys.* **49**, 623 (1952).
37. Gurin S., Delluva A. M., *J. Biol. Chem.* **170**, 545 (1947).
38. Gut M., Uskoković M., *Naturwiss.* **47**, 40 (1960).
39. Hanngren A., Hansson E., Ullberg S., Åberg B., *Nature* **184**, 373 (1959).
40. Herczyńska E., *Nukleonika* **4**, 381 (1959).
41. Isbell H. S., Frush H. L., Moyer J. D., *J. Res. Natl. Bur. Standards* **64A**, 359 (1960).
42. Isbell H. S., Frush H. L., Peterson R. A., *J. Res. Natl. Bur. Standards* **63A**, 171 (1959).
43. Jackson F. L., Kittinger G. W., Karuse F. P., *Nucleonics* **18**, 102 (1960).
44. Jacobson H. I., Gupta G. N., Fenazdez C., Hennix S., Jansen E. V., *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 89 (1960).
45. Kaplan L., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5469 (1955).
46. Kisielewski W. E., Smetana F., *Atompraxis* **7/8**, 4 (1958).
47. Kritchevsky D., Candless R. F. J. Mc., Knoll J. E., Eidinoff M. L., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 6655 (1955).
48. Kukushima D. K., Kritchevsky T. H., Eidinoff M. L., Gollagher T. F. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 487 (1952).
49. Lemmon R. M., Tolbert B. M., Strokmeier W., Whittemore I. M., *Science* **129**, 1740 (1959).
50. Melander L., *Isotope Effects on Reaction Rates*, The Ronald Press Comp. New York 1960.
51. Misra A. L., Woods L. A., *Nature* **185**, 304 (1960).
52. Moses V., Calvin M., *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 297 (1959).
53. Moss G., *Arch. Biochem. Biophys.* **90**, 111 (1960).
54. Muramatsu M., Sasaki T., *Science* **131**, 302 (1960).
55. Murray A., Williams D. L., *Organic Synthesis with Isotopes*. vol. II Interscience Publishers, New York, London 1958.
56. Narath A., Gundlach D., *Angew. Chem.* **72**, 707 (1960).
57. Osiński P. A., *Internatl. J. appl. Radiation Isotopes* **7**, 306 (1960).
58. Pany J., *Naturwiss.* **46**, 515 (1959).
59. Parups E. V., Hoffman I., Jackson H. R., *Talanta* **5**, 75 (1960).
60. Pearlman W. H., *Biochem. J.* **66**, 17 (1957).
61. Proc. Symposium on Tritium in Tracer Applications, sponsored by New England Nuclear Corp., Atomic Associates, Inc., Packard Instrument Co., New York 1957.
62. Robinson C. V., *Rev. Sci Instruments* **22**, 353 (1951).
63. Ropp G. A., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 842 (1960).
64. Rosenblum Ch., Meriwether H. T., Proc. Symposium on Advances in Tracer Applications of Tritium, New York 1958.
65. Rowland F. S.; Wolfgang R., *Nucleonics* **14**, 58 (1956).
66. Rydberg J., *Acta Chem. Scand.* **12**, 399 (1958).
67. Scharpenseel H. W., *Angew. Chem.* **71**, 640 (1959).
68. Shapiro J., Perkins W. H., *Science* **131**, 414 (1960).
69. Seliger H. H., Agranoff B. W., *Analyt. Chem.* **31**, 1607 (1959).
70. Simon H., *Angew. Chem.* **14**, 481 (1961).
71. Simon H., Daniel H., Klebe J. F., *Angew. Chem.* **71**, 303 (1959).
72. Steinberg D., Vaughan M., Anfinsen C. B., Gorry J., *Science* **126**, 447 (1957).

73. Swain C. G., Stivers E. C., Reuwer J. F., Schaad L. J., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 5885 (1958).
74. Taylor J. H., Woods P. S., Hughes W. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **43**, 122 (1957).
75. Tolbert B. M., *Nucleonics* **8**, 74 (1960).
76. Torsten A., *Nature* **177**, 379 (1956).
77. Vaughan M., Steinberg D., Logan J., *Science* **126**, 446 (1957).
78. Verly W. G., *Arch. Internatl. Physiol. Biochem.* **64**, 350 (1956).
79. Verly W. G., *Arch. Internatl. Physiol. Biochem.* **64**, 360 (1956).
80. Verly W. G., *Arch. Internatl. Physiol. Biochem.* **64**, 365 (1956).
81. Verly W. G., *Arch. Internatl. Physiol. Biochem.* **64**, 372 (1956).
82. Verly W. G., *Arch. Internatl. Physiol. Biochem.* **64**, 402 (1956).
83. Verly W. G., Tritium: Dosage, Preparation de Molécules Marquées et Applications Biologiques. Review Series No. 2, International Atomic Energy Agency, Wien 1960.
84. Verly W. G., Bricteux-Gregoire S., Koch G., Demey E., United Nations, 2 Int. Conf. on the Peaceful Uses of Atomic Energy, Genewa 1958 (121).
85. Verly W. G., Firket H., Hunnebelle G., *Int. Conf. on the Peaceful Uses of Atomic Energy, Genewa*, v. 25, 181 (1958).
86. Verly W. G., Hunnebelle G., *Bull. Soc. chim. Belgique* **66**, 640 (1957).
87. Wackers A., Kirschfeld S., Weinblum D., *J. Mol. Biol.* **2**, 72 (1960).
88. White D. F., Campbell L. G., Payne P. R., *Nature* **166**, 628 (1950).
89. Wilson A. T., *Nature* **182**, 524 (1958).
90. Wilzbach K. E., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1013 (1957).
91. Wilzbach K. E., Dorfman L. M., *Internatl. J. appl. Radiat. Isotopes.* **9**, 172 (1960).
92. Wilzbach K. E., Kaplan L., Brown W. G., *Science* **118**, 522 (1953).
93. Wilzbach K. E., Van Dyken A. R., Kaplan L., *Anal. Chem.* **26**, 880 (1954).
94. Wing J., Johnston W. H., *Science* **121**, 674 (1955).
95. Wolfgang R., Pratt T., Rowland F. S., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5132 (1956).
96. Wolfgang R., Rowland F. S., Turton C. N., *Science* **121**, 715, (1955).

ROZPRAWY INŻYNIERSKIE
CZĘŚĆ I. PRACOWNIA I. PRACOWNIA I. PRACOWNIA I.

ROZPRAWY INŻYNIERSKIE

KWARTALNIK
JULIUM 1918 - 1919

WARSZAWA 1918
PIENISZKA WARSZAWSKA WYDAWCA

KRYSTYNA ŁANGOWSKA* I ZOFIA ROTH*

Kwas muraminowy**

Muramic Acid

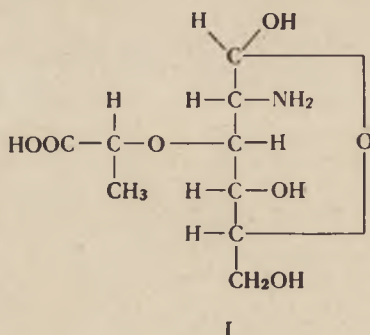
A review concerning the occurrence and biosynthesis of muramic acid in bacteria

Kwas muraminowy, jego występowanie w przyrodzie, synteza i biosynteza są tematem dość licznych prac z ostatnich lat. Badania te wiążą się ściśle z badaniami nad strukturą bakteryjnych błon komórkowych jak również nad zagadnieniem mechanizmu działania bakteriostatycznego penicyliny.

Po raz pierwszy o znalezieniu bliżej nieznanego aminocukru, który później określono jako kwas muraminowy sygnalizuje Park w 1952 roku (19), a później Strange i Powell w 1954 roku (42) wykrywając go w hydrolizatach zarodników bakteryjnych, gdzie występuje związany peptydowo z aminokwasami. W dalszych badaniach nad nieznanym związkiem w 1956 roku na podstawie analizy (39) wykrystalizowanego preparatu (40) określono jego budowę chemiczną potwierdzoną następnie przez syntezę (15, 41). Określono go jako 3-O-D-laktylo-D-glikozaminę, czyli 2-amino-3-O-(2-karboksyetylo)-2-dezoksy-D-glikozę (I). Jak dotychczas kwas muraminowy został wykryty w normalnych warunkach tylko w ściankach (*cell walls*) lub zarodnikach bakteryjnych. Już w 1957 r. Work (47) sugeruje, że ścianki komórkowe niektórych bakterii zbudowane są z wielocukrowców, podobnych do chityny, z tą różnicą, że elementem budowy jest kwas muraminowy a poszczególne łańcuchy powiązane są za pomocą peptydów.

* Mgr, st. asystent Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Poznaniu.

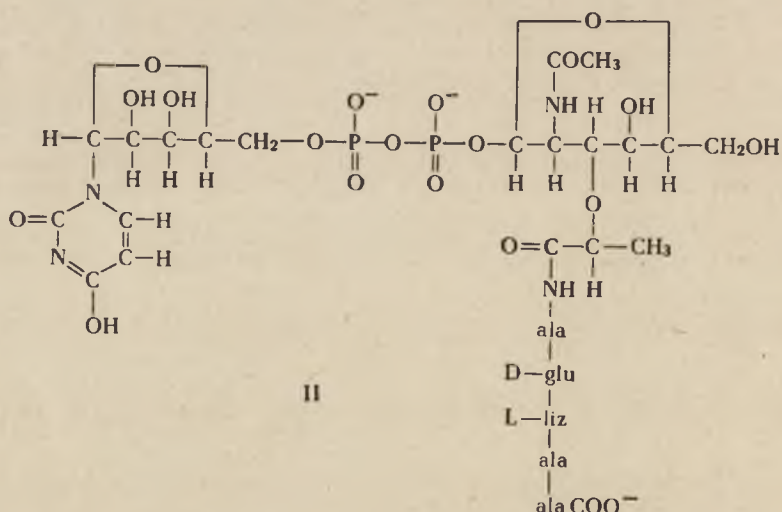
** Stosowane skróty: N-Acglam — N-acetyloglikozamina, UDP-N-Acglam — Urydyldwufosfo-N-acetyloglikozamina, Kw. N-Acmur — kwas N-acetylmuraminowy, PEP — kwas 2-fosfoenolopirogronowy.



I. Wykrycie kwasu muraminowego w badaniach nad działaniem penicyliny

W 1952 roku Park stwierdził (19, 20, 21, 23), że w bakteriiach *Staphylococcus aureus* hodowanych w obecności penicyliny gromadzą się nukleotydy urydynowe związane z bliżej nieokreślonym aminocukrem.

Praca ta była punktem wyjścia zarówno dla zbadania biosyntezy kwasu muraminowego jak i mechanizmu działania penicyliny. W pracy Parka ogłoszonej wspólnie z Stromingerem w 1957 roku (24) podana jest już budowa poprzednio niezidentyfikowanej pochodnej



urydynowej. Okazało się, że jest nią kwas urydynodwufosfo-acetylo-muraminowy UDP-Acmur, którego grupa karboksylowa jest związana amidowo z pięciopeptydem, zbudowanym z D-alaniny, kwasu D-glutaminowego i L-lizyny (II). Aminokwasy występują w stosunku 3 : 1 : 1. Wzór II podany przez Parka i Stromingera uwzględnia struk-

ture kwasu muraminowego ustaloną przez Strange'a i Kenta. Proponowana sekwencja aminokwasów w peptydzie nie jest jeszcze całkowicie potwierdzona.

Jak wspomniano powyżej w bakteriach *S. aureus* hodowanych wobec penicyliny gromadzi się duża ilość UDP-Acmur-peptydu, co świadczy o tym, że bierze on udział w jednej z głównych reakcji zachodzących w komórce. Wzrost jego ilości jest pierwszym sygnałem działania penicyliny i pierwszym bezpośrednim jej skutkiem, wyprzedzającym znacznie inne zmiany biochemiczne i morfologiczne (43).

Okazało się dalej, że jego składnik peptydowo-aminocukrowy jest identyczny z acetylomuramino-peptydowym składnikiem ścianek komórkowych bakterii.

Na tej podstawie oraz opierając się na znanym fakcie, że ogólnie UDP-pochodne biorą udział w reakcji transglikozydacji i tworzeniu polizwiązków (1, 10, 11, 12, 16, 46) autorzy wysuwają hipotezę, że penicylina działa jako specyficzny inhibitor reakcji glikozydacji, w której bierze udział nukleotyd urydynowy.

Jak wykazały wcześniejsze prace (6, 7, 18) wiązanie penicyliny zachodzi w lipidowej błonie komórkowej bakterii (*cell membrane*). Być może hipotetyczna transglikozydaza, uczestnicząca jak się wydaje w syntezie polisacharydów ścianki komórkowej, umieszczona jest właśnie w tym miejscu. Działanie jej polegałoby na przenoszeniu acetylomuramino-peptydu z kompleksu urydynonukleotydowego, znajdującego się wewnątrz komórki do akceptora, umieszczonego w ścianie komórkowej na zewnątrz błony komórkowej. Istnieją pewne doświadczone dane potwierdzające tę hipotezę. Stwierdzono mianowicie (6, 7, 18), że jedna komórka *Staphylococcus aureus* wiąże około 1000 cząsteczek penicyliny. Taka właśnie ilość cząsteczek transglikozydazy o liczbie obrotów około 6000 jest, jak wyliczono, potrzebna przy wzroście komórki *S. aureus*. Może więc rzeczywiście zachodzić wiązanie się jednej cząsteczki penicyliny z jedną cząsteczką enzymu.

Zaobserwowano również (43), że w pewnym zakresie stężeń istnieje równoległość między ilością penicyliny, a nagromadzeniem się w komórce bakteryjnej UDP-Acmur-peptydów, co jest zgodne z koncepcją działania tego antybiotyku na drodze blokowania enzymu.

Park i Strominger zastrzegają się jednak, że dopóki na wycinku błony komórkowej nie zostanie doświadczenie stwierdzona ta reakcja i jej wrażliwość na penicylinę, nie można uważać za dowiedzione, że zahamowanie syntezy ścianek komórkowych polega na zablokowaniu tej właśnie reakcji. Możliwy jest bardziej złożony mechanizm, na przykład zablokowanie syntezy akceptora w ścianie komórkowej. Inne możliwości bardziej skomplikowanego działania penicyliny rozpatrują Mandelstam i Rogers (17).

Wybiórcze działanie penicyliny wobec bakterii — nietoksyczność dla ustroju człowieka — musi polegać na jej wpływie na łańcuch metaboliczny, niespotykany w komórkach zwierzęcych, a więc taki np. jakim jest biosynteza ścianek komórkowych bakterii. Pogląd o działaniu penicyliny na tym właśnie odcinku wydaje się być w wysokim stopniu prawdopodobny.

Jest to zgodne z ogólnie znanym od dawna faktem, że mechanizm działania penicyliny na drobnoustroje polega na zahamowaniu zdolności ich podziału i że penicylina działa najsilniej na hodowle młode, nie wywierając natomiast prawie żadnego wpływu na hodowle stare znajdujące się w fazie spoczynkowej.

Jednym z doświadczalnych dowodów tego stwierdzenia jest praca wykonania *in vitro*, w której wykazano, że kultura *E. Coli* rosnąca w obecności penicyliny i sacharozy składa się wyłącznie z postaci pozbawionych ścianek komórkowych, a po usunięciu penicyliny wraca do postaci normalnej. Te morfologiczne obserwacje wiążą się ściśle z wynikami biochemicznych badań Parka, który stwierdził, że komórki bakteryjne inhibowane penicyliną — po przemyciu i umieszczeniu w normalnych warunkach tracą nadmiar nagromadzonych nukleotydów (43).

Rozważając mechanizm działania penicyliny należy wspomnieć o dawniejszych próbach tłumaczenia jej bakteriostatycznego wpływu. Sądzono mianowicie, że polega on na zablokowaniu syntezy kwasów nukleinowych komórki bakteryjnej. Było to zgodne ze stwierdzonym faktem (44), że nagromadzeniu się UDP-pochodnych w komórkach bakterii traktowanych penicyliną towarzyszy współmierne obniżanie się syntezy kwasów nukleinowych. Jak wiadomo urydynodwufosforany są bezpośrednimi prekursorami polirybonukleotydów bakterii. Nasuwa się więc przypuszczenie, że naruszony zostaje proces polimeryzacji kwasów nukleinowych. Okazało się jednak, że wpływ penicyliny na syntezę kwasów nukleinowych jest zjawiskiem wtórnym wynikającym z „wychwywania — zablokowania” cząsteczek UDP przez połączenie z aminocukrami i peptydami, które nie mogą być w tych warunkach odtransportowane do ściany komórkowej.

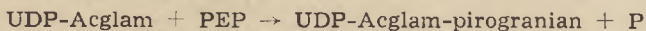
Stwierdzono, że prócz penicyliny szereg innych substancji takich jak chlorotetracyklina, fiolet krystaliczny (24), oksamycyna, bacytracyna (17, 22) działa podobnie na kultury bakteryjne, hamując syntezę ścianek komórkowych z jednoczesnym nagromadzeniem się UDP-N-acetyloaminocukrowych pochodnych (22). Chloramfenikol nie hamuje syntezy ścianek komórkowych (17).

Jak wykazuje praca Rogersa i Perkinsa (31) analogi uracylu a szczególnie 5-fluorouracyl, podobnie jak penicylina hamuje częściowo syntezę ścianek komórkowych *S. aureus* z równoczesnym nagroma-

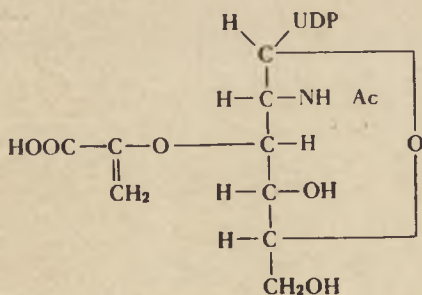
dzaniem się wewnątrz komórki połączeń aminocukrowo-aminokwasowych prawdopodobnie połączonych z nukleotydami. Inne purynowe i pirymidynowe związki takiego działania nie wykazują.

II. Biosynteza kwasu muraminowego

Na trop biosyntezy kwasu muraminowego pierwszy wpadł Park w 1952 roku, w czasie, kiedy budowa tego związku nie była jeszcze znana (syntezę chemiczną kwasu muraminowego przeprowadził Kent (15) dopiero w 1957 roku). Nagromadzenie się dużych ilości UDP-Acmur-peptydów w komórkach *S. aureus* hodowanych wobec penicyliny nasunęło myśl, że substratem w biosyntezie kwasu muraminowego może być UDP-glikozamina albo UDP-acetyloglikozamina. Wydaje się to tym bardziej prawdopodobne, że N-acetyloaminocukry znalezione w komórkach bakteryjnych nie występują tam w postaci wolnej, lecz związanej z UDP (43). Zagadnienie to rozwiązuje częściowo praca Stromingera z 1958 roku (45). Mianowicie autor ten przy udziale wyizolowanych enzymów *S. aureus*, *E. coli* i *Aerobacter aerogenes* przeprowadził następującą reakcję.



Substratem tej reakcji była UDP-Acglam oraz kwas 2-fosfoenolopirogronowy (PEP). Jest to pierwsza, przeprowadzona *in vitro*, reakcja przenoszenia kwasu fosfoenolopirogronowego. Produkt otrzymany w syntezie Stromingera a raczej jego składowa aminocukrowa różni się od kwasu muraminowego tylko ilością atomów wodoru w łańcuchu bocznym, a mianowicie jest uboższy od kwasu N-acetylmuraminowego



III

o dwa atomy wodoru (III). W opisanej reakcji UDP-Acglam nie można było zastąpić acetyloglikozaminą ani jej fosforanem. Również kwasu fosfoenolopirogronowego nie udało się zastąpić pirogranianem, mleczanem + ATP, ani innymi pokrewnymi metabolitami przemiany węglowodanowej.

przy użyciu znaczonej N-acetylo-D-glikozaminy wykazali, że związek ten jest prekursorem kwasu muraminowego.

Biosyntezę kwasu muraminowego, a ściślej kwasu UDP-acetylomuraminowego, jego udział w budowie wielocukrowców ścianki bakteryjnej oraz mechanizm działania penicyliny ilustruje schemat podany przez J o n s e n a i L a l a n d a (14a) (schemat 1).

III. Udział kwasu muraminowego w strukturze ścianek komórkowych niektórych bakterii

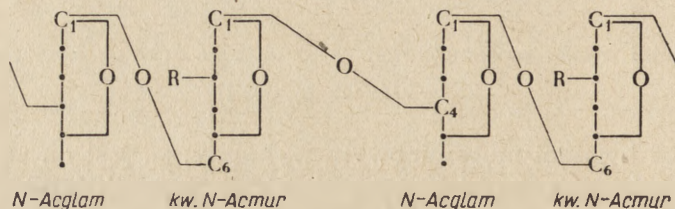
Prace nad kwasem muraminowym wykazały, że jest on zasadniczym składnikiem ścianek komórkowych bakterii gram-dodatnich, a więc takich, na których zaobserwowano bakteriostatyczny wpływ penicyliny.

W toku badań nad wydzieleniem składników ścianek komórkowych należało nierozpuszczalny materiał poddać całkowitej hydrolizie na drodze chemicznej lub zhydrolizować go częściowo przy pomocy enzymów. W ten sposób otrzymując różne fragmenty i ustalając następnie ich skład chemiczny oraz kolejność poszczególnych związków w takim fragmencie można było odtworzyć sobie chemiczną strukturę ścianek komórkowych.

Perkins (25, 26) działając lizozymem na wyizolowane ścianki bakteryjne *Micrococcus lisodeikticus* otrzymał między innymi produktami trawienia — podobnie jak Salton (32) — dwucukier i potwierdził sugestię Saltona, że składa się on z N-acetyloglikozaminy i kwasu muraminowego. Grupa redukująca tego dwucukru należy do kwasu muraminowego, a wiązanie z N-acetyloglikozaminą jest typu 1→6 (5, 25, 26). Badania (36, 37) przy użyciu β-glikozydazy oraz metod chemicznych wykazały, że jest to wiązanie typu β (36, 37). Dwucukrowy fragment uwalniany przez lizozym został więc ostatecznie scharakteryzowany jako kwas N-acetyloglikozaminylo-β-(1→6)-O-N-acetylomuraminowy. Stwierdzono, że N-acetyloglikozamina jest wcielana do ścianek komórkowych najlepiej wówczas, gdy jest dodana do podłoża w formie β-pochodnej (4). W badaniu powiązania takich dwucukrowych fragmentów w związek makrocząsteczkowy Salton stwierdził, że wolne grupy redukujące, nie występujące w izolowanych ściankach komórkowych, pojawiają się w miarę działania lizozymu. Wskazywało to, że lizozym rozbija wybiórczo wiązanie pomiędzy atomem węgla C₁ kwasu muraminowego a N-acetyloglikozaminą uwalniając fragmenty dwucukrowe.

Przez analogię do działania lizozymu na chitynę, która jest jak wiadomo poli-N-acetyloglikozaminą o wiązaniu β-(1→4), wysnuto przypuszczenie (5, 26, 36, 37), że lizozym także i w tym przypadku rozbija

wiązanie 1→4. Wobec tego wielocukrowiec ścianek komórkowych składałby się z opisanych fragmentów dwucukrowych powiązanych ze sobą w ten sposób, że grupa ozydowa kwasu muraminowego jednego fragmentu dwucukrowego wiązałaby się z atomem węgla C₄ N-acetyloglikozaminy drugiego fragmentu (schemat 2). W produktach hydrolizy lizozymem ścianek komórkowych (36, 37) znaleziono faktycznie czterocukrowe fragmenty tego typu.



Schemat 2. Typy wiązań w wielocukrowcach ścianek komórkowych *Micrococcus lysodeikticus*.

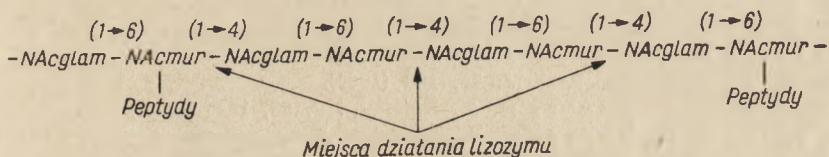
Jak już zaznaczono prekursor omawianych wielocukrów — kwas UDP-Acmur połączony jest z ugrupowaniem peptydowym. Należało zatem odpowiedzieć na pytanie czy makrocząsteczkowy związek, w skład którego wchodzi omówione oligosacharydy, ma trzon czysto cukrowy, czy też peptydowo-cukrowy.

Badania przeprowadzone przez Perkinsa i współpracowników (26—29), Saltona (33) oraz Ghuyse na (8) wykazały, że trzon wielocukrowego składnika ścianek komórkowych *Micrococcus lysodeikticus* składa się wyłącznie z kwasu N-acetylmuraminowego i D-glikozaminy. Nie stwierdzono obecności wiązań peptydowych w głównym łańcuchu polisacharydowym. Natomiast grupa karboksylowa kwasu muraminowego związana jest amidowo z końcową grupą aminową peptydów. Wyniki te są zgodne z doświadczeniami Parka i Stromingera, którzy jak już o tym była mowa stwierdzili gromadzenie się fragmentów cukrowo-peptydowych w komórce w warunkach „niefizjologicznych”, przy zahamowaniu penicyliną syntezy ścianek komórkowych.

Należało więc się spodziewać, że karboksypeptydaza powinna odszczepiać łańcuch peptydowy. Ujemny wynik działania tego enzymu autorzy tłumaczą albo występowaniem D-aminokwasów albo wiązaniem końcowej grupy —COOH łańcucha peptydowego z grupą —OH cukru. Być może, że zgodnie z sugestią Worka (47) tego typu połączenia utworzone są przez poprzeczne wiązania peptydowe pomiędzy łańcuchami polisacharydów.

Badanie fragmentów strukturalnych ścianek komórkowych uzyskanych przy użyciu innych enzymów doprowadziło do podobnych wyników. Ghuyse i Salton (9) trawiąc ścianki komórkowe *Micro-*

coccus lisodeikticus lizozymem i polisacharazą wyizolowaną ze *Streptomyces* otrzymali także fragmenty dwucukrowe złożone z kwasu N-acetylmuraminowego i N-acetyloglikozaminy, względnie ich niskie polimery obok kompleksów cukrowo-peptydowych. Część peptydowa tych ostatnich składała się z lizyny, kwasu glutaminowego, glicyny i alaniny w stosunku 1 : 1 : 1 : 2—3. Należy podkreślić, że stosunek ten był stały we wszystkich fragmentach i zgodny ze stosunkiem, w jakim występowały te aminokwasy w całkowitym hydrolizacie ścianek komórkowych. G h u y s e n (8) trawiac wyizolowane produkty częściowego rozkładu ścianek komórkowych wyizolowaną ze *Stroptomyces* amidazą uzyskał rozerwanie wiązania amidowego między grupą karboksylową kwasu muraminowego a łańcuchem peptydowym. Produktem działania tego enzymu były małe fragmenty peptydowe i wolna alanina. Stwierdzono, że N-końcową grupę łańcuchów peptydowych stanowi alanina (8, 14, 35). Sekwencja aminokwasów w peptydach nie została ustalona. Mukopeptydy wyizolowane ze ścianek komórkowych *S. aureus* zawierają według M a n d e l s t a m a i R o g e r s a (17) 44—62% aminokwasów oraz 40—47% składników cukrowych. S a l t o n i G h u y s e n (37) proponują następujący schemat budowy ścianek komórkowych Gram-dodatnich bakterii — *Micrococcus lisodeikticus* (schemat 3).



Schemat 3. Schemat budowy ścianek komórkowych *Micrococcus lisodeikticus*.

Co do bakterii Gram-ujemnych niewrażliwych na penicylinę budowa ich ścianek powinna być odmienna, jeżeli rzeczywiście działanie penicyliny związane jest z syntezą ścianek komórkowych, a w szczególności z procesem wbudowywania się w ich strukturę kwasu muraminowego. Okazuje się, że istotnie chemiczny skład ścianek bakterii Gram-ujemnych jest bardziej złożony. Mukopeptydy stanowią w nich jedynie 10—20% wagi ścianek, reszta zaś ma charakter złożonego lipopolisacharydo-białkowego kompleksu.

Zagadnienia te omówione są obszernie w *Postęпах Biochemii* w artykule M. P i e t r u s i e w i c z (29a).

LITERATURA

1. Armstrong J., Baddiley J., *Nature* **181**, 1692 (1958).
2. Baddiley J., Buchanan J. G., Carss B., Mathias A. P., Sanderson A. R., *Biochem. J.* **64**, 599 (1956).
3. Baddiley J., Buchanan J. G., Carss B., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 220 (1958).

4. O'Brien P. J., Glick M. C., Zilliken F., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 357 (1960).
5. Brumfitt W., Wardlaw A. C., Park J. T., *Nature* **181**, 1783 (1958).
6. Cooper P. D., *J. Gen. Microbiol.* **10**, 236 (1955), cyt. za 24.
7. Cooper P. D., *J. Gen. Microbiol.* **12**, 100 (1955), cyt. za 24.
8. Ghuysen J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 473 (1960).
9. Ghuysen J. M., Salton M. R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 462 (1960).
10. Glaser L., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 436 (1957).
11. Glaser L., Brown D. H., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 449 (1957).
12. Glaser L., Brown D. H., *J. Biol. Chem.* **228**, 729 (1957).
13. Glick M. C., Sall T., Zilliken F., Mudd S., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 361 (1960).
14. Ingram V. M., Salton M. R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 9 (1957).
- 14a. Jonsen J., Laland S., *Adv Carbohydrate Chem.* **15**, 201 (1960).
15. Kent L. H., *Biochem. J.* **67**, 5P (1957).
16. Leloir L. F., Cardini C. E., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6340 (1957).
17. Mandelstam J., Rogers H. J., *Biochem. J.* **72**, 654 (1959).
18. Mitchell P., Moyle J., *Bacterial Anatomy, ETC Spooner BAD*, Stocker Eds., Cambridge 1956, s. 172, cyt. za 24.
19. Park J. T., *J. Biol. Chem.* **194**, 877 (1952).
20. Park J. T., *J. Biol. Chem.* **194**, 885 (1952).
21. Park J. T., *J. Biol. Chem.* **194**, 897 (1952).
22. Park J. T., *Biochem. J.* **70**, 2P (1958).
23. Park J. T., Johnson M. J., *J. Biol. Chem.* **179**, 585 (1949).
24. Park J. T., Strominger J. L., *Science* **125**, 99 (1957).
25. Perkins H. R., *Biochem. J.* **73**, 33P (1959).
26. Perkins H. R., *Biochem. J.* **74**, 183 (1960).
27. Perkins H. R., *Biochem. J.* **74**, 186 (1960).
28. Perkins H. R., Rogers H. J., *Biochem. J.* **69**, 15P (1958).
29. Perkins H. R., Rogers H. J., *Biochem. J.* **72**, 647 (1959).
- 29a. Pietrusiewicz M., *Post. Biochem.* **7** (1961).
30. Richmond M. H., Perkins H. R., *Biochem. J.* **76** 1P (1960).
31. Rogers H. J., Perkins H. R., *Biochem. J.* **74**, 6P (1960).
32. Salton M. R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **22**, 495 (1956).
33. Salton M. R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 308 (1959).
34. Salton M. R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 364 (1960).
35. Salton M. R. J., Ghuysen J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 160 (1957).
36. Salton M. R. J., Ghuysen J. M. *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 552 (1959).
37. Salton M. R. J., Ghuysen J. M. *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 355, (1960).
38. Salton M. R. J., Horne R. W., *Biochim. Biophys. Acta* **7**, 177 (1951).
39. Strange R. E., *Biochem. J.* **64**, 23P (1956).
40. Strange R. E., Dark F. A., *Nature* **177**, 186 (1956).
41. Strange R. E., Kent L. H., *Biochem. J.* **71**, 333 (1959).
42. Strange R. E., Powell J. F., *Biochem. J.*, **58**, 80 (1954).
43. Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **224**, 509 (1957).
44. Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **224**, 525 (1957).
45. Strominger J. L., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 645, (1958).
46. Smith E. E. B., Mills G. T., Bernheimer H. P., Austrian R., *J. Biol. Chem.* **235**, 1876 (1960).
47. Work E., *Nature* **179**, 841 (1957).

TADEUSZ CHOJNACKI*

Biosynteza fosfolipidów****The Biosynthesis of Phospholipids**

The mechanisms of the biosynthesis of phospholipids are reviewed.

Rozwój badań nad biosyntezą fosfolipidów notowany w ciągu kilku ostatnich lat w dużej mierze stymulowany jest zainteresowaniem ich rolą biologiczną. Szczególną właściwość tej grupy związków stanowi obecność w ich cząsteczce składników lipofilnych i hydrofilnych. Dzięki temu w przeciwieństwie od zwykłych tłuszczów cechuje je pewien stopień rozpuszczalności w wodzie oraz zdolność gromadzenia się na granicy faz tłuszczowej i wodnej. Fosfolipidy komórkowe stanowią materiał strukturalny komórek, przy czym zarówno ilość ich jak i rodzaj są bardzo zbliżone w różnych strukturach tej samej komórki (10, 67, 82, 90). Wchodząc w skład lipoproteidowych kompleksów mitochondriów i mikrosomów oraz błon komórkowych wpływają one zarówno na ich przepuszczalność jak i inne formy aktywności biologicznej (8, 9). Przemiana fosfolipidów ma duże znaczenie dla czynności życiowych różnych tkanek. U zwierząt wyższych duże podobieństwo w składzie fosfolipidów występuje pomiędzy różnymi tkankami jak i u różnych gatunków. Te same fosfolipidy występują również u roślin wyższych, chociaż w innych stosunkach ilościowych niż u zwierząt (8). Fakty te nasywają przypuszczenie o podobnej roli fosfolipidów w różnorodnym materiale biologicznym.

* Dr, st. asystent Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

** W niniejszym artykule stosowane są następujące skróty: ADPChol — adenyndwufosfocholina, CDPChol — cytydynodwufosfocholina, CDPEt — cytydynodwufosfoetanolamina, CDP-dwugliceryd — cytydynodwufosfodwugliceryd, GDPChol — guanozynydwufosfocholina, α -GP — α -fosforan glicerolu, RCOCoA — acylokoenzym A, UDPChol — urydynodwufosfocholina.

Czteroliterowe oznaczenia umieszczane przy nazwach enzymu oznaczają jego pozycję w obowiązującej (1961) klasyfikacji enzymów.

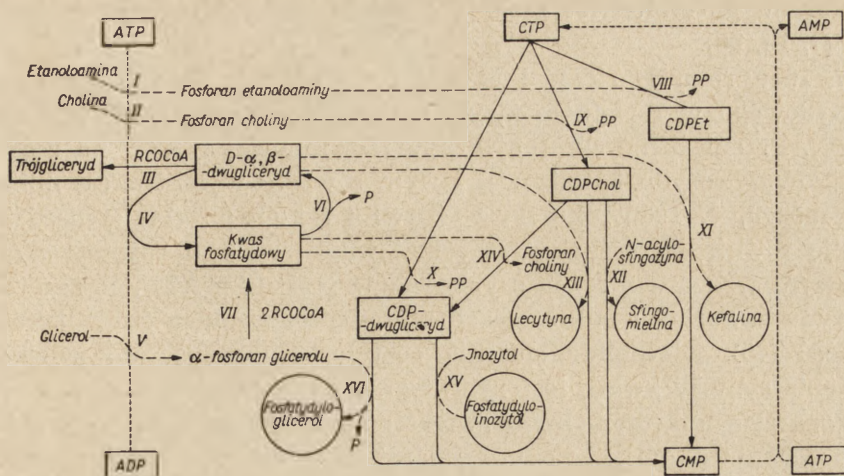
Cyfry rzymskie oznaczające numery reakcji odnoszą się do schematu 1.

Brak dotychczas ogólnie przyjętego systemu nomenklatury fosfolipidów. Wobec ciągle zwiększającej się liczby poznanych związków tej grupy niewystarczające okazują się tradycyjne ramy klasyfikacji a w dążeniu do ścisłości nomenklatury potocznie używane nazwy fosfolipidów zastępuje się coraz częściej ich nazwami chemicznymi. Mimo to w wielu badaniach biologicznych z powodu wątpliwej homogenności i czystości końcowych ekstraktów lipidowych używanie bardziej ogólnych nazw jak kefalina, lecytyna ma swoje usprawiedliwienie. Części składowe fosfolipidów: glicerol, kwasy tłuszczowe, cholina, etanoloamina, seryna występują w tkankach zarówno w stanie wolnym, jak i jako składniki innych związków poza fosfolipidami. Są one wbudowywane bezpośrednio w cząsteczkę fosfolipidu. Jak to wykazały m. in. badania Pritcharda (76) znakowane węglem ^{14}C glicerol, cholina, seryna i etanoloamina w trakcie inkubacji ze skrawkami narządów wbudowywały się bez zmiany w fosfolipidy. Obecność w tkankach w postaci ufosforylowanej poszczególnych komponentów fosfolipidów nasuwała możliwość udziału tych estrów fosforowych w syntezie fosfolipidów. Duży postęp w dziedzinie badań nad metabolizmem fosfolipidów (50, 54) stanowiło wykazanie w 1953 roku przez Kennedy'ego i współpracowników udziału nukleotydów cytydynowych w przemianie fosfolipidowej. Prawdopodobnie obok rybozowych nukleotydów cytydynowych w przemianie tej mogą brać udział nukleotydy dezoksyrybozowe, których obecność stwierdzono w materiale biologicznym (77, 85). Jak wykazują badania Kennedy'ego i współpracowników (53) związki te mogą odgrywać rolę w biosyntezie fosfolipidów w jądrze komórkowym. Nukleotydy cytydynowe odgrywają w biosyntezie fosfolipidów podobnie specyficzną rolę jak nukleotydy urydynowe (70) w biosyntezie glikozydów i wielocukrów.

I. Udział ATP i CTP w biosyntezie fosfolipidów

Reakcje biosyntezy fosfolipidów zachodzące przy współudziale estrów fosforowych oraz nukleotydów cytydynowych przedstawiono w schemacie 1. Schemat ten jest próbą ujęcia w jedną całość poszczególnych etapów tego procesu, poznanych dokładnie dzięki pracom Agranoffa i współpracowników, Hokinów, Kennedy'ego i współpracowników oraz Kornberga i Pricera.

Energia do biosyntezy fosfolipidów dostarczana jest przez ATP i CTP w reakcjach: 1) rozpadu ATP z wytworzeniem ADP oraz 2) odszczepienia pirofosforanu z CTP. Obecność w tkankach enzymu fosforylującego CMP kosztem ATP (40) zapewnia regenerację CTP zużywanego do tworzenia połączeń z kwasem fosfatydowym, fosfocholimą i fosfoetanoloaminą.



Schemat 1. Udział ATP i CTP w biosyntezie fosfolipidów

1. Reakcje z ATP

Przedstawione w lewej części schematu procesy fosforylacji cholina (II), etanoloamina (I), glicerolu (V) i dwuglicerydu (IV) przebiegają przy współudziale ATP jako dawcy grupy fosforanowej. Powstawanie fosforanu cholina z cholina i ATP stwierdzono w 1952 roku przez Kometianiego (58). W rok później Wittenberg i Kornberg (95) uzyskali z wątroby i drożdży oczyszczone preparaty enzymu katalizującego fosforylację cholina i w mniejszym stopniu etanoloaminy. Prace Dawsona (27, 28, 31), Ansella i Dawsona (2) oraz Kometianiego i Tkeszelaszwili (59) wykazały, że maksymalne wbudowanie ^{32}P podanego *in vivo* ^{32}P -ortofosforanu w fosforan cholina i fosforan etanoloaminy zachodzi w kilka godzin po podaniu zwierzęciu znaczonego fosforanu, przy czym wyraźnie wyprzedza szczyt aktywności właściwej fosfatydylocholesterolu i fosfatydyloetanoloaminy. Fosforan cholina i fosforan etanoloaminy są zatem związkami pośrednimi w biosyntezie fosfolipidów.

Fosforylację glicerolu jak ważny etap w procesie biosyntezy fosfolipidów wykazał w 1953 roku Kennedy (51). Stwierdził on, że znakowany ^{32}P -ortofosforan wbudowuje się najpierw w ATP, później w α -fosforan glicerolu, a następnie w fosfolipidy mitochondriów. Dodanie glicerolu do środowiska reakcji powodowało zwiększenie inkorporacji ^{32}P w fosfolipidy. Bublitz i Kennedy (17, 18) wyosobnili z mitochondriów wątroby i częściowo oczyścili enzym glicerokinazę, katalizującą fosforylację cząsteczki glicerolu z wytworzeniem α -fosforanu glicerolu. Obecność glicerokinazy udało się wykazać tylko w wątrobie, sercu i nerce. W tkankach nie zawierających tego enzymu źródłem

α -fosforanu glicerolu jest reakcja redukcji fosforanu dwuhydroksyacetonu (7, 19, 48).

W 1959 roku Hokin i Hokin stwierdzili powstawanie kwasu fosfatydowego w reakcji między α, β -dwuglicerydem i ATP (42) (reakcja IV). Przeniesienie skrajnej grupy fosforanowej z ATP na cząsteczkę α, β -dwuglicerydu katalizował enzym zawarty w ekstrakcie mikrosomów mózgu. W 1960 roku Bradbeer i Stumpf (14) stwierdzili tę reakcję również u roślin wyższych. Dwuglicerydy o różnym składzie acylowym wchodzą z różną szybkością w reakcję z ATP. Kinaza dwuglicerydu zawarta w mikrosomach mózgu posiada dużą potencjalną aktywność (45). Niewielkie stężenia acetylocholinoznacznie zwiększają natężenia syntezy kwasu fosforylowego w mikrosomach nienaruszonych. W preparacie mikrosomalnym zwiększenie aktywności enzymu uzyskana po dodaniu dezoksychoalanu. Preparat mikrosomalny nie syntetyzował kwasu fosfatydowego z α -fosforanu glicerolu drogą VII wykrytą przez Kornberga i Pricera (64) w mikrosomach wątroby szczura.

Drogę powstawania kwasu fosfatydowego poprzez przyłączanie zaktywowanych wyższych kwasów tłuszczowych do cząsteczki α -fosforanu glicerolu (VII) opisali w 1953 roku Kornberg i Pricer (64). Autorzy ci obserwowali reakcję estryfikacji między L- α -fosforanem glicerolu a kwasem tłuszczowym związanym tioestrowo z CoA, zachodzącą w preparacie mikrosomów wątroby szczura. Trudno powiedzieć czy drogi IV i VII prowadzą do kwasów fosfatydowych różniących się między sobą składem acylowym, czy też w obu mogą powstać te same produkty.

2. Reakcje z CTP

Połączenia estrów fosforowych choliny i etanoloaminy z nukleotydem cytydynowym stanowią pośrednie etapy procesów ich wbudowania się w cząsteczki fosfolipidów. Niektórzy autorzy nazywają reakcję powstawania CDPET (VIII) i CDPChol (IX) aktywacją fosforanu choliny i fosforanu etanoloaminy. Podobnie aktywacją można nazwać tworzenie się analogicznego połączenia cytydynodwufosforanu z dwuglicerydem (X). W poszczególnych reakcjach biosyntezy fosfolipidów tylko jeden z substratów lipidowy albo nielipidowy bierze udział w tej formie zaktywowanej.

Powstawanie cytydynodwufosfocholiny. Zasadniczy model tej reakcji, której cechą jest powstawanie z trójfosfonukleotydu i związku aktywowanego — aktywnej formy tego ostatniego i pirofosforanu nieorganicznego, znany jest z badań Kornberga nad syntezą DPN (61). Poznano już około 20 typów podobnych reakcji, należy do nich m. in. proces aktywacji aminokwasów (41). Powstawanie CDPChol stwierdzili po raz pierwszy Kennedy i Weiss w 1955 r. (55) w preparacie

frakcji podkomórkowej, z homogenatu wątroby kurczęcia osadzonej wirowaniem przy $15000 \times g$ po uprzednim oddzieleniu przy $500 \times g$ jąder komórkowych i nieroztartych fragmentów tkanki. Przebieg tej reakcji można śledzić przy użyciu fosforanu cholicy znakowanego węglem ^{14}C lub fosforem ^{32}P . Powstającą w reakcji IX znaczną CDPChol można zaadsorbować na węglu aktywowanym i oznaczyć ilościowo bez wymywania z adsorbenta przez pomiar radioaktywności.

Katalizująca reakcję IX cytydyliłotransferaza CTP-cholinofosforanowa [2.7.7.15] została otrzymana w stanie surowym z wątroby świnki morskiej. Enzym ten zawarty jest głównie w mitochondriach i mikrosomach (52). Materiałem wyjściowym do jego dalszego oczyszczania była frakcja białkowa osadzona z supernatantu, otrzymanego po odwirowaniu homogenatu przy $500 \times g$, doprowadzeniem pH do 5,2 (11). Można ją zatem, przez analogię do enzymów katalizujących aktywację aminokwasów, zaliczyć do tzw. „frakcji pH 5”. Enzym ten jest odporny na działanie temperatury $+ 55^\circ$ w ciągu około 20 min. Działanie tej temperatury niszczy zawarte w preparacie enzymy hydrolizujące, dzięki czemu po ogrzaniu obserwuje się wzrost aktywności transferazy. Jest ona specyficzna dla CTP — nie katalizuje powstawania połączeń fosfocholicy z ATP, GTP i UTP. Aktywatorami omawianej reakcji są jony Mg^{+2} lub Mn^{+2} . Optymalne pH działania enzymu wynosi 7,2.

Obecność transferazy CTP-cholinofosforanowej [2.7.7.15] stwierdzono w różnych tkankach szeregu ssaków, znaleziono ją również u ptaków (wątroba kurczęcia), u roślin (marchew) i w kilku szczepach drożdży (55). Badania Hellera i współpracowników (39) wskazują, że występuje ona również u owadów.

Reakcja IX jest odwracalna (11): pirofosforan nieorganiczny powoduje pirofosforolityczny rozpad CDPChol z wytworzeniem fosfocholicy i CTP. Piętno dodanego do środowiska reakcji ^{32}P -pirofosforanu odnaleźć można wówczas w cytydynotrójfosforanie.

Powstawanie cytydynodwufosfoetanolaminy. CDPEt powstaje w reakcji VIII analogicznej do reakcji powstawania CDPChol (IX). Katalizująca tę reakcję cytydyliłotransferaza CTP-etanolaminofosforanowa [2.7.7.14] jest w przeciwieństwie do cytydyliłotransferazy CTP-cholinofosforanowej [2.7.7.15] wrażliwa na działanie podwyższonej temperatury (11) — ogrzanie preparatu do 55° powoduje jej inaktywację. Transferaza ta występuje we frakcji supernatantu a zatem zlokalizowana jest w innych częściach komórek niż transferaza (2.7.7.15) wydzielona z frakcji mitochondrialnej i mikrosomalnej (52).

Powstawanie CDP-dwuglicerydu. Reakcja CTP z kwasem fosfatydowym (X), w wyniku której powstaje PP oraz CDP-dwugliceryd, biorący następnie udział w syntezie fosfatydylo-inozytu i fosfatydyloglicerolu stwierdzona została przez Paula i Kennedy'ego w dializowanym homogenacie wątroby świnki morskiej (72). Mechanizm aktywa-

cji jest podobny do opisanego w reakcjach VIII i IX z tą różnicą, że prekursorem jest nie azotowy, lecz lipidowy fragment lipidu. W stosowanym przez autorów układzie ilość CTP zmieniona w CDP-dwugliceryd była dość wysoka (8%).

Agranoff i współpracownicy (1) na podstawie doświadczeń z frakcją mitochondrialną nerki królika przypuszczają, że CDP-dwugliceryd powstawać może i na innej drodze, a mianowicie, w reakcji: CDPChol z kwasem fosfatydowym (XIV).

Takie sformułowanie reakcji wyjaśniałoby obserwowane nagromadzenie się we frakcji lipidowej dodanego do inkubatu $^3\text{H-CMP}$. Według autorów z dodanego $^3\text{H-CMP}$ i lecytyny obecnej w mitochondriach powstaje $^3\text{H-CDPChol}$ (92). W przeciwieństwie do reakcji powstawania CDP-dwuglicerydu z CTP, wydajność reakcji XIV wynosiła tylko około 0,1%.

Powstawanie lecytyny i kefaliny. W powstawaniu lecytyny bierze udział cytydynodwufosfocholina oraz $\text{D-}\alpha\text{-}\beta\text{-dwugliceryd}$. Obok lecytyny produktem reakcji XIII jest CMP.

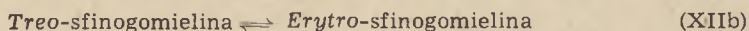
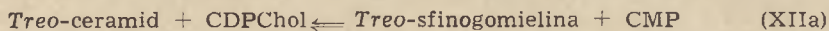
Reakcja powyższa katalizowana jest przez cholinofosfotransferazę CDJCholinowo-1,2-dwuglicerydową [2.7.8.2]. Enzym ten wykazuje absolutną specyficzność w stosunku do CDPChol, nie może być ona zastąpiona przez UDPChol, ADPChol lub GDPChol. $\text{D-}\alpha\text{-}\beta\text{-dwugliceryd}$ jest specyficznym akceptorem fosforanu choliny w przedstawionym procesie syntezy lecytyny; w reakcji tej nie może on być zastąpiony przez trójgliceryd, kwas fosfatydowy czy lecytynę. Aktywatorami reakcji są jony Mg^{+2} lub jony Mn^{+2} , inhibitorem jony Ca^{+2} .

W powstawaniu kefaliny bierze udział odrębny enzym — etanoloaminofosfotransferaza CDP-etanoloaminowo-1,2-dwuglicerydowa (2.7.8.1) (55), katalizujący reakcję XI między cytydynodwufosfoetanolaminą i $\alpha\text{-}\beta\text{-dwuglicerydem}$.

Jak wykazały badania Kornberga i Pricera (62) oraz Kennedy'ego i współpracowników (92) lecytyna i kefalina zsyntetyzowane w reakcjach XI i XII zawierają reszty fosforanowe pochodzące z fosforanu choliny i fosforanu etanoloaminy. Podobną zależność stwierdzono w biosyntezie fosfolipidów u owadów (21, 23, 24).

Powstawanie sfingomieliny. Udział cytydynodwufosfocholiny w ostatnim etapie biosyntezy sfingomieliny wykazali Srieбney i Kennedy (86, 87). Cząsteczka fosfocholiny pochodząca z CDPChol zostaje przyłączona w reakcji XII grupą fosforanową do wolnej pierwszorzędowej grupy wodorotlenowej ceramidu (N-acylo-sfingozyny). Enzym katalizujący tę reakcję stwierdzono w wątrobie kurczęcia oraz w różnych tkankach wieprza i barana. Aktywatorem reakcji są jony Mn^{+2} , jony Ca^{+2} hamują jej przebieg. Wyniki badań nad budową przestrzenną ceramidu biorącego udział w reakcji dały wyniki nieoczekiwane — aktywną okazała się forma o konfiguracji *treo*. Sfingomielina otrzymana

w wyniku tej reakcji miała również konfigurację *treo*. Jak następnie wykazano, forma *erythro*-ceramidu nie bierze udziału w opisanej reakcji. Z drugiej strony wiadomo, że składnikiem zarówno sfingomielin jak i cerebrozydów naturalnie występujących jest wyłącznie *erythro*-sfingozyna (20). Niestwierdzenie reakcji XII z *erythro*-ceramidem w badaniach prowadzonych *in vitro* można by tłumaczyć mniejszą rozpuszczalnością tej formy w porównaniu z formą *treo*, która jako lepiej rozpuszczalna łatwiej osiągnęłaby powierzchnię enzymu. Nie można zatem wykluczyć, że aktualnym substratem tej reakcji *in vivo* jest jednak forma *erythro* ceramidu. S r i e b n e y i K e n n e d y wysuwają jednak inne wytłumaczenie udziału w opisywanej reakcji jedynie *treo*-ceramidu. Przypuszczają oni, że występująca w tkankach *erythro*-sfingomielina powstaje w dwu etapach (XIIa i XIIb), to jest w wyniku zmiany konfiguracji wytworzonej pierwotnie *treo*-sfingomieliny.



Należy podkreślić, że S r i e b n e y o w i i K e n n e d y' e m u udało się przeprowadzić reakcję CDPChol jedynie z ceramidami zawierającymi niższe kwasy tłuszczowe. Stosowanie do reakcji ceramidów o acylu dłuższym niż dwuwęglowy nastroczało trudności związane z ich nierozpuszczalnością, dopiero przy użyciu detergentu Tween 20 udawało się przeprowadzać reakcję z ceramidami o acylach dłuższych, lecz co najwyżej ośmiowęglowych. Z drugiej strony wiadomo, że naturalnie występujące sfingomieliny zawierają łańcuch acylowy o dwudziesto- lub dwudziestoczwierogłowym łańcuchu. Ceramidy o takiej długości łańcucha acylowego nie wchodziły w reakcję z CDPChol w warunkach doświadczenia z izolowaną frakcją podkomórkową wątroby kurczęcia. Z tego powodu omówione prace nie mogą przesądzić o tym, że reakcja XII przedstawia przebieg biosyntezy sfingomieliny *in vivo*, jak również świadczyć o konfiguracji ceramidu mogącego *in vivo* wchodzić w reakcję z CDPChol. Wraz z wydłużaniem łańcucha kwasu tłuszczowego lipidu zmieniają się właściwości fizykochemiczne i reaktywność tego połączenia. Jako przykład może służyć omówiona reakcja IV powstawania kwasu fosfatydowego z ATP i dwuglicerydu, w której skład acylowy użytego dwuglicerydu decydował o natężeniu procesu (44).

Powstawanie inozytofosfolipidów. Znane są jedynie pośrednie etapy powstawania fosfatydoinozytolu zbudowanego z 1 cząsteczki glicerolu, 2 cząsteczek kwasów tłuszczowych, 1 cząsteczki inozytolu i 1 reszty fosforanowej. Obok związku o podanym wyżej składzie w przyrodzie występuje szereg różnych fosfolipidów zawierających inozytol, których biosynteza nie została jeszcze ustalona.

Syntezę fosfatydoinozytolu stwierdzono w preparacie mikrosomów wątroby kurczęcia stosując syntetyczną CDP-dwupalmitynę oraz ^3H -ino-

zytol. Prace Paulusa i Kennedy'ego (71, 72, 73) wykazały, że związkiem pośrednim w tej syntezie (reakcja XV) jest CDP-dwugliceryd oraz, że bierze w niej udział wolny nieufosforylowany inozytol. Zatem mechanizm reakcji jest inny od stwierdzonego w badaniach nad powstawaniem lecytyny, kefaliny i sfingomieliny (reakcje XI, XII, XIII).

Podobny mechanizm powstawania fosfatydyloinozytolu podali Agranoff i współpracownicy (1) na podstawie wyników badań nad włączaniem znakowanego ^3H -inozytolu w fosfolipidy mitochondriów nerki królika. Według tych autorów w pierwszym etapie tej syntezy tj. powstaniu CDP-dwuglicerydu bierze udział nie CTP lecz CDPChol. Włączanie znakowanego inozytolu w lipidy było bowiem w tych badaniach stymulowane przez CDPChol, lecz nie przez CTP.

Zarówno w badaniach Paulusa i Kennedy'ego jak i Agranoffa i współpracowników rolę prekursora fosfatydyloinozytolu spełnia kwas fosfatydowy.

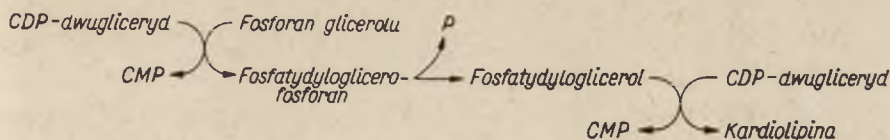
Z badań Stricklanda oraz Thompsona i współpracowników (83, 88, 89) wynika, że w tkance mózgowej możliwa jest biosynteza fosfatydyloinozytolu bez udziału kwasu fosfatydowego, jako stadium pośredniego. W doświadczeniach nad włączaniem w fosfolipidy homogenatu mózgu znakowanego ^{32}P lub ^{14}C fosforanu glicerolu stwierdzono (83), że aktywność właściwa kwasu fosfatydowego była znacznie niższa od aktywności właściwej fosfatydyloinozytolu. Podobne wyniki uzyskali Freinkel (35) w badaniach nad włączaniem ^{32}P -ortofosforanu w fosfolipidy skrawków tarczycy i Pritchard (76) nad wbudowywaniem znakowanego ^{14}C glicerolu w fosfolipidy skrawków mózgu.

Powstawanie kardiolipiny. Kardiolipina zbudowana jest z trzech cząsteczek glicerolu, dwu reszt kwasu fosforowego i czterech reszt kwasów tłuszczowych (68). Trzy cząsteczki glicerolu powiązane są ze sobą resztami fosforanowymi. Dwie z nich — skrajne związane są z kwasami tłuszczowymi, w trzeciej — środkowej występuje wolna grupa wodorotlenowa.

Przypuszczalny schemat biosyntezy tego fosfolipidu (schemat 2) zaproponował w 1961 roku Kennedy. W 1960 roku Kiyasu, Paulus i Kennedy (57) stwierdzili powstawanie fosfatydyloglicerolu z CDP-dwuglicerydu i fosforanu glicerolu (schemat 1, reakcja XVI). Wydaje się prawdopodobne, że w pierwszym etapie tego procesu powstaje fosforan fosfatydyloglicerolu, który w drugim etapie jest defosforylowany. Drugi etap opisywanej reakcji, katalizowany przez fosfatazę, można zahamować inhibitorami blokującymi grupy —SH enzymu (52). W tych warunkach dochodzi do nagromadzenia fosforanu fosfatydyloglicerolu. Fosfatydyloglicerol stanowi być może związek pośredni w biosyntezie kardiolipiny. Mogłaby ona powstawać np. w reakcji, podob-

nej do XVI między fosfatydyloglicerolem i CDP-dwuglicerydem (52) (schemat 2).

Powstawanie plazmalogenów. Doświadczenia *in vitro* przeprowadzone przez Kiyasu i Kennedy'ego (56) wskazują, że plazmalogeny cholinowy i etanoloaminowy mogą powstawać w reakcjach, analogicznych do reakcji XI i XIII — tworzenia lecytyny i kefaliny, w których zamiast D- α - β -dwuglicerydu bierze udział gliceryd plazmalogenowy*,



Schemat 2. Biosynteza kardiolipiny wg. Kennedy'ego (52)

t.j. w którym jedna reszta kwasu tłuszczowego zastąpiona jest resztą aldehydu tłuszczowego. Ponieważ reakcję przeprowadzono *in vitro*, nie jest wykluczone, że zawarte w preparacie enzymy syntetyzujące lecytynę i kefalinę nie są wybiórczo specyficzne dla α , β -dwuglicerydu i dlatego mógł on być zastąpiony wprowadzonym do układu glicerydem plazmalogenowym, nawet gdyby ten ostatni nie był intermediatem w procesie biosyntezy *in vivo*. Wydaje się jednak, że glicerydy plazmalogenowe występują *in vivo* i stanowią związki pośrednie między fosfolipidowymi plazmalogenami i znalezionymi ostatnio przez Karnowsky'ego i współpracowników obojętnymi plazmalogenami — odpowiednikami trójglicerydów (49).

Udział nukleotydów cytydynowych w powstawaniu plazmalogenów wykazali również Gambala i Monty (36).

Jak wykazali Schmid i współpracownicy (80) *turn-over* fosfolipidów i fosfolipidowych plazmalogenów w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym jest praktycznie identyczny.

3. Wyróżnienie głównych typów reakcji

Uwzględniając rodzaj prekursora fosforanowego i udział CTP reakcje biosyntezy fosfolipidów, zestawione w schemacie 1 można podzielić na cztery typy:

- 1) prekursor: ATP, transfosforylacja — powstawanie kwasów: fosfatydowego i monoacylofosfatydowego (43) bez udziału CTP;
- 2) prekursor: α -fosforan glicerolu — powstawanie kwasu fosfatydowego bez udziału CTP;
- 3) prekursor: kwas fosfatydowy — powstawanie fosfatydyloinozytolu i fosfatydyloglicerolu z udziałem CTP poprzez związek pośredni — CDP-dwugliceryd;

* Przyjmuje się, że połączenie aldehydu tłuszczowego z grupą —OH glicerolu odpowiada strukturze α , β -nienasyconego eteru (37).

4) prekursor: fosforan choliny, fosforan etanoloaminy — powstawanie lecytyny, kefaliny i sfingomieliny z udziałem CTP poprzez związki pośrednie CDPChol i CDPEt.

W reakcjach typu 3 CTP aktywuje substrat lipidowy, w reakcjach typu 4 — nielipidowy.

Ta dwojakość mechanizmu aktywacji uwidacznia się w szybkości odnowy fosfolipidów w warunkach *in vivo* i *in vitro* (23, 29, 33, 79). Fosfolipidy, których biosynteza zachodzi w reakcjach typu 1 — 3 wykazują dużą szybkość odnowy. Zbliżone wartości aktywności właściwej kwasu fosfatydowego i fosfatydyloinozytolu w badaniach nad włączaniem ^{32}P wskazują nie tylko na łączność tych związków, lecz również na łatwość aktywacji kwasu fosfatydowego z udziałem CTP.

Natomiast fosfolipidy, których powstanie związane jest z aktywacją składnika nielipidowego, to jest wytwarzaniem CDPChol i CDPEt cechują się niską szybkością odnowy *in vivo* i *in vitro*. Szybkości odnowy lecytyny, kefaliny i sfingomieliny różnią się między sobą, lecz wszystkie są znacznie niższe od wartości znajdujących dla fosfatydyloinozytolu i kwasu fosfatydowego.

Wydaje się, że reakcje przedstawione w schemacie 1 stanowią główne źródło powstawania fosfolipidów w organizmach żywych. We wszystkich, poza reakcją IV — powstawania kwasu fosfatydowego z ATP i dwuglicerydu, synteza fosfolipidów zachodzi *de novo*. Możliwe jednak, że nie tylko dwu- ale i monoglicerydy powstałe pod działaniem lipazy biorą udział w biosyntezie fosfolipidów (43).

Przebieg reakcji zależy od obecności jonów nieorganicznych. Jony te w stężeniach odpowiadających ilościom występującym w tkankach mogą hamować lub przyspieszać biosyntezę fosfolipidów *in vitro*. Jony magnezu i manganu aktywują niemal wszystkie reakcje biosyntezy fosfolipidów, podczas gdy wapń działa na nie hamująco. W niektórych reakcjach jon manganowy jest jedynym kationem aktywującym. Ważne znaczenie dla przemiany fosfolipidowej ma jon magnezowy, hamujący działanie fosfatazy kwasu fosfatydowego. Zahamowanie tej reakcji może spowodować nagromadzenie kwasu fosfatydowego i spadek ilości dwuglicerydów (1). Stan taki wzmaga natężenie biosyntezy fosfatydyloinozytolu i kardiolipiny, a hamuje biosyntezę lecytyny, kefaliny i trójglicerydów.

II. Inne aspekty biosyntezy fosfolipidów

1. Udział glicerydów

Przemiana fosfolipidów związana jest z przemianą trójglicerydów — elementem łączącym obie jest udział kwasu fosfatydowego (63). Powstały przez defosforylację kwasu fosfatydowego D- α,β -dwugliceryd

może wchodzić w reakcję z CDPChol i CDPet tworząc lecytynę i kefalinę, lub reagować z acylo-CoA — tworząc trójgliceryd (63, 91). O przejściu dwuglicerydu w fosfolipid czy trójgliceryd decyduje jego skład acylowy.

Kwasy fosfatydowe, CDP-dwuglicerydy i D- α,β -dwuglicerydy są grupami związków, zawierających kwasy tłuszczowe o różnej długości łańcucha i różnym stopniu nienasyceń. Ich drogi metaboliczne uzależnione są od ich składu acylowego, warunkującego większe lub mniejsze powinowactwo do enzymu, katalizującego daną przemianę. I tak na przykład: drogi metaboliczne kwasów fosfatydowych zależne są od specyficzności enzymów katalizujących reakcje VI, X i XIV (schemat 1).

Również i rodzaj powstającego fosfolipidu wydaje się być w pewnej mierze zależny od składu acylowego wchodzącego w reakcję dwuglicerydu.

W ten sposób z jednej puli kwasu fosfatydowego powstają lipidy zawierające charakterystyczne dla danej grupy kwasy tłuszczowe (78).

Bezpośrednie badania nad powinowactwem enzymów do lipidowych substratów o różnym składzie acylowym są utrudnione z powodu konieczności emulgowania badanych lipidów, aby umożliwić ich kontakt z cząsteczką enzymu. Różnice w natężeniu reakcji mogą wówczas zależeć od stopnia zemulgowania substratu i ilości emulgatora. Większe stężenia emulgatora w środowisku reakcji wpływają hamująco na aktywność enzymu.

O pewnych różnicach w powinowactwie enzymów syntetyzujących fosfolipidy do substratów o różnym składzie acylowym mogą świadczyć wyniki badań przeprowadzonych przez Collinsa (25) oraz Harrisa i Robinsona (38) nad szybkością obrotu lecytyn *in vivo*. Po podaniu szczerom ^{32}P -ortofosforanu wydzielono z wątroby szereg radioaktywnych lecytyn, różniących się między sobą składem acylowym. Rozdzielono je metodą rozdziału przeciwprądowego lub chromatografii na kwasie krzemowym. Oznaczenie radioaktywności wykazało różną szybkość wbudowywania izotopu w poszczególne frakcje lecytyn. Inny wynik uzyskano na materiale owadzi. U motyli *Arcita caia* (23) różne frakcje lecytyny uzyskane metodą chromatografii na kwasie krzemowym wykazywały zbliżoną szybkość wbudowywania ^{32}P .

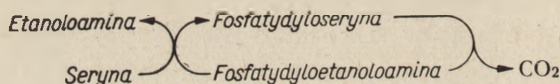
2. Wymiana składników fosfolipidowych

W schemacie 1 nie podano reakcji powstawania fosfatydyloseryny. Wydaje się, że istnieje więcej niż jedna droga biosyntezy tego fosfolipidu. Są w literaturze dane o wbudowywaniu *in vivo* fosforanu seryny w fosfatydyloserynę prawdopodobnie drogą podobną do drogi biosyntezy lecytyny i kefaliny (59, 60). Za tym przypuszczeniem przemawia również zbliżona do stwierdzonej dla kefaliny i lecytyny szybkość włącza-

nia ^{32}P w fosfatydyloserynę *in vivo* po podaniu znakowanego ^{32}P -orto-fosforanu (23, 79). Fosforan seryny występuje w tkankach (69, 75). Powstaje on w reakcji transaminacji z kwasu fosfohydroksypirogronowego (47). Jest szybko rozkładany przez specyficzną fosfatazę (12, 22). Nie udało się wykazać w tkankach obecności kinazy działającej na serynę analogicznie jak enzym Wittenberga i Kornberga (95) w przypadku cholinyl i etanoloaminy.

Włączenie *in vitro* w fosfolipidy wolnej nieufosforylowanej 1,2- ^{14}C -seryny, wykazali Hübscher, Dils i Pover (46); stwierdzili oni również, że reakcję tę stymulowały nukleotydy cytydynowe. Różnice w stopniu stymulacji powodowanym przez różne nukleotydy cytydynowe były podobne do stwierdzonych w badaniu włączenia ^3H -inozytolu (1). W obu przypadkach efekt stymulujący CMP był wyższy niż CTP. Jednak badania Paulusa i Kennedy'ego (73) wykazały, że preparat enzymatyczny katalizujący reakcję CDP-dwuglicerydu z inozytolem, nie katalizuje reakcji z seryną.

Ostatnie doświadczenia z pracami Kennedy'ego (13, 52) oraz Wilsona i współpracowników (93) wskazują, że fosfatydyloseryna powstaje w reakcji fosfatydyloetanoloaminy z wolną seryną. Reakcja ta jest częścią złożonego procesu prowadzącego do dekarboksylacji seryny (schemat 3). W procesie tym fosfatydyloetanoloamina i fosfatydyloseryna odgrywają rolę związków pośrednich.



Schemat 3. Biosynteza fosfatydyloseryny

Dotychczas przyjmowano, że dekarboksylacji w organizmie ulega wolna seryna; Kometiani i Tkeszelaszwili wysuwali możliwość dekarboksylacji fosforanu seryny z wytworzeniem fosforanu etanoloaminy (59).

Wyniki doświadczeń Kennedy'ego i współpracowników (13, 52) wskazują, że reakcja ta przebiega inaczej.

Uogólniając reakcję podaną na schemacie 3 można przypuścić, że jedną z dróg biosyntezy fosfolipidów jest wymiana jednego składnika bez konieczności syntezy *de novo* całej cząsteczki. Przypuszczenie to okazało się słuszne. Dils i Hübscher (34) stwierdzili włączenie w fosfolipidy wolnej nieufosforylowanej cholinyl.

Arto m i współpracownicy (4, 5, 6) wykazali, że preparaty enzymatyczne uzyskane z wątroby szczura katalizują wymianę etanoloaminy w fosfatydyloetanoloaminie nie tylko na serynę lecz i na inne składniki: cholinę, dwumetyloetanoloaminę i monometyloetanoloaminę.

Systemy katalizujące przemianę jednych fosfolipidów w inne występują w innych fragmentach komórek niż systemy biosyntetyzujące

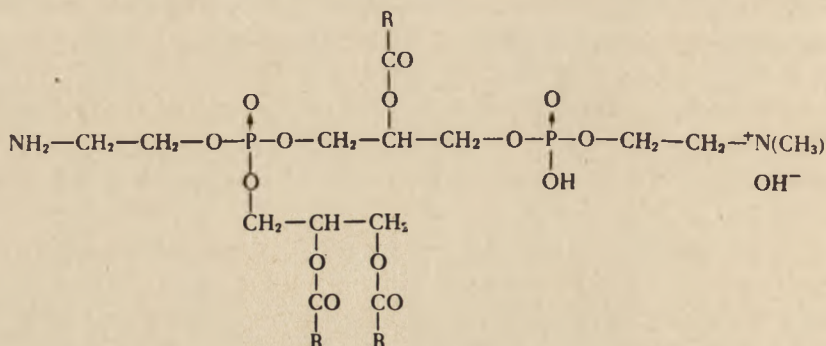
fosfolipidy *de novo*. Enzymy katalizujące reakcje wymiany obecne są we frakcji supernatantu homogenatów po odwirowaniu mitochondriów i mikrosomów, podczas gdy systemy biosyntetyzujące fosfolipidy *de novo* z CDPChol, CDPEt i CDP-dwuglicerydu — zlokalizowane głównie we frakcji mitochondriów i mikrosomów. Stymulacja reakcji wymiany przez nukleotydy cytydynowe nie jest specyficzna, inne nukleotydy wywierają podobny efekt. Optimum *pH* działania enzymów wymiany wynosi 9—10, natomiast systemy biosyntezyjące *de novo* działają najlepiej w *pH* 7—8. Jon wapniowy, który hamuje biosyntezę fosfolipidów *de novo*, stymuluje reakcję wymiany.

W 1959 roku Bremer i Greenberg (15, 16) wykazali istnienie innej od opisanej przez Kennedy'ego i Weissa (droga XIII, schemat 1) drogi biosyntezy lecytyny. Polega ona na metylowaniu kefaliny. Po wstrzyknięciu szczurom metioniny znakowanej w grupie metylowej [(Me-¹⁴C)-metioniny] autorzy ci stwierdzili znaczne wbudowywanie izotopu w lecytynę wątrobową. Maksimum tego włączania obserwowano po 40 min. od zastrzyku znakowanej metioniny. Po hydrolizie fosfolipidów odnaleziono radioaktywność w cząsteczce choliny. W procesie wbudowania grupy metylowej w lecytynę nie bierze udziału cytydynodwufosfocholina, bowiem maksimum radioaktywności tego związku obserwowano dopiero po upływie 1—2 godzin po osiągnięciu szczytu włączania w lecytynę. Na krótko po iniekcji (Me-¹⁴C)-metioniny stwierdzono w ekstrakcie lipidowym obok lecytyny również obecność radioaktywnych fosfolipidów zawierających monometyloetanoloaminę i dwumetyloetanoloaminę. Prawdopodobnie fosfatydylomonometyloetanoloamina i fosfatydylodwumetyloetanoloamina są związkami pośrednimi w procesie powstawania lecytyny poprzez metylowanie kefaliny. Podobne wyniki uzyskano badając biosyntezę lecytyny w mózgu (3).

Na możliwość istnienia opisanej wyżej drogi biosyntezy lecytyny wskazywały dawniejsze doświadczenia. Popjak i Muir (74) stwierdzili powstawanie znakowanej lecytyny z ³²P-kefaliny w wątrobie szczura *in vivo*, Stekol i współpracownicy (81) — udział metioniny w tym procesie. W doświadczeniach z mutantem *Neurospora crassa* wymagającym dostarczenia choliny dla optymalnego wzrostu Wolf i Nyc (96) obserwowali nagromadzenie fosfolipidów zawierających monometyloaminoetanol i dwumetyloaminoetanol w czasie wzrostu na podłożu nie zawierającym choliny.

Lecytyna może powstawać również, jak wykazał Lands (65) z lizolecytyny w reakcji z cząsteczką acylokoenzymu A, droga ta nie może mieć jednak większego znaczenia. Nie jest pewne, czy jak to stwierdzało szereg autorów m.in. Marinetti i współpracownicy (66) lizolecytyny występują rzeczywiście w tkankach *in vivo*.

Według Collinsa (26) lizolecytyny powstają z innych złożonych fosfolipidów, w których grupa fosforanowa tworzy połączenie trój-estrowe jak na podanym wzorze.



Według Dawsona (30, 32) w trakcie procesu katabolizmu lecytyny *via* lizolecytyna, glicerylofosforylocholina, fosfoglicerol + cholina, do nagromadzenia lizolecytyny w tkankach nie dochodzi. Z glicerylofosforylocholiną natomiast, która w tkankach występuje, nie udało się stwierdzić syntezy lecytyny (94).

Jak widać z podanego przeglądu główną drogą biosyntezy fosfolipidów jest synteza *de novo* przy udziale nukleotydów cytydynowych. Tym niemniej nie są wykluczone i inne drogi biosyntezy, a przede wszystkim przemiana jednych fosfolipidów w inne.

LITERATURA

1. Agranoff B. W., Bradley R. M., Brady R. J., *J. Biol. Chem.* **233**, 1077 (1958).
2. Ansell G. B., Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **50**, 241 (1952).
3. Ansell G. B., Spanner S., V International Congress of Biochemistry, abstracts of communications, str. 534, Moskwa 1961.
4. Artom C., *Fed. Proc.* **19**, 233 (1960).
5. Artom C., Lofland H. B., Jr, V International Congress of Biochemistry, abstracts of communications, str. 99, Moskwa 1961.
6. Artom C., Lofland H. B., Oates J. A., Jr, *J. Biol. Chem.* **233**, 833 (1958).
7. Baranowski T., *J. Biol. Chem.* **180**, 535 (1949).
8. Benson A. A., Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry. VI. Mechanism of Photosynthesis. Preprint No 66, Moskwa 1961.
9. Beveridge J. M. R., *Canad. J. Biochem. Physiol.* **34**, 361 (1956).
10. Biran L. A., Bartley W., *Biochem. J.* **79**, 159 (1961).
11. Borkenhagen L. F., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **227**, 951 (1957).
12. Borkenhagen L. F., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **234**, 849 (1959).
13. Borkenhagen L. F., Kennedy E. P., Fielding L., *J. Biol. Chem.* **236**, PC 28 (1961).
14. Bradbeer C., Stumpf P. K., *J. Lipid Res.* **1**, 214 (1960).
15. Bremer J., Greenberg D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 287 (1959).

16. Bremer J., Greenberg D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 205 (1961).
17. Bublitz C., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **211**, 951 (1954).
18. Bublitz C., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **211**, 963 (1954).
19. Buell G. C., Reiser R., *J. Biol. Chem.* **234**, 217 (1959).
20. Carter H. E., Glick F. J., Norris W. P., Phillips G. E., Harris R., *J. Biol. Chem.* **170**, 296 (1947).
21. Chojnacki T., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 167 (1961).
22. Chojnacki T., Korzybski T., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 111 (1961).
23. Chojnacki T., Korzybski T., (w przygotowaniu do druku).
24. Chojnacki T., Piechowska M. J., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 157 (1961).
25. Collins F. D., *Nature* **186**, 366 (1960).
26. Collins F. D., *Nature* **188**, 297 (1960).
27. Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **59**, 5 (1955).
28. Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **60**, 325 (1955).
29. Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **61**, 552 (1955).
30. Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **62**, 689 (1956).
31. Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **62**, 693 (1956).
32. Dawson R. M. C., *Biochem. J.* **64**, 192 (1956).
33. Dawson R. M. C., *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 374 (1954).
34. Dils R. P., Hübscher G., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 293 (1959).
35. Freinkel N., *Biochem. J.* **68**, 327 (1958).
36. Gambal G., Monty K. J., *Fed. Proc.* **18**, 232 (1959).
37. Hanahan D. J., in *Lipide Chemistry* (editor: D. J. Hanahan), p. 94, Wiley, New York 1960.
38. Harris P. M., Robinson D. S., *Nature* **188**, 742 (1960).
39. Heller J., Chojnacki T., Piechowska M. J., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 187 (1960).
40. Herbert E., Potter V. R., *J. Biol. Chem.* **222**, 453 (1956).
41. Hoagland M. B., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 188 (1955).
42. Hokin L. E., Hokin M. R., *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 285 (1959).
43. Hokin L. E., Hokin M. R., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 176 (1960).
44. Hokin L. E., Hokin M. R., *J. Biol. Chem.* **234**, 1381 (1959).
45. Hokin L. E., Hokin M. R., *J. Biol. Chem.* **234**, 1387 (1959).
46. Hübscher G., Dils R. P., Pover W. F. R., *Nature* **182**, 1806 (1958).
47. Ichihara A., Greenberg D. M., *J. Biol. Chem.* **234**, 331 (1957).
48. Johnston J. M., Bearden J. H., *Fed. Proc.* **19**, 230 (1960).
49. Karnovsky M. L., Gilbertson J., Eichberg J., V International Congress of Biochemistry, abstracts of communications, str. 539, Moskwa 1960.
50. Kennedy E. P., *Ann. Rev. Biochem.* **26**, 119 (1957).
51. Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **201**, 399 (1953).
52. Kennedy E. P., Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry. VII. Biosynthesis of Lipids. Preprint No 166, Moskwa 1961.
53. Kennedy E. P., Borkenhagen L. F., Wagner-Smith S., *J. Biol. Chem.* **234**, 1998 (1959).
54. Kennedy E. P., Weiss S. B., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 250 (1955).
55. Kennedy E. P., Weiss S. B., *J. Biol. Chem.* **222**, 193 (1956).
56. Kiyasu J. Y., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **235**, 2590 (1960).
57. Kiyasu J. Y., Paulus H., Kennedy E. P., *Fed. Proc.* **19**, 233 (1960). (1960).
58. Kometiani P. A., *Biochimia* **17**, 108 (1952).
59. Kometiani P. A., Tkeszelaszwili L. K., *Ukr. Biochim. Żurn.* **31**, 913 (1959).

60. Kometiani P. A., Tkeszelaszwili L. K., Ovsjanko T. A., Proceedings of the 2-nd United Nations International Conference of the Peaceful Uses of Atomic Energy, Geneva, **25**, 165 (1958).
61. Kornberg A., *J. Biol. Chem.* **182**, 779 (1950).
62. Kornberg A., Pricer W. F., Jr, *Fed. Proc.* **11**, 242 (1952).
63. Kornberg A., Pricer W. F., Jr, *J. Biol. Chem.* **204**, 329 (1953).
64. Kornberg A., Pricer W. F., Jr, *J. Biol. Chem.* **204**, 345 (1953).
65. Lands W. F. M., *J. Biol. Chem.* **235**, 2233 (1960).
66. Marinetti G. V., Witter R. F., Stotz E., *J. Biol. Chem.* **226**, 475 (1957).
67. MacFarlane M. G., Gray G. M., Wheeldon L. W., *Biochem. J.* **74**, 43 P (1960).
68. MacFarlane M. G., Wheeldon L. W., *Nature* **183**, 1808 (1959).
69. Miani N., *Experientia* **14**, 34 (1958).
70. Munch-Petersen A., Kalckar H. M., Cutolo E., Smith E. E. B., *Nature* **172**, 1036 (1953).
71. Paulus H., Kennedy E. P., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6689 (1959).
72. Paulus H., Kennedy E. P., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 4436 (1959).
73. Paulus H., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **235**, 1303 (1960).
74. Popjak G., Muir H., *Biochem. J.*, **46**, 103 (1949).
75. Porcelatti G., *J. Neurochem.* **2**, 128 (1958).
76. Pritchard E. T., *Canad. J. Biochem. Physiol.* **36**, 1211 (1958).
77. Potter R. L., Buettner-Janusch V., *J. Biol. Chem.* **233**, 462 (1958).
78. Rossiter R. J., Strickland K. P., in *Lipid Metabolism* (editor K. Bloch), p. 92, Wiley, New York, 1960.
79. Sakagawa T., Shimojo T., *J. Biochem. (Tokio)*, **46**, 51 (1959).
80. Schmidt G., Fingerman L., Spencer W. A., Thannhauser S. J., *Fed. Proc.* **18**, 318 (1959).
81. Stekol J. A., Weiss S., P-T Hsu, Smith P., *Fed. Proc.* **12**, 274 (1953).
82. Strickland K. P., Benson A. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 344 (1960).
83. Strickland K. P., Thompson W., Subrahmanyam D., Rossiter R. J., *Biochem. J.*, **76**, 41 P (1960).
84. Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 1523 (1959).
85. Sugino Y., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5074 (1957).
86. Srieбney M., Kennedy E. P., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5325 (1957).
87. Srieбney M., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **233**, 1315 (1958).
88. Thompson W., Strickland K. P., Rossiter R. J., *Fed. Proc.* **18**, 328 (1959).
89. Thompson W., Subrahmanyam D., Strickland K. P., *Fed. Proc.* **19**, 234 (1960).
90. Trusow W. I., *Usp. Sowl. Biol.* **45**, 28 (1958).
91. Weiss S. B., Kennedy E. P., Kiyasu J. Y., *J. Biol. Chem.* **235**, 40 (1960).
92. Weiss S. B., Smith S., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **231**, 53 (1958).
93. Wilson J. D., Gibson K. D., Udenfriend S., *J. Biol. Chem.* **235**, (1960). (1960).
94. Williams-Ashman H. G., Banks J., *J. Biol. Chem.* **223**, 509 (1956).
95. Wittenberg J., Kornberg A., *J. Biol. Chem.* **202**, 431 (1953).
96. Wolf B., Nyc J. F., *J. Biol. Chem.* **234**, 1068 (1959).

PRACE DOKTORSKIE

MARIA DYDYŃSKA

**Zmiany w fizjologicznych i biochemicznych właściwościach mięśni i serca
żaby pod wpływem odwadniania i uwadniania**

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii
Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN

Promotor: prof. dr Włodzimierz NIEMIERKO

Uchwała Rady Naukowej Instytutu, nadająca stopień *doktora nauk przyrodniczych*
z dn. 12 listopada 1960 r.

W pracy przedstawiono przebieg i wyniki badań nad zmianami zawartości związków fosforowych oraz zmianami niektórych właściwości fizjologicznych mięśni krawieckich i serca żaby, poddawanych odwadnianiu i następnie uwadnianym w płynie Ringera.

Odwodnienie prowadzono w temp. + 2°, w zamkniętym układzie, w którym cyrkulowało powietrze osuszane za pomocą żelu krzemowego. Całkowita utrata wody (100%) następowała po około 10 godzinach. Zawartość w mięśniach ortofosforanu (P), fosfokreatyny (CP) i kwasu adenozyntrójfosforowego (ATP) pozostawała w tych warunkach niemal bez zmian.

Pobudliwość mięśni i automatyzm skurczu serca nie zanikały aż do utraty około 70% początkowej zawartości wody. Większy stopień wysuszenia mięśnia powodował nieodwracalne znikanie pobudliwości, mięsień zaś taki po umieszczeniu w płynie Ringera powoli spontanicznie „kurczył się”. „Skurczowi” temu towarzyszyły: defosforylacja CP i ATP, nagromadzenie się P, oraz dezaminacja nukleotydów adenilowych. Powstające produkty reakcji pojawiły się w płynie Ringera.

Im wyższa była początkowa zawartość ATP w odwadnianym mięśniu, tym wyższy był stopień spontanicznego „skurczu” obserwowanego w czasie ponownego uwadniania. Jeżeli przed wysuszeniem mięsień był pozbawiony ATP, spontaniczny „skurcz” zachodził dopiero wówczas, gdy do płynu Ringera dodawano ATP.

Uzyskane wyniki wskazują na to, że utrata przez mięsień ponad 70% początkowej zawartości wody wywołuje nieodwracalne zmiany strukturalne tkanki mięśniowej. Jednym ze skutków tych jest spontaniczny „skurcz” mięśnia obserwowany w czasie ponownego uwodnienia, „Skurcz” ten zachodzi jednak wyłącznie w obecności pewnej określonej ilości ATP.

Wyniki badań zostały częściowo opublikowane w *Bull. Acad. Polon. Sci, ser. sci. biol.* 9, 57 (1961).

JERZY PIOTROWSKI

Niektóre zagadnienia metabolizmu aniliny z punktu widzenia ilościowej oceny wchłaniania tego związku przez robotników w przemyśle

Pracę wykonano w Zakładzie Toksykologii Przemysłowej Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi

Promotor: prof. dr B. FILIPOWICZ

Uchwała Rady Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Łódzkiego
o nadaniu stopnia *doktora nauk przyrodniczych* z dnia 30. 12. 1960

Głównym celem pracy było opracowanie ilościowego wskaźnika wchłaniania aniliny u ludzi, narażonych na ten związek w przemyśle. Po przeprowadzeniu badań wstępnych, w których zbadano przydatność trzech różnych wskaźników biochemicznych, wybrano oznaczanie wydalania głównego metabolitu aniliny, *p*-aminofenolu w moczu. Oznaczenia wykonano własną modyfikacją metody indofenolowej.

W celu uzyskania podstaw do ilościowej interpretacji tych oznaczeń przeprowadzono doświadczenia na ludziach, którym podawano anilinę naskórną w sposób umożliwiający ustalenie ilości wchłoniętej.

Określono szybkość wchłaniania ciekłej aniliny przez skórę ludzi w zależności od temperatury skóry i jej zwilżenia.

Stwierdzono, że u ludzi anilina ulega przemianie do *p*-aminofenolu z wydajnością wzrastającą z wielkością dawki, w granicach od około 20 do 50% ilości podanej. Wydalanie tego metabolitu jest stosunkowo szybkim procesem I rzędu, którego półokres wynosi około 3 — 4 godzin. W związku z tym przy codziennym powtarzaniu ekspozycji na anilinę nie zachodzi jej kumulacja w ustroju.

Między wchłanianymi dawkami aniliny a wydalaniem *p*-aminofenolu w moczu zachodzi bardzo wysoka korelacja, co pozwoliło na opracowanie ilościowego wskaźnika wchłaniania. Wskaźnik ten oparto na określaniu szybkości wydalania *p*-aminofenolu w moczu bezpośrednio po zakończeniu narażenia. Dokładność wnioskowania o ilości wchłoniętej aniliny — około ± 10 mg. W przeprowadzonych doświadczeniach nie stwierdzono wydalania niezmienionej aniliny w powietrzu wydechowym.

Dla uzyskania pełnego obrazu przemiany niskich dawek aniliny przeprowadzono badania na królikach, w których zastosowano m. in. metodę rozcieńczeń izotopowych przy podawaniu ^{14}C -aniliny. Stwierdzono, że u królików przy niskiej dawce aniliny (0,1 — 5 mg/kg) *p*-aminofenol powstaje z dużą wydajnością (75—80%). Przy odzyskaniu około 90% dawki podanej stwierdzono poza tym: *o*-aminofenol 6,7%, *m*-aminofenol — 0,8%, niezmieniona anilina — 0,6%. W powietrzu wydechowym nie stwierdzono wydalania $^{14}\text{CO}_2$, co wskazuje że nie zachodziła w poważniejszym stopniu destrukcja pierścienia aromatycznego.

Przy podwyższeniu dawek aniliny spada wydajność przemiany do *p*-aminofenolu, natomiast często obserwuje się zwiększone wydalanie niezmienionej aniliny.

Części pracy były publikowane w: *Medycyna Pracy* Nr. 4, 1954, *J. Hyg. Epid.* Nr. 1, 1957, ostatnia część ukaże się w *Medycynie Pracy* Nr. 5, 1961.

MARIA SARNECKA-KELLER

Struktura peptydowa kwasów proteinowych

Pracę wykonano w Zakładzie Chemii Fizjologicznej AM w Krakowie

Promotor: prof. dr Bolesław SKARŻYŃSKI

Uchwała Rady Wydziału Matematyczno-Fizyczno-Chemicznego nadająca stopień *doktora nauk przyrodniczych* z dnia 23. 2. 1961 r.

Kwasy proteinowe wyizolowane po raz pierwszy w 1897 roku przez Bądzynskiego i Gottlieba były dotychczas traktowane w piśmiennictwie biochemicznym jako mieszanina związków azotowych o nieokreślonej bliżej strukturze chemicznej. Liczne prace, pochodzące z okresu 1897—1937 nie doprowadziły do bliższego scharakteryzowania mieszaniny kwasów proteinowych, jedynie niektóre z nich zawierały przypuszczenie, że w skład tej mieszaniny wchodzi peptydy.

Badania nad kwasami proteinowymi podjęto celem ostatecznego wyjaśnienia ich natury chemicznej oraz spodziewając się znaleźć w mieszaninie analizowanej wydzielane przez ustrój polipeptydy, będące związkami dotychczas prawie zupełnie niezbadanymi.

Do otrzymywania kwasów proteinowych z moczu zastosowano klasyczną metodę Bądzynskiego i współpracowników, a do ich ilościowego oznaczania — równoległe metodę Kjeldahla i metodę biuretową, Mieszaninę kwasów proteinowych rozdzielono na cztery frakcje przy użyciu elektroforezy wysokonapięciowej, a następnie każdą z frakcji elektroforetycznych poddano chromatografii bibułowej.

Stwierdzono, że klasyczna metoda Bądzynskiego otrzymywania kwasów proteinowych prowadzi do wyizolowania z moczu pewnej frakcji peptydów, posiadającej ogólne własności chemiczne zgodne z własnościami opisywanymi przez dawnych autorów. Mieszaniny kwasów proteinowych, wyizolowane z kilku moczy prawidłowych wykazały powtarzalność składu jakościowego zawartych w nich peptydów. Stwierdzono, że w moczach prawidłowych przypada na azot kw. proteinowych 0,68—1,27% N całkowitego moczu. Peptydy zawarte w mieszaninie kwasów proteinowych stanowią 16,1—20,9% ogółu związków występujących w moczu i reagujących z odczynnikiem biuretowym. Kwasy proteinowe otrzymane z moczy patologicznych wykazały w porównaniu do moczy normalnych ilościowe różnice w zawartości azotu i peptydów.

Zastosowanie elektroforezy wysokonapięciowej i chromatografii bibułowej pozwoliło na wyizolowanie z mieszaniny kwasów proteinowych 22 związków barwiących się ninhydriną i izatyną, 14 z nich zidentyfikowano jako peptydy, i określono ich skład aminokwasowy. Wydzielone peptydy charakteryzują się dużą zawartością alaniny, glicyny, histydyny, kw. glutaminowego, kw. asparaginowego i proliny. Jeden z peptydów zbudowany jest prawie że wyłącznie z histydyny drugi głównie z lizyny. W ośmiu peptydach oznaczono N- i C-końcowe aminokwasy. Do oznaczenia C-końcowych aminokwasów stosowano metodę hydrazynolizy Shiro Akabori i współpracowników, zaś N-końcowych — metodę Edmana w modyfikacji Sjoquista. Stwierdzono, że najczęstszym N-końcowym aminokwasem w zbadanych peptydach jest glicyna. Dwie peptydy zbudowane prawie wyłącznie z aminokwasów zasadowych nie posiadają wolnej końcowej grupy aminowej. Niektóre peptydy wydają się być powiązane z komponentem cukrowym.

Praca zostanie opublikowana w *Acta Biochim. Polon.*

ZDZISŁAW SZAFRAN

Enzymy proteolityczne soku trzustkowego i soku jelitowego psa

Pracę wykonano w Zakładzie Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej
w Krakowie

Promotor: Prof. Dr Bolesław SKARŻYŃSKI

Uchwała Rady Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego
nadająca stopień *doktora nauk przyrodniczych* z dnia 23 lutego 1961 r.

Celem pracy była identyfikacja enzymów wchodzących w skład aktywności proteolitycznej soku trzustkowego i soku jelitowego psa. Występowanie tego typu enzymów w sokach trawiennych nie było dotychczas szczegółowiej analizowane mimo licznych badań nad oczyszczonymi enzymami proteolitycznymi trzustki i innych tkanek zwierzęcych. Spośród niewielu opublikowanych w ciągu ostatniego dziesięciolecia prac dotyczących składu enzymatycznego soków trawiennych, tylko jedna, której autorami są badacze amerykańscy — Keller, Cohen i Neurath, przedstawia dokładne badania zawartości enzymów proteolitycznych w soku trzustkowym wołu. Odnośnie soku trzustkowego psa nie opublikowano do tego czasu żadnego tego typu szczegółowych badań, jak również nie badano dokładnie enzymów proteolitycznych soku jelitowego. W tym świetle podjęcie przedstawionego zagadnienia wydało się celowe i interesujące.

Sok trzustkowy użyty do badań pochodził z przetok trzustkowych ostrych lub przewlekłych według Thomasa, sok jelitowy z przetok Thiry-Vella wykonanych u psów. Identyfikację enzymów proteolitycznych w soku trzustkowym i jelitowym przeprowadzono przy zastosowaniu szeregu różnych substratów specyficznych dla poszczególnych enzymów oraz na podstawie rozdziału enzymów za pomocą elektroforezy w ośrodku agarowym zawierającym *Hyflo super-cel*. Stosowanymi substratami były różne białka, peptydy i estry aminokwasów. Oznaczenia aktywności enzymatycznej przeprowadzono mierząc szybkość hydrolizy substratów w czasie inkubacji z enzymem w środowisku zbuforowanym w temperaturze 37°. Ilość produktów trawienia lub nierozłożonych substratów oznaczano po określonym czasie trawienia, stosując odpowiednie metody analityczne, najczęściej kolorymetryczne. W niektórych przypadkach produkty trawienia rozdzielano chromatograficznie na bibule i właściwy składnik oznaczano po wyeluowaniu z chromatogramu.

Na podstawie wyników rozdziału elektroforetycznego, różnic w szybkości hydrolizy poszczególnych substratów działania czynników aktywujących i innych własności stwierdzono, że w soku trzustkowym psa występuje co najmniej sześć enzymów proteolitycznych, a mianowicie: trypsynogen, chymotrypsynogen, elastaza, karboksypeptydaza A, karboksypeptydaza B (protaminaza) i endopeptydaza (której nie udało się zidentyfikować). W soku jelitowym nie występuje, poza enterokinazą, żaden enzym z grupy endopeptydaz, natomiast znajduje się tam aminopeptydaza leucynowa, aminotrójpeptydaza, dwupeptydaza glicylo-glicyny oraz prawdopodobnie kilka innych enzymów rozkładających dwupeptydy.

ANTONINA GRYSZKIEWICZ

Otrzymywanie amylazy osocza ludzkiego i niektóre jej właściwości

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Instytutu Hematologii w Warszawie.

Promotor prof. dr Antoni DMOCHOWSKI, Łódź

Uchwała Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego nadająca stopień *doktora nauk przyrodniczych* z dnia 16 maja 1961 roku

Zastosowano dwie metody izolowania amylazy z osocza ludzkiego. Jedna z nich polegała na frakcjonowaniu osocza etanolem, druga — na selektywnej adsorpcji amylazy za pomocą skrobi. Frakcjonowanie etanolem pozwala otrzymać preparat o aktywności właściwej około 0,08 mg maltozy/min/mg enzymu przy średniej wydajności 26%. Selektowna adsorpcja dawała preparaty o aktywności 1,7—3,3 mg maltozy/min/mg enzymu ze średnią wydajnością 20%. Dwukrotne chromatografowanie na kolumnie skrobiono-celitowej preparatów otrzymanych powyższymi metodami podnosiło aktywność właściwą do około 22 mg maltozy/min/mg enzymu. Jest to oczyszczenie około 25000-krotne w stosunku do materiału wyjściowego.

Oczyszczony preparat jest bezbarwnym proszkiem rozpuszczalnym w wodzie, zawierającym 7% azotu. Jego obrazy elektroforetyczne wykazywały jedynie frakcję γ -globulinową. Aktywność właściwa preparatu wynosiła około 15% aktywności amylazy trzustki czy śliny w przeliczeniu na mg azotu, optimum działania przy pH 6,7—7,3 i w temperaturze 40°. Jony chlorkowe aktywowały ten enzym, jony metali dwuwartościowych (Co^{++} , Mg^{++} , Mn^{++}) a w mniejszym stopniu jony metali jednowartościowych (K^+ , Na^+) stabilizowały jego roztwory, natomiast jony metali ciężkich (Zn^{++} , Cu^{++}) — inaktywowały. Powinowactwo do substratu było zależne od stężenia substratu. Stała Michaelisa K_m dla stężeń skrobi 0,5% — 5% wynosiła 0,9 g/l, podczas gdy dla stężeń skrobi 0,001% — 0,01% równała się 0,06 g/l. Energia aktywacji pomiędzy 0° i 40° wynosiła 11600 K.

Preparaty o różnym stopniu oczyszczenia wykazywały jednakowe właściwości enzymatyczne, lecz różniły się stabilnością. Amylaza osocza w miarę oczyszczenia stawała się coraz bardziej wrażliwa na czynniki fizyczne i chemiczne. Obniżało się jej optimum działania temperatury, zawężał się po kwaśnej stronie zakres stabilności pH i łatwo spadała aktywność w rozcieńczonych roztworach wodnych.

Część wyników opublikowano w *Acta Physiol. Polon.* 8, 345 (1957).

HALINA SZAFRAN

Esterazy soku trzustkowego i soku jelitowego psa

Pracę wykonano w Zakładzie Chemii Fizjologicznej AM w Krakowie

Promotor: Prof. Dr Bolesław SKARŻYŃSKI

Uchwała Rady Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Krakowie nadająca tytuł *doktora farmacji* z dnia 30 czerwca 1961 r.

Przedmiotem pracy były enzymy esterolityczne produkowane przez trzustkę, a także błonę śluzową jelita i wydzielane w postaci soku trzustkowego i soku jelitowego do światła jelita.

Występowanie esteraz w sokach trawiennych nie było dotychczas przedmiotem szerszych badań. Jedynym enzymem z tej grupy, którego obecność w soku trzustkowym znana była od dawna, jest lipaza trzustkowa, a w soku jelitowym — zasadowa fosfataza. Wymienione są wprawdzie i inne enzymy z tej grupy występujące w soku trzustkowym i jelitowym, dane te są jednak fragmentaryczne i czasem sprzeczne. Z tego względu ponowne podjęcie tego problemu wydało się celowe.

Badania prowadzone były w dwóch kierunkach. Pierwszym z nich była charakterystyka poszczególnych aktywności esterolitycznych obu soków trawiennych na podstawie rozdziału elektroforetycznego białek oraz zastosowania różnych substratów i inhibitorów pozwalająca na zaliczenie badanych enzymów do ostatnio przyjętych w literaturze typów aktywności esterolitycznej. Drugim kierunkiem było określenie wpływu bodźców wydzielniczych na aktywność esteraz w soku trzustkowym, wpływu położenia odcinków jelita na aktywność esterolityczną soku jelitowego oraz porównanie tych enzymów w obu sokach trawiennych.

Sok trzustkowy otrzymywano z przetok trzustkowych ostrych lub przewlekłych według Thomasa, sok jelitowy z przetok Thiry-Vella założonych u psów. Aktywność enzymatyczną oznaczano bezpośrednio w soku trzustkowym i po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego w eluatach z frakcji białkowych. W doświadczeniach z sokiem jelitowym aktywność enzymatyczną oznaczano tylko bezpośrednio. Stosowanymi substratami były estry kwasów karboksylowych i kwasów nieorganicznych. Z pierwszej grupy przebadano kilka trójglicerydów, estrów alkoholi jednowartościowych i fenoli, z drugiej — estry kwasu fosforowego i siarkowego. Jako inhibitora używano ezeryny i DFP, przebadano również wpływ EDTA oraz niektórych jonów na działanie esteraz kwasów nieorganicznych.

Szybkość hydrolizy trójglicerydów i estrów alkoholi alifatycznych oznaczano metodą miareczkową, hydrolizę pozostałych substratów — przy użyciu metod kolorymetrycznych.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że w soku trzustkowym występuje siedem odrębnych enzymów z grupy esteraz, rozmieszczonych w czterech różnych frakcjach elektroforetycznych. Są to: lipaza trzustkowa, esteraza cholesterolowa, dwie esterazy cholinowe, dwie esterazy niespecyficzne i zasadowa fosfataza. W soku jelitowym stwierdzono obecność arylosulfatazy, zasadowej fosfatazy, esterazy cholinowej oraz esterazy niespecyficznej. Rodzaj bodźca wydzielniczego nie wpływa na rozmieszczenie enzymów we frakcjach elektroforetycznych i z wyjątkiem zasadowej fosfatazy nie wpływa również na zmianę aktywności właściwej enzymów wydzielanych do soku trzustkowego. Aktywność właściwa esteraz w soku jelitowym pochodzącym z różnych odcinków jelita utrzymuje się mniej więcej na tym samym poziomie.

SPRAWOZDANIA I KOMUNIKATY

Międzynarodowa Unia Biochemiczna

W związku z V Międzynarodowym Kongresem Biochemicznym odbyły się w Moskwie: czwarte walne zebranie Międzynarodowej Unii Biochemicznej (*General Assembly of the International Union of Biochemistry*) w dniu 14 sierpnia oraz dwa zebrania Rady Unii w dniach 12 i 16 sierpnia 1961 roku.

Poprzednie walne zebranie i posiedzenie Rady Unii odbyły się w Wiedniu we wrześniu 1958 roku (patrz *Post. Biochem.* 5, 135, 1959).

Walne zebranie Unii

Posiedzenie zagań przewodniczący M. Florkin poświęcając kilka słów pamięci zmarłego członka Rady Unii prof. K. Felix'a.

Sekretarz Unii R. S. H. Thompson przedstawił obszernie sprawozdanie z działalności za przeciąg ostatnich 3 lat. W okresie tym odbyły się trzy sympozja: we wrześniu 1958 r. w Semmering (Austria), organizowane wspólnie z CIOMS (Międzynarodowa Organizacja Nauk Medycznych) sympozjum na temat: „Biochemiczne reakcje na uszkodzenie” (z udziałem 23 osób); we wrześniu 1959 r. w Canberra (Australia) organizowane wspólnie z Australijską Akademią Nauk sympozjum na temat: „Enzymy hematynowe” z udziałem 42 osób; we wrześniu 1960 roku w Sztokholmie (Szwecja), organizowane wspólnie z IUBS (Międzynarodowa Unia Nauk Biologicznych) sympozjum na temat: „Biologiczna struktura i funkcja”, z udziałem 200 osób. Materiały ze wszystkich trzech sympozjów wydano drukiem. Następnie sekretarz Unii omówił działalność Komisji Enzymów, powiadomił o krokach podjętych w kierunku utworzenia Komisji Redaktorów czasopism biochemicznych oraz omówił współpracę Unii Biochemicznej z innymi uniami i organizacjami naukowymi.

Między innymi na czwartym walnym zebraniu CIOMS w Paryżu we wrześniu 1958 zatwierdzone zostało przyjęcie Unii Biochemicznej na członka CIOMS. Powstał też komitet koordynacyjny IUB — z IUPS (Międzynarodowa Unia Nauk Fizjologicznych). W skład tego Komitetu weszli ze strony IUB M. Florkin, R. S. H. Thompson i E. H. Stotz, ze strony IUPS zaś W. O. Fenn, C. Heymans i Sir Lindor Brown. Już pracujący komitet koordynacyjny pomiędzy IUB i IUPAC (Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej) odbył dwa posiedzenia w sierpniu 1959 w Starnberg i we wrześniu 1960 w Cambridge. Wyrazem ścisłej współpracy między IUB a IUBS jest wspólnie zorganizowane sympozjum w Canberra.

Skarbnik Unii E. H. Stotz przedstawił walnemu zebraniu krótkie sprawozdanie z sytuacji finansowej Unii oparte na szerszym materiale, przeznaczonym na posiedzenie Rady Unii.

Walne zebranie zatwierdziło następnie proponowaną przez Biuro Unii zmianę w Statucie. Propozycja ta została uprzednio rozważona i przyjęta przez Narodowe Komitety Biochemiczne. Obecnie pkt. 7 § VII Statutu Unii brzmi: „Rada wy-

znacza spośród swych członków przewodniczącego, skarbnika i sekretarza generalnego. Poprzedni przewodniczący wchodzi również w skład Rady”.

Prof. Florkin powiadomił walne zebranie, że Rada Unii na posiedzeniu odbytym w dniu 12 sierpnia 1961 wybrała na przewodniczącego Unii S. Ochoa a na skarbnika i sekretarza generalnego powtórnie wybrała E. H. Stotza i R. S. H. Thompsona. Na tymże posiedzeniu Rada postanowiła zasięgnąć opinii walnego zebrania w sprawie utworzenia stanowiska v-przewodniczącego Unii. Ponieważ utworzenie takiego stanowiska wiąże się ze zmianą Statutu, zgodnie z przyjętym w Unii zwyczajem walne zgromadzenie zaleciło sekretarzowi rozesłanie Komitetom Narodowym treści proponowanej zmiany, tak by mogły one zająć stanowisko w tej sprawie.

Zgodnie ze statutem walne zebranie powinno dokonać wyboru Rady Unii. W myśl statutu również żaden z członków Rady nie może pełnić swych obowiązków dłużej niż przez 12 lat. Aby zatem utrzymać pewną ciągłość prac Rady, postanowiła ona na zebraniu odbytym w dniu 12.VIII.1961 zalecić walnemu zebraniu reelekcję 13 spośród dotychczasowych oraz wybór 7 nowych członków Rady. Rada podała też nazwiska 7 członków na miejsce których wybrani być mają nowi członkowie; byli to profesorowie: Linderstrom-Lang i Felix, zmarli w czasie trwania kadencji, Akabori i Hammarsten, ustępujący na własną prośbę oraz wylosowani: Nicolaysen, Peters i Roche. Wyznaczona przez Radę Komisja-Matka w składzie: Peters, Engelhardt i Roche zaproponowała walnemu zebraniu następujących kandydatów na nowych członków: P. Desnuelle (Francja), H. Theorell (Szwecja), Y. L. Wang (Chiny), F. G. Young (Anglia), J. Heller (Polska), F. Egami (Japonia) i C. Martius (Szwajcaria). Listę tę walne zebranie zatwierdziło oraz dokonało reelekcji 13 członków Rady a mianowicie: J. Courtois (Francja), V. A. Engelhardt (ZSRR), A. H. Ennor (Australia), M. Florkin (Belgia) — poprzedni przewodniczący, O. Hoffmann-Ostenhof (Austria), K. Lohmann (Niemcy), S. Ochoa (USA) — przewodniczący, A. I. Oparin (ZSRR) ewent. V-przewodniczący, A. Rossi-Fanelli (Włochy), E. H. Stotz (USA) — Skarbnik, R. H. S. Thompson (Anglia) — sekretarz generalny, A. Virtanen (Finlandia) i H. G. K. Westenbrink (Holandia).

W dalszym ciągu obrad przewodniczący Komisji Enzymów (powołanej w 1955 r. w Brukseli), M. Dixon przedstawił obszerne sprawozdanie. Komisja ta, w skład której powołano 9 specjalistów z różnych krajów, wyłoniła 5 podkomisji. Zespół ten odbył 65 spotkań. Na ostatnim zebraniu w marcu 1961 r. w Cassis, Komisja uznała, że zakończyła powierzone jej prace. Sprawozdanie i pełne materiały zostały wydane w formie książki, jako 20 tom serii sympozjów Unii. Każdy z krajów należących do Unii otrzymał to wydawnictwo. Komisja współpracowała ściśle z komisją słownictwa IUPAC. Opublikowane materiały obejmują m. innymi: definicję standardowej jednostki enzymu, umożliwiającą porównanie aktywności różnych enzymów, propozycje definicji najbardziej podstawowych symboli, używanych w kinetyce, propozycje nomenklatury koenzymów oparte w zasadzie na ich budowie chemicznej, Wstępne propozycje nomenklatury cytochromów oraz zasady klasyfikacji i nomenklatury enzymów wraz z dołączoną listą 700 opracowanych enzymów. Kończąc swe zadania Komisja zaproponowała utworzenie Stałego Komitetu Enzymów, w szerszym gronie, w celu kontynuacji niezbędnych prac.

Z kolei przedstawiciele Pergamon Press złożyli sprawozdanie z działalności wydawniczej obejmującej materiały z sympozjów, odbytych pod egidą Unii oraz z Kongresów w Wiedniu i Moskwie.

Działalność Komitetu Koordynacyjnego IUB — IUPAC była przedmiotem osobnego sprawozdania. Komitet ten dyskutował sprawę częstotliwości odbywania Kongre-

sów Biochemicznych. Jednakże stanowisko jakie w tej sprawie zajmują Unie pokrewne (IUBS i IUPS) przemawia za utrzymaniem dotychczasowej praktyki i tak też zadecydowało walne zebranie.

Walne zebranie przyjęło też do wiadomości, że Rada Unii na posiedzeniu w dniu 12.VIII.1961 powołała na okres 3-letni Komisję Redaktorów Czasopism Biochemicznych. W Komisji tej będą reprezentowane redakcje: *Biochemical Journal*, *Biochimica and Biophys. Acta*, *Biokhimiya*, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, *Hoppe Seyler Ztschr.* i *Journal of Biol. Chem.* Osobowo skład tej Komisji zatwierdzi przewodniczący Unii. Przewidziana została możliwość rozszerzenia tej Komisji przez powołanie przez nią przedstawicieli redakcji innych czasopism biochemicznych. Wstępne rozmowy pomiędzy redakcjami wymienionych uprzednio czasopism biochemicznych a Biurem Unii przeprowadzone zostały na zebraniu odbytym w Cambridge we wrześniu 1960 roku.

Delegacja USA przedstawiła oficjalne zaproszenie Przewodniczącego Narodowej Akademii Nauk St. Zjednoczonych Dr. D. Q. Bronka na odbycie w Nowym Yorku od 24 lipca 1964 roku VI Międzynarodowego Kongresu Biochemicznego oraz piątego walnego zebrania Unii. Delegacja wręczyła przewodniczącemu ozdobnie oprawną księgę, dar miasta Nowy York, zawierającą tekst zaproszenia Akademii Nauk, oraz zaproszenia ze strony władz miejskich Nowego Yorku i gubernatora Stanu Nowy York. Liczne barwne fotografie przedstawiają m. innymi zdjęcia makiet dwu hoteli, które zainaugurują swoją działalność, goszcząc uczestników Kongresu. Zaproszenie to zostało przez Walne Zebranie przyjęte.

Z kolei prof. Egami w imieniu Rady Naukowej Japonii powiadomił, że biochemicy japońscy są gotowi zorganizować następny, VII Międzynarodowy Kongres Biochemiczny w Tokio. Walne zgromadzenie zaaprobowało tę deklarację. Uczeni japońscy podejmą kroki w celu uzyskania oficjalnego zaproszenia ze strony swego rządu.

Walne Zebranie zajęło się następnie współpracą z innymi uniami i organizacjami naukowymi. Ustalono, że w lecie 1963 w Londynie odbędzie się organizowane wspólnie przez IUB i IUPS 3—4-dniowe sympozjum na temat „Tlen” z udziałem ok. 100 osób. Postanowiono też że IUB będzie współpracowała nadal z IUBS i IUPS w ramach Międzynarodowego Programu Biologicznego (IBP) realizowanego pod egidą ICSU. Walne zebranie rozważyło następnie projekt UNESCO utworzenia Międzynarodowego Instytutu Badania Komórki. Ostatecznie Unia Biochemiczna potwierdziła stanowisko zajęte już w tej sprawie przez IUBS i uznała, że tworzenie takiego Instytutu nie jest wskazane, natomiast poparto zasadniczo utworzenie Międzynarodowej Organizacji Badań Komórki (ICRO). Zebranie przyjęło do wiadomości oświadczenie sekretarza generalnego Unii, że w toku są rozmowy na temat współpracy Unii z wyodrębniającą się międzynarodową organizacją biofizyczną. Postanowiono też dalej, że Unia będzie brała udział w pracach Międzynarodowego Komitetu do Spraw Zwierząt Laboratoryjnych, nie może jednak przyczynić się do tych prac finansowo.

Na zakończenie obrad walne zebranie odłożyło rozpatrywanie wniosku *Academia Sinica, Taiwan*, o przyjęcie do Unii do czasu uzyskania niezbędnych wyjaśnień merytorycznych i proceduralnych.

Czwarte posiedzenie Rady Unii

W zastępstwie nieobecnego prof. Ochoa, zebraniu temu przewodniczył prof. Florkin.

Skarbnik Unii E. H. Stotz przedstawił szczegółowe sprawozdanie finansowe za ubiegłe 3-letnie oraz preliminarz budżetowy na następne trzy lata.

W ostatnim trzyleciu na dochody Unii złożyły się:

a) subwencje ICSU (Międzynarodowej Rady Unii Naukowych), które wynosiły 7.000 dol. w 1958 r., 5.000 dol. w 1959 r., 4.000 dol. w 1960 r. i 6.000 dol. w 1961 r.

b) wpływy od krajów — członków Unii z tytułu składek. W 1959 roku do Unii należało 25 krajów, w 1960 roku przyjęty został Iran. Wysokość składki rocznej została przez uprzednie walne zebranie Unii w Wiedniu podniesiona do 200 dolarów. W drodze wyjątku 4 kraje płacą składkę obniżoną w wysokości 100 dolarów rocznie (Bułgaria, Węgry, Holandia i Portugalia). Cztery kraje reprezentowane w Unii przez 2 przedstawicieli płacą 400 dolarów rocznie (USA, Anglia, ZSRR i Niemcy). Wpływy z tytułu składek w ostatnim trzyleciu wynosiły ok. 15.000 dolarów z tym, że do lipca 1961 nie wpłaciły składek za rok 1961 Austria, Belgia, Bułgaria, Iran, Izrael, Włochy, Japonia, Szwecja i Stany Zjednoczone AP.

Subwencje ICSU zostały wykorzystane na pokrycie kosztów podróży przedstawicieli krajów członkowskich do Wiednia na Walne zebranie Unii oraz uczestników sympozjum o enzymach hematynowych do Canberra a ponadto koszty związane z pracami Komisji Enzymów i Komisji Redaktorów. Wpływy z tytułu składek członkowskich zużyto na koszty utrzymania agend biurowych Unii, koszty podróży związane z udziałem przedstawicieli Unii w Komitetach Koordynacyjnych. Sympozjach, na opłaty z tytułu członkostwa Unii ICSU itp.

W budżecie preliminowanym na następne 3 lata ponad 12 000 dolarów przeznaczają się na finansowanie podróży uczestników sympozjów i kongresów Unii.

Rada Unii zatwierdziła zarówno sprawozdanie skarbnika jak i preliminarz budżetowy.

Następnie przedstawione zostało i przyjęte przez Radę krótkie sprawozdanie sekretarza generalnego Unii.

Po wysłuchaniu sprawozdania przewodniczącego Komisji Enzymów M. Dixona, Rada postanowiła iż Komisja ta w związku z wykonaniem zadań zostaje rozwiązana, oraz powołała Stały Komitet Enzymów w składzie S. P. Colowick, A. L. Lehninger, O. Hoffmann-Ostenhof i E. C. Webb (sekretarz). Komitetowi temu powierzono bieżące sprawy wynikające z dotychczasowej działalności Komisji. Przedstawiciele poszczególnych krajów zadeklarowali, że są już podjęte bądź w najbliższym czasie rozpoczną się prace nad tłumaczeniem sprawozdania Komisji Enzymów na języki: francuski, japoński, niemiecki, polski i rosyjski. Ponadto powierzono Komisji Redaktorów sprawę nawiązania kontaktu z sekcją chemii biologicznej IUPAC w celu ewentualnego powołania Komitetu do spraw nomenklatury cytochromów, zagadnieniem nomenklatury *izo*-enzymów zaś zająć się mają Stały Komitet Enzymów i Komisja Redaktorów.

W związku z zaakceptowaniem przez Walne Zebranie powołania Komisji Redaktorów czasopism biochemicznych przewodniczącym tej Komisji mianowano J. T. Edsalla a sekretarzem W. V. Thorpe'a. Rada ustaliła też następujący terminarz posiedzeń, sympozjów i kongresów:

1962 — posiedzenie Komisji Redaktorów:

1963 — sympozjum „Tlen”, wspólne IUB/IUPS

1963 — sympozjum „Medyczne aspekty biochemii genetycznej”, wspólne IUB/IUPAC, które ma się odbyć w Detroit lub Toronto równocześnie z Międzynarodowym Kongresem Chemii Klinicznej.

1963 — sympozjum „Genetyka biochemiczna”, wspólne IUB/IUBS

1963 — posiedzenie Komisji Redaktorów czasopism biochemicznych

1964 — VI Międzynarodowy Kongres Biochemiczny w Nowym Yorku

1964 — posiedzenie Komisji Redaktorów czasopism biochemicznych

1964 — posiedzenie stałego Komitetu Enzymów

Sekretarz generalny powiadomił Radę, że w przyszłości w wyniku porozumienia podjętego w Komitecie Koordynacyjnym IUB/IUPAC, IUPAC nie będzie zwoływała Kongresów o tematyce biochemicznej, a ograniczona ilość sympozjów poświęcona będzie przede wszystkim chemicznym aspektom zagadnień biologicznych. Z drugiej strony Kongresy i Sympozja IUB będą przede wszystkim uwzględniać biologiczne aspekty poruszanych zagadnień.

Następnie Rada przyjęła do wiadomości, że 2 sierpnia 1961 na Międzynarodowym Kongresie Biofizycznym w Sztokholmie powstała Międzynarodowa Organizacja Biofizyki Czystej i Stosowanej (*International Organisation of Pure and Applied Biophysics* — IOPAB). Organizacja ta zaproponowała powołania wspólnego Komitetu z Unią Biochemiczną z udziałem 3 członków z IUB i 3 członków z IOPAB. Ustalono, że IUB będzie w tym Komitecie reprezentowany przez przewodniczącego, skarbnika i sekretarza generalnego Unii. Rada postanowiła też, że przedstawiciel Unii będzie brał udział w pracach Komitetu Badań Oceanicznych powołanego przez ICSU. Poza tym Rada rozpatrywała przekazaną jej przez walne zebranie sprawę objęcia przez Unię patronatu nad *International Abstracts of Biological Science*. Postanowiono, że jeśli IUPAC podjęła podobną decyzję w stosunku do *Chemical Abstracts*, to IUB postąpi analogicznie.

Zebranie zakończono ustalając, że następne zebranie Rady odbędzie się w lipcu 1964 r. w Nowym Yorku w związku z VI Międzynarodowym Kongresem Biochemicznym.

J. Heller

Sprawozdanie z Konferencji Chromatograficznej w Pradze

w dniach 21—24 czerwca 1961 roku

Czterodniowa konferencja zorganizowana przez Sekcję Chromatograficzną Czechosłowackiego Towarzystwa Chemicznego poświęcona była zarówno teorii jak i praktyce chromatograficznej. Głównymi organizatorami i gospodarzami byli dr K. Macek i dr I. Hais, redaktorzy czeskiej monografii chromatografii bibułowej, która ukazała się już w drugim wydaniu tłumaczonym na kilka języków.

Konferencja miała charakter międzynarodowy. Wzięli w niej udział czołowi specjaliści metod chromatograficznych i autorzy podręczników i monografii, jak prof. Consden, Pollard, Smith, Edwards i Knight z Anglii, prof. Raczyński z ZSRR, prof. Blasius, dr Matthias, dr Grüne i dr Waldi z Niemiec, prof. Marini-Bettolo i dr M. Lederer, redaktor periodyku *J. of Chromatography*, z Włoch. Z Polski wzięli udział w Konferencji: prof. Opieńska-Blauth, doc. Ostrowski i dr Sakławska-Szymonowa. Niestety nie mogli przybyć prof. Waksmundzki i dr Soczewiński — nasi teoretycy z zakresu chromatografii bibułowej. Z Czechosłowacji były reprezentowane główne Instytuty Naukowe i Uczelnie Wyższe w Pradze, Bratysławie, Pardubicach i innych ośrodkach naukowych i przemysłowych. Problematykę pierwszych dwóch dni Konferencji wypełniały referaty wiodące i komunikaty z teorii i praktyki chromatografii bibułowej. Referaty wiodące wygłosili:

- | | |
|-----------------|---|
| prof. Consden | — O pochodzeniu i rozwoju chromatografii bibułowej, |
| prof. Raczyński | — O podstawach teoretycznych chromatografii bibułowej, |
| dr I. Hais | — O generalnych problemach w technice chromatografii bibułowej. |

Reszta referatów i komunikatów w sumie około 40 mieściła się w następujących grupach tematycznych:

- A) Chromatografia bibułowa związków nieorganicznych z referatem głównym prof. Pollarda.
- B) Postępy w technice chromatograficznej z referatem Dr Macka.
- C) Zastosowanie metodyki chromatografii bibułowej do badań niektórych związków organicznych.
- D) Zastosowanie chromatografii bibułowej do analizy produktów mineralnego pochodzenia i leków.
- E) Zastosowanie chromatografii bibułowej do badań lipidów.

Z Polski były zgłoszone 4 referaty i komunikaty, przez: prof. Opieńską-Blauth, prof. Waksmundzkiego i dr Soczewińskiego. Podczas Konferencji wyświetlono dwa barwne filmy z dziedziny techniki ogólnej chromatografii bibułowej i techniki specjalnej białek i aminokwasów.

Trzeci dzień Konferencji poświęcony był dla sympozjum na temat zależności między współczynnikami R_F a strukturą badanych związków, które odbyły się w ośrodku Czechosłowackiej Akademii Nauk w pięknej miejscowości w Libicach.

Zwiedzanie niektórych zakładów naukowych doskonale zaopatrzonych w nowoczesną aparaturę z własnych wytwórni i importową, zajęło dzień czwarty.

Za zorganizowanie tak doskonałej i pożytecznej Konferencji należą się organizatorom i gospodarzom wyrazy uznania i podziękowania.

J. Opieńska-Blauth

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Wykaz Władz i Spis Członków

(stan w 1961 r.)

Zarząd Główny

Warszawa 40, ul. Freta 16

Prof. dr Bolesław FILIPOWICZ	—	prezes
Doc. dr Kazimierz ZAKRZEWSKI	—	vice-prezes
Doc. dr Jerzy KRAWCZYŃSKI	—	skarbnik
Dr Zofia LASSOTA	—	z-ca skarbnika
Doc. dr Zofia ZIELIŃSKA	—	sekretarz
Dr Tadeusz KŁOPOTOWSKI	—	z-ca sekretarza
Dr Henryk PANUSZ	—	członek Zarządu

Diżury Zarządu Głównego PTBioch odbywają się w piątki, w godz. 16—17,30 w lokalu Towarzystwa.

Oddział w Białymstoku

20 członków

Siedziba: Zakład Chemii Fizjologicznej AM Białystok, ul. Mickiewicza 2

Zarząd oddziału:

Doc. dr Stefan NIEWIAROWSKI — Przewodniczący

Dr Juliusz POPOWICZ — Sekretarz

Lista członków

BULUK Karol, Prof. dr, Zakł. Patologii Ogólnej i Dośw. AM
 CZEREPKO Kazimierz, Mgr inż., Zakł. Chemii Ogólnej AM
 DANYSZ Andrzej, Doc, dr, Zakł. Farmakologii AM
 GAŁASIŃSKI Władysław, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol.
 IWANOWSKI Henryk, Mgr, Wojsk. Szpital Ginekol. Położn.
 JANUSZKO Tadeusz, Dr, Zakł. Patologii Ogólnej i Dośw. AM
 JAROSZEWICZ Kazimierz, Mgr, Zakł. Chemii Ogólnej AM
 JAROSZEWICZ Leokadia, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM
 JÓZWIAK Michał, Lek., Zakł. Chemii Ogólnej AM

KALICIŃSKI Andrzej, Dr, I Klin. Chorób Wewn. AM
MASŁOWSKI Konstanty, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM
NIEWIAROWSKI Stefan, Doc. dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM
POPOWICZ Juliusz, Dr, Zakł. Chemii Ogólnej AM
PROKOPOWICZ Jan, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM
ROŚLAN Zenon, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM
RÓŻAŃSKI Andrzej, Lek., Zakł. Chemii Ogólnej AM
ŚWIĄTECKI Lech, Lek., Szpital Powiat. Elk
TOMICKA Halina, Mgr, Zakł. Chemii Ogólnej AM
WARDZIŃSKA Halina, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM
WÓŁOSOWICZ Nina, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM

Oddział w Gdańsku

25 członków

Siedziba: Zakład Chemii Fizjologicznej AMG Gdańsk-Wrzeszcz, Al. Zwycięstwa 42

Zarząd oddziału: Doc. dr Mariusz ŻYDOWO — Przewodniczący
Dr inż. Karol TAYLOR — Sekretarz

Lista członków

ANGIELSKI Stefan, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM
BIELAWSKI Włodzimierz, Lek, I Klin. Chorób Wewn. AM
BOROWSKI Edward, Doc. dr, Zakł. Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej
CHYREK-BOROWSKA Sabina, Lek., I Klin. Chorób Wewn. AM
GRUDZIŃSKA Alicja, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM
GÓRSKI Marian, Prof. dr, I Klin. Chorób Wewn. AM
KOWALCZYK Jerzy, Mgr inż., Kat. Anal. Techn. Politechniki Gdańskiej
KUPRYSZEWSKI Gotfryd, Dr inż., Wyższa Szkoła Pedagogiczna
KURYŁO-BOROWSKA Zofia, Dr inż., Inst. Medycyny Morskiej
LIBEREK Bogdan, Dr inż., Wyższa Szkoła Pedagogiczna
MANITIUS Andrzej, Dr, II Klin. Chorób Wewn. AM
MOZOŁOWSKI Włodzimierz, Prof. dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM
MAKAREWICZ Wiesław, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM
NIEMIRO Ryszard, Dr, Zakł. Fizjol. AM
PRZYJEMSKI Jan, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM
PURZYCKA Jadwiga, Mgr, Zakł. Chemii Biologicznej AM
ROGULSKI Jerzy, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM
RZECZYCKI Wiktor, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM
SOKOŁOWSKA Teresa, Dr inż., Zakł. Chemii Ogólnej Politechniki Gdańskiej
SZABUNIEWICZ Bożydar, Prof. dr, Zakł. Fizjol. AM
TASZNER Emil, Prof. dr, Zakł. Chemii Ogólnej Politechniki Gdańskiej
TAYLOR Alina, Mgr inż., Inst. Medycyny Morskiej
TAYLOR Karol, Dr inż., Inst. Medycyny Morskiej
ZELEWSKI Leon, Dr Zakł. Chemii Biologicznej AM
ŻYDOWO Mariusz, Doc. dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM

Oddział w Krakowie

42 członków

Siedziba: Zakład Chemii Fizjologicznej AM Kraków, ul. Kopernika 7*Zarząd oddziału:* Doc. dr Włodzimierz OSTROWSKI — Przewodniczący
Dr Mirosława WEBER — Sekretarz*Lista członków*

- BOBEK Stanisław, Mgr inż., WSR, ul. Mickiewicza 21
 DWURAŻNA Mieczysława, Dr, Zakł. Fizjol. Roślin PAN, ul. Mickiewicza 21
 EWY Zygmunt, Prof. dr, Zakł. Fizjol. Zwierząt WSR, ul. Mickiewicza 21
 FRENDO Julian, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 GABRYELSKI Władysław, Dr I Klin. Wewn. AM, ul. Kopernika 7
 GUMIŃSKA Maria, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 GUMIŃSKI Tadeusz, Lek., I Klin. Chor. Dzieci AM, ul. Strzelecka 2
 GÓRSKI Franciszek, Prof. dr, Zakł. Fizjol. Roślin UJ, ul. Grodzka 53
 HALIKOWSKI Bogusław, Prof. dr, II Klin. Chorób Dzieci AM
 KAMIEŃSKA-ŻYŁA Maria, Mgr, Zakł. Fizjol. Roślin PAN, ul. Mickiewicza 21
 KLIMEK Rudolf, Lek., I Klin. Położn. i Chorób Kobięcych, ul. Kopernika 23
 KOJ Aleksander, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 KOZŁOWSKA Aniela, Prof. dr, Zakł. Botaniki WSR, ul. Mickiewicza 21
 KONIECZNY Leszek, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 KRĄWCZYK Adam, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM ul. Kopernika 7
 KULCZYCKI Adam, Prof. dr, Zakł. Fizjol. Zwierząt UJ, ul. Krupnicza 41
 MANOWSKA Jadwiga, Mgr, Zakł. Fizjol. Zwierząt UJ, ul. Krupnicza 41
 MICZYŃSKI Kazimierz, Dr, Zakł. Botaniki WSR, ul. Mickiewicza 21
 NOWORYTKO Jadwiga, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 NASKAŁSKI Jerzy, Mgr, III Klin. Chorób Wewn. AM, ul. Kopernika 17
 NOWOTNY Franciszek, Prof. dr, Katedra Technol. Rolnej WSR, ul. Krupnicza 41
 OSTROWSKI Włodzimierz, Doc. dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 PAŁASIŃSKI Mieczysław, Mgr, WSR, ul. Mickiewicza 21
 PIETRZYCKA Maria, Mgr, I Klin. Położn. i Ginekol., ul. Kopernika 21
 POJNAR Edward, Dr, Katedra Botaniki WSR, ul. Mickiewicza 21
 RYŚ Rajmund, Doc. dr, Inst. Zootechniki, ul. Karmelicka 20
 SAMOŁUS Bogusław, Mgr, Katedra Technologii Rolnej WSR, ul. Krupnicza 41
 SARNECKA-KELLER Maria, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 ŚWIDERSKI Jan, Mgr, Klin. Neurochirurgii AM, ul. Botaniczna 3
 SKARŻYŃSKI Bolesław, Prof. dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 SMOLIŃSKI Stefan, Dr, Zakł. Chemii Organ. UJ, ul. Krupnicza 41
 STELMASZYŃSKA Teresa, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 SZAFRAN Halina, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 SZAFRAN Zdzisław, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 SZCZEPKOWSKI Tadeusz, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 SZURMAN Jan, Mgr inż. Zakł. Mikrobiologii AM, Zabrze-Rokitnica
 WALCZAK Zygmunt, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 WEBER Mirosława, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 WOJTASZEK Tadeusz, Mgr inż., Prac. Fizjol. Stosowanej PAN, ul. Mickiewicza 21
 WIERNY Adam, Mgr inż., Zakł. Hodowli Dośw. Zwierząt PAN, Grodziec Śląski,
 pow. Bielsko
 ZAWIELAK Janina, Mgr, Katedra Technologii Rolnej WSR, ul. Krupnicza 41
 ZGLICZYŃSKI Jan Maciej, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7
 ŻAK Zdzisław, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Kopernika 7

Oddział w Lublinie

51 członków

Siedziba: Zakład Chemii Fizjologicznej AM Lublin, ul. Lubartowska 85

Zarząd oddziału: Prof. dr Janina OPIEŃSKA-BLAUTH — Przewodnicząca
Dr Henryk KRACZKOWSKI — Sekretarz

Lista członków

- BASZYŃSKI Tadeusz, Dr, Katedra Fizjol. Roślin UMCS, ul. Głowackiego 2
BLAIM Kazimierz, Dr, Laboratorium Biochemiczne IUNG, Puławy
BORKOWSKI Tomasz, Dr, Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartowska 85
CEGIELKA Marian, Lek., Kat. Fizjopatol. WSR, ul. Akademicka 11
CHAREZIŃSKI Marian, Mgr, Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartowska 85
GAWROŃSKI Eugeniusz, Mgr, Zakł. Fizjol. Roślin UMCS, ul. Głowackiego 2
GAŚSIOR Eugeniusz, Dr, Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartowska 85
ISKIERKO Jerzy, Dr, Zakł. Chemii Ogólnej AM, ul. Staszica 4
JUŚKO-GRUNDBOECK Jadwiga, Dr, Zakł. Biochemii Inst. Weterynarii Puławy,
ul. Partyzantów 59
KAŃSKI Marek, Doc. dr, Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartowska 85
KOWALSKA Halina, Mgr, Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartowska 85
KRACZKOWSKI Henryk, Dr, Katedra Chemii Fizjol. WSR, ul. Lubartowska 58a
KRYSTOSIK Jerzy, Lek., I Klin. Położn. i Chorób Kobięcych AM, ul. Lubartow-
ska 81
KRZECZKOWSKA Irena, Doc. dr, Katedra Chemii Ogólnej AM, ul. Staszica 4
KUJAWA Romuald, Lek., Centr. Laboratorium Klin. PSK, ul. Staszica 16
LEONOWICZ Andrzej, Mgr, Katedra Chemii Ogólnej WSR, ul. Akademicka 11
LIEBHART Stanisław, Prof. dr, Klin. Położn. i Chorób Kobięcych AM, ul. Lubar-
towska 81
LORKIEWICZ Zbigniew, Doc. dr, Katedra Mikrobiologii Ogólnej UMCS, al. Racia-
wickie 20
ŁOBARZEWSKI Jerzy, Mgr, Zakł. Biochemii Wydz. Biologii i Nauk o Ziemi
UMCS, ul. Głowackiego 2
MADECKA-BORKOWSKA Irena, Dr, Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartow-
ska 85
MIECZYŃSKA Anna, Prof. dr, Pracownia Fizjol. i Żywienia Roślin, IUNG, Puławy
MIERZEJEWSKI Józef, Mgr, Katedra Chemii Ogólnej WSR, ul. Akademicka 11
MIERZEJEWSKI Tadeusz, Dr, Katedra Chemii Fizjol. WSR, ul. Lubartowska 58a
PRASAŁ Zbigniew, Mgr, Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartowska 85
PIETRUSIEWICZ Maria, Mgr, Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartowska 85
OPIEŃSKA-BLAUTH Janina, Prof. dr, Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartow-
ska 85
RYCAJ Mieczysław, Mgr, Zakł. Analityki Wydz. Zdrowia, ul. Wróblewskiego 1
SAPIECHA Kazimierz, Mgr, Katedra Chemii Ogólnej WSR, ul. Akademicka 11
OBACZ-SANECKA Maria, Lek., Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartowska 85
SKULMOWSKI Józef, Prof. dr, Katedra Chemii Fizjol. WSR, ul. Lubartowska 58a
SYKUT Anna, Mgr, Katedra Chemii Ogólnej WSR, ul. Akademicka 11
SZWAJ Maria, Mgr, Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartowska 85
SZYMONA Marian, Dr, Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartowska 85
SZYMONA Olga, Dr, Katedra Chemii Fizjol. AM, ul. Lubartowska 85

TROJANOWSKI Jerzy, Doc. dr, Zakł. Biochemii UMCS, ul. Głowackiego 2
 WIERZCHOWSKI Zenon, Prof. dr, Katedra Chemii Ogólnej WSR, ul. Akademicka 11
 ZAJĄCZKOWSKA Anna, Mgr, Laboratorium Klin. Okulist. AM, ul. Chmielna 5
 ZIELIŃSKI Henryk, Mgr, Katedra Chemii Fizjol. WSR, ul. Lubartowska 58a
 BIELECKA Wiesława, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. Śl. AM, Zabrze-Rokitnica
 BOHYRYCZ-ZUDERA Maria, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. Śl. AM, Zabrze-Rokitnica
 CHORAŻY Mieczysław, Dr, Zakł. Biol. Nowotworów Inst. Onkologii, Gliwice
 ELBOWICZ-WANIEWSKA Zdzisława, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. Śl. AM, Zabrze-Rokitnica
 GRABECKI Jerzy, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. Śl. AM, Zabrze-Rokitnica
 GRABOWSKA Maria, Inż., Inst. Onkologii, Gliwice, ul. Wybrz. Armii Czerwonej 15
 GRZESIK Jan, Dr, Inst. Med. Pracy w Przemysle Węglowym i Hutniczym, Zabrze
 JÓZKIEWICZ Stanisław, Doc. dr, Zakł. Chemii Fizjol. Śl. AM, Zabrze-Rokitnica
 SPETT Kazimierz, Doc. dr, Zakł. Chemii Fizjol. Śl. AM, Zabrze-Rokitnica
 STANOSEK Józef, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. Śl. AM, Zabrze-Rokitnica
 URBANOWICZ Henryk, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. Śl. AM, Zabrze-Rokitnica
 WARTERESIEWICZ Mariusz, Dr, Katedra Fizjol. Roślin WSR, ul. Akademicka
 WILCZOK Tadeusz, Dr, Inst. Onkologii, Gliwice

Oddział w Łodzi

33 członków

Siedziba: Zakład Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, ul. Lindleya 6

Zarząd oddziału: Prof. dr Antoni DMOCHOWSKI — Przewoniczający
 Dr Henryk PANUSZ — Sekretarz

Lista członków

BACHMAN Bolesław, Doc, mgr inż. Zakł. Technologii Spirytusu i Drożdży PŁ,
 ul. Wólczańska 171
 BOBIŃSKI Henryk, Mgr, III Klin. Chorób Wewn. WAM, ul. Żeromskiego 113
 BRZEZIŃSKI Andrzej, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Narutowicza 68
 DMOCHOWSKI Antoni, Prof, dr, Wydz. Biologii i Nauki o Ziemi U, ul. Lindleya 6
 FILIPOWICZ Bronisław, Prof. dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Narutowicza 68
 GOLEWSKI Stanisław, Dr Zakł. Chemii Ogólnej AM, ul. Narutowicza 68
 GREGER Janusz, Lek., Zakł. Chemii Ogólnej AM, ul. Narutowicza 68
 GROSS Maria, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Narutowicza 68
 IWIŃSKA Irena, Prof. dr, Zakł. Towaroznawstwa WSE, ul. Południowa 20
 KŁYSZEJKO Leokadia, Dr, Zakł. Biochemii UŁ, ul. Lindleya 6
 KNYPL Stanisław, Mgr, Zakł. Fizjologii Roślin UŁ, ul. Narutowicza 68
 KRAJEWSKI Tadeusz, Mgr, Zakł. Biochemii UŁ, ul. Lindleya 6
 LEYKO Wanda, Doc. dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Narutowicza 68
 ŁOZA Emil, Doc. dr, Katedra Biochemii UŁ, ul. Lindleya 6
 MARKIEWICZ Konstanty, Dr III Klin. Chorób Wewn. WAM, ul. Żeromskiego 113
 MOYCHO Wacław, Prof. dr, Zakł. Fizjol. Roślin UŁ, ul. Narutowicza 68
 PILEK Kazimierz, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Narutowicza 68
 PANUSZ Henryk, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Narutowicza 68
 PIOTRŌWSKI Jerzy, Dr, Inst. Medycyny Pracy. ul. Wodna 40

SALMOWA Jadwiga, Mgr, Inst. Medycyny Pracy, ul. Wodna 40
 SEMPÍŃSKA Elzbieta, Mgr, Zakł. Biochemii UŁ, ul. Lindleya 6
 SCHMIDT Marian, Mgr, III Klin. Chorób Wewn. WAM, ul. Żeromskiego 113
 SKARŻYŃSKI Józef, Dr, Katedra Chemii Ogólnej AM, ul. Narutowicza 68
 SKOCZYŁAS Bogna, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Narutowicza 68
 SYSA Józef, Prof. dr, Zakł. Fizjol. AM, ul. Lindleya 3
 TOCZYŃSKI Tadeusz, Lek., Zakł. Fizjol. AM, ul. Lindleya 3
 URBANEK Henryk, Mgr, Zakł. Biochemii UŁ, ul. Lindleya 6
 WALTER Zofia, Mgr, Zakł. Biochemii UŁ, ul. Lindleya 6
 WIĘCKOWSKI Władysław, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Narutowicza 68
 WIŚNIEWSKI Jerzy, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Narutowicza 68
 WITKOWSKA Zofia, Mgr, Zakł. Chemii Ogólnej AM, ul. Narutowicza 68
 WITKOWSKI Sławomir, Mgr, Zakł. Chemii Ogólnej AM, ul. Narutowicza 68
 WROŃSKA Teresa, Mgr, Inst. Medycyny Pracy, ul. Wodna 40

Oddział w Poznaniu

47 członków

Siedziba: Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Poznań, ul. Święcickiego 8

Zarząd oddziału: Prof. dr Zdzisław STOLZMANN — Przewodniczący
 Prof. dr Jan WOJCIECHOWSKI — Viceprzewodniczący
 Dr Jan CHMIEL — Sekretarz

Lista członków

Namphre 8-8
Kor. Chan 09.05E
Machnio 196

ADAM Włodzimierz, Mgr, II Klin. Chorób Wewn. AM, ul. Przybyszewskiego
 AUGUSTYŃIAK Jacek, Mgr, Zakł. Hodowli Roślin PAN, ul. Wojska Polskiego 71c
 AUGUSTYŃIAK Halina, Mgr, Zakł. Hodowli Roślin PAN, ul. Wojska Polskiego 71c
 BARTOSIŃSKI Bogumił, Mgr, Katedra Biochemii WSR, ul. Wojska Polskiego 71c
 BŁAWACKA Maria, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Święcickiego 6
 BRATEK Maria, Dr, Zakł. Hodowli Roślin PAN, ul. Wojska Polskiego 71c
 CHMIEL Józef, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Święcickiego 6
 FENRYCH Władysław, Mgr, III Klin. Chor. Wewn. AM, ul. Szkolna 8
 FILIPEK-WENDER Helena, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Święcickiego 6
 GOGOLEWSKI Marek, Dr, WSR, ul. Mazowiecka 48
 GUTOWSKI Jerzy, Lek. mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Święcickiego 6
 HIEROWSKI Marian, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Święcickiego 6
 HORST Antoni, Prof. dr, Zakł. Patologii Og. i Dośw. AM, ul. Święcickiego 6
 JANICKI Józef, Prof. dr, Katedra Technologii Rolnej WSR, ul. Mazowiecka 48
 JESKE Grzegorz, Dr, Katedra Fizjol. Roślin WSR, ul. Mazowiecka 48
 KAMIŃSKI Edward, Dr, WSR, ul. Mazowiecka 48
 KAROŃ Halina, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Święcickiego 6
 KUHN Maria, Mgr, II Klin. Chorób Wewn. AM, ul. Przybyszewskiego 49
 LUDWICZAK Rufina, Prof. dr, Zakł. Chemii Organ. i Biolog. AM, ul. Grunwaldzka 6
 MAGAS Stanisław, Dr, II Klin. Chorób Wewn. AM, ul. Przybyszewskiego 49
 MEISSNER Witold, Dr, WSE, ul. Marchlewskiego 146
 MIĘTKIEWSKI Kazimierz, Prof. dr, Zakł. Histologii Prawidł. i Embriol. AM, ul. Święcickiego 6
 MICHEJDA Jan, Dr, Zakł. Fizjol. Zwierząt UAM, ul. Fredry 10

- NIEWIAROWICZ Adam, Dr, WSR, ul. Mazowiecka 48
 PAWEŁKIEWICZ Jerzy, Prof. dr, Katedra Biochemii WSR, ul. W. Pola 71
 PATELSKI Jerzy, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Święcickiego 6
 PĘDZIWIŁK Franciszek, Dr, WSR, ul. Mazowiecka 48
 PIETZ Maria, Dr med., Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Święcickiego 6
 ROTH Zofia, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Święcickiego 6
 RUSZKOWSKI Marian, Dr, II Klin. Chorób Wewn. al. Przybyszewskiego 49
 SCHRAMM Ryszard, Dr, Zakł. Fizjol. Roślin, ul. Stalingradzka 14
 SKÓLIK Jerzy, Mgr, Zakł. Hodowli Roślin PAN, ul. Wojska Polskiego 71c
 SKUPIN Janusz, Dr, Katedra Biochemii WSR, ul. Mazowiecka 48
 SMOCKIEWICZOWA Aleksandra, Doc. dr, Katedra Chemii Nieorgan. i Analit.
 AM, ul. Grunwaldzka 6
 SOBKOWSKA Eugenia, Dr, WSR, ul. Mazowiecka 48
 STOLZMANN Zdzisław, Prof. dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Święcickiego 6
 SZEBIOTKO Kazimierz, Dr, WSR, ul. Mazowiecka 48
 SZYMAŃSKI Stefan, Dr, WSR, ul. Mazowiecka 48
 TOMASZEWSKI Mirosław, Mgr, Zakł. Dendrologii i Pomologii PAN, Kórnik,
 ul. Średzka 16
 WALERYCH Witold, Dr, Katedra Biochemii WSR, ul. Wojska Polskiego 71c
 WIEWIÓROWSKI Maciej, Prof. dr, Katedra Chemii Organicznej UAM, ul. Grun-
 waldzka 6
 WOJCIECHOWSKI Jan, Prof. dr, Katedra Fizjol. Roślin WSR, ul. Wojska Pol-
 skiego 71c
 WRÓŃSKI Anastazy, Inż., Wojskowy Szpital
 DASZYŃSKI Janusz, Lek., Laboratorium Szpitala Wojsk, Zielona Góra
 PFEIFFER Jerzy, Dr, Zakł. Medycyny Sądowej AM, ul. Święcickiego 6
 TYŚPER Zofia, Mgr, II Klin. Chirurgiczna AM, al. Przybyszewskiego 49
 ZGÓRZALEWICZ Bożena, Lek., Woj. Szpital Dziecięcy, ul. Nowowiejskiego 56/58

Oddział w Szczecinie

37 członków

Siedziba: Katedra Chemii Ogólnej PAM Szczecin, ul. Powstańców 72

Zarząd oddziału: Doc. dr Stefan KOTKOWSKI — Przewodniczący
 Lek. H. ŚLIWIŃSKA-PRZYJEMSKA — Sekretarz

Lista członków

- CHMIELEWSKI Konstanty, Mgr, Katedra Chemii Ogólnej PAM
 CHODKOWSKI Edward, Mgr inż., Zakł. Technol. Org. I. P.
 CIEŚLIK Elżbieta, Mgr inż., PAM
 DOBROWOLSKI Jan, dr, Zakł. Biochemii, WSR
 GERLACH Maria, Mgr inż., Laboratorium Centr. PSK nr 2, ul. Powstańców 72
 JACOBSON Ewa, Inż., Laboratorium Centralne PAM, ul. Unii Lubelskiej
 KACZMAREK-KONIECZNA Danuta, Mgr, Wojsk. Szpital Zakaźny, ul. Arkońska 4
 KOTKOWSKI Stefan, Doc. dr, Zakł. Chemii Ogólnej PAM, ul. Powstańców 72
 KUCHARSKI Waldemar, lek., OPL, DOKP
 KUREK Marian, Mgr, Zakł. Biochemii WSR
 LASSOCIŃSKA Aleksandra, Mgr, Katedra Chemii Ogólnej PAM, ul. Powstańców 72

ŁEMPICKI Eugeniusz, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. PAM, ul. Powstańców 78
 MACHOY Zygmunt, Mgr, Katedra Chemii Ogólnej PAM, ul. Powstańców 72
 MAKOWSKI Janusz, Doc. dr, Katedra Fizjopatologii PAM
 MANDAT Alina, Lek., Katedra Chemii Fizjol. PAM
 MATENKO Juliusz, Mgr inż., Katedra Chemii Ogólnej PAM, al. Powstańców 72
 MAZUR Mieczysław, Doc. dr, Zakł. Farmakologii PAM
 MERECKA Krystyna, Lek., PSK nr 1
 NIEWIAROWSKA-PAWLUS Alina, Mgr, Katedra Chemii Fizjol. PAM
 NIRAZ Seweryn, Mgr inż., Katedra Biochemii WSR
 PADEREWSKA Alina, Mgr inż., Klin. Chorób Zakaźnych PAM, ul. Arkońska 7
 PANOWICZ Halina, lek., Laboratorium Centr. PSK II. al. Powstańców 72
 PETRUSEWICZ Władysław, Mgr inż., Katedra Chemii Ogólnej PAN
 PIETRZYK Czesław, dr, Zakł. Technologii
 PTAK Włodzimierz, Lek., Zakł. Patologii Ogólnej i Dośw. PAM
 RINGEL Michał, Lek., Katedra Patologii PAM
 ROMANOWICZ Jolanta, Mgr inż., Laboratorium Centralne PAM
 SCHILLER Danuta, Mgr inż., Laboratorium Centr. PSK II, al. Powstańców 72
 SEIDLER Stefan, Doc. dr, Katedra Żywienia Zwierząt WSR
 SŁAWIŃSKI Piotr, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM
 SZOTOMICKA Leokadia, Mgr inż., Katedra Patologii PAM
 ŚLIWIŃSKA-PRZYJEMSKA Halina, Lek., Laboratorium Centralne PSK I
 SWIERCZEWSKA Maria, Mgr, Katedra Chemii Ogólnej PAM
 TRYSZKA Barbara, lek., Zakł. Patol. Og. i Dośw. PAM
 WARZECHA Antoni, Dr, Katedra Technologii Rolnej WSR
 WYSZYŃSKI Norbert, Mgr, Katedra Chemii Ogólnej PAM, al. Powstańców 72
 ZAJĄCZEK Stanisław, Doc. dr, PAM

Oddział w Warszawie

141 członków

Siedziba: Zakład Biochemii Instytutu im. M. Nenckiego PAN, Warszawa, 22, ul. Pasteura 3

Zarząd oddziału: Dr Jan SZARKOWSKI — Przewodniczący
 Doc. dr Lech WOJTCZAK — Sekretarz
 Dr Krystyna MICHALSKA — Członek Zarządu

Lista członków

ADAMIEC Arnold, Dr, Instytut Antybiotyków Zakł. Chemii Organicznej AM, ul. Krak. Przedm. 26/28
 ALEKSANDROWICZ Janina, Mgr, Państwowy Zakład Higieny, Zakład Badania Surowic i Szczepionek, ul. Chocimska 24
 BAGDASARIAN Grzegorz, Prof. dr, Inst. Matki i Dziecka, Zakł. Biochemii, ul. Kasprzaka 17
 BAGDASARIAN Michał, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Krak. Przedm. 26/28
 BARANOWSKA Joanna, Mgr, Państwowy Zakł. Higieny, Zakł. Biochemii, ul. Chocimska 24
 BEER Janusz, Mgr, Inst. Badań Jądrowych, ul. Dorodna 16
 BEŁŻECKA Krystyna, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Krak. Przedm. 26/28

- BICZ Barbara, Mgr, Zakł. Patologii Dośw. PAN, ul. Dworkowa 3
BICZ Włodzimierz, Dr, Zakł. Patologii Dośw. PAN, ul. Dworkowa 3
BIELIŃSKA Maria, Dr, Inst. Sadownictwa, Pracownia Fizjol. Skierniewice
BIRECKA Helena, Prof. dr, Katedra Fizjol. Roślin SGGW, ul. Rakowiecka 8
BITNY-SZLACHTO Stanisław, Dr, Wojsk. Centr. Lab. San.-Hig.
BOGUCKI Mieczysław, Prof. dr, Zakł. Biochemii Inst. Biologii Dośw. im. Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3
BRZESKI Witold, Doc. dr, Katedra Biochemii SGGW, ul. Rakowiecka 8
BUCHOWICZ Jerzy, Dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 8
BUŁZYŃSKI Andrzej, Mgr, Inst. Badań Jądrowych, ul. Dorodna 16
BUŁHAK Barbara, Mgr, Katedra Biochemii UW, ul. Żwirki i Wigury 6
BURACZEWSKA Lucyna, Mgr, Inst. Fizjol. i Żywienia Zwierząt PAN, Jabłonna k. Warszawy, ul. Modlińska 116a
BURACZEWSKI Stanisław, Mgr, Inst. Fizjol. i Żywienia Zwierząt PAN, Jabłonna k. Warszawy, ul. Modlińska 116a
CHMIELEWSKA Irena, Prof. dr, Katedra Biochemii UW, ul. Żwirki i Wigury 6
CHOJNACKI Tadeusz, Dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Krak. Przedm. 26/28
CZARTORYSKA Barbara, Mgr, Państwowy Szpital Kliniczny Nr 3, ul. Działdowska 1/3
CZECH Włodzimierz, Mgr, Ośrodek Izotopowy AM, Warszawa-Bielany, ul. Ceglowska 80
DANCEWICZ Antoni, Dr, Inst. Badań Jądrowych, ul. Dorodna 16
DOMINAS Halina, Dr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Biochemii, ul. Pasteura 3.
DRABIKOWSKI Witold, Dr, Inst. Biologii Dośw. im. Nenckiego PAN, Zakł. Biochemii, ul. Pasteura 3
DYDYŃSKA Maria, Dr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biochemii, ul. Pasteura 3
DŻUŁYŃSKA Janina, Doc. dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, Zakł. Mikrobiologii AM, ul. Chałubińskiego 5
GAJEWSKA Ewa, Mgr, Inst. Gruzlicy, Pracownia Izotopowa, ul. Płocka 26
GAJZLER Regina, Mgr, Inst. Antybiotyków, ul. Starościńska 5
GOCH Halina, Mgr, Centr. Labor. Zarządu Wytwórni Surowic i Szczepionek, ul. Chełmska 30
GOŁASZEWSKI Tomasz, Mgr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Krak. Przedm. 26/28
GRAJNERT Kazimierz, Mgr, Zakł. Analityki Lekarskiej, Studium Doskonalenia Lekarzy, Warszawa-Bielany, Ceglowska 80
GRUDA Julian, Mgr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Biochemii, Pasteura 3
GRYSZKIEWICZ Antonina, Dr, Inst. Hematologii, Zakł. Biochemii, ul. Chocimska 5
GRZELAKOWSKA Barbara, Mgr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Biochemii, ul. Pasteura 3
GUTNIAK Olga, Dr, Inst. Badań Jądrowych, ul. Dorodna 16
HELLER Józef, Prof. dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Krak. Przedm. 26/28
HORODKO Janina, Mgr, Centr. Labor. Zarządu Wytwórni Surowic i Szczepionek, ul. Chełmska 30
HULANICKA Danuta, Dr, Inst. Matki i Dziecka, ul. Kasprzaka 17
IGNATOWSKA Hanna, Mgr, II Klin. Chorób Wewn. AM, Pracownia Biochemiczna, ul. Nowogrodzka 59
JACHYMCZYK Witold, Mgr, Katedra Biochemii UW, ul. Żwirki i Wigury 6
JAMPOLER Irena, Dr, Państw. Zakł. Higieny, Dział Dezynsekcji i Deratyzacji, ul. Chocimska 24

- JANCZURA Ewa, Mgr, Państw. Zakł. Higieny, Zakł. Bakteriologii, ul. Chocimska 24
KANIUGA Zbigniew, Dr, Katedra Biochemii UW, ul. Żwirki i Wigury 6
KAROLCZYK Jan, Mgr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Biochemii, ul. Pasteura 3
KASPRZYK Zofia, Doc. dr, Katedra Biochemii UW, ul. Żwirki i Wigury 6
KAWIAK Jerzy, Dr, Zakł. Histologii i Embriologii AM, ul. Chałubińskiego 5
KĄCZKOWSKI Jerzy, Dr, Katedra Biochemii SGGW ul. Rakowiecka 8
KĄKOL Irena, Dr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Biochemii, ul. Pasteura 3
KIEPAL-KOCHAŃSKA Zofia, Mgr, Państw. Zakł. Higieny, Zakł. Wirusologii, ul. Chocimska 24
KLECZKOWSKI Kazimierz, Dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, Zakł. Biochemii Roślin, ul. Rakowiecka 8
KŁOPOTOWSKI Tadeusz, Dr, Inst. Matki i Dziecka, Zakł. Biochemii, ul. Kasprzaka 17
KOPCZYŃSKA-LAMBERT Iwona, Mgr, Inst. Matki i Dziecka, ul. Kasprzaka 17
KOPEĆ Maria, Dr, Inst. Badań Jądrowych, ul. Dorodna 16
KORNACKA Ludwika, Mgr, Inst. Hematologii, Zakł. Biochemii, ul. Chocimska 5
KORZYBSKI Tadeusz, Prof. dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Krak. Przedm. 26/28
KOŚCIELAK Jerzy, Dr, Inst. Hematologii, Zakł. Biochemii, ul. Chocimska 5
KOWALCZYK Jan, Mgr, Inst. Fizjol. i Żywienia Zwierząt PAN, Jabłonna k. Warszawy
KOWALSKI Edward, Prof. dr, Inst. Badań Jądrowych, ul. Dorodna 16
KOZDROJ Helena, Mgr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, Zakł. Mikrobiologii AM, ul. Chałubińskiego 5
KRAUZE Robert, Mgr, Labor. Chemiczne Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek, ul. Chelmska 30
KRAWCZYŃSKI Jerzy, Doc. dr, Inst. Doskonalenia i Specjalizacji Kadr Lekarskich, Zakł. Analityki, Warszawa-Bielany, ul. Ceglowska 80
KURATOWSKA Zofia, Lek., Inst. Badań Jądrowych, ul. Dorodna 16
KUROWSKI Czesław, Mgr, Zakł. Hodowli Dośw. Zwierząt, ul. Nowy Świat 72
LASKOWSKA Teresa, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Krak. Przedm. 26/28
LASSOTA Zofia, Dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Krak. Przedm. 26/28
LATAŁO Zbigniew, Lek., Inst. Badań Jądr., ul. Dorodna 16
LENARTOWICZ Ewa, Mgr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Biochemii, ul. Pasteura 3
LEWAK Stanisław, Dr, Katedra Biochemii UW, ul. Żwirki i Wigury 6
LIPIŃSKI Bogusław, Mgr, Inst. Badań Jądrowych, ul. Dorodna 16
MALEC Janina, Lek., Inst. Hematologii, ul. Chocimska 5
MĄRKUZE Zofia, Doc. dr, Państw. Zakł. Higieny, Zakł. Badania Żywności, ul. Chocimska 24
MAY Zofia, Mgr, Inst. Gruźlicy, Prac. Analityczna, ul. Płocka 26
MICHALSKA Krystyna, Dr, Inst. Gruźlicy, Prac. Biochemii Prątką, ul. Płocka 26
MICHAŁEK Hanna, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Krak. Przedm. 26/28
MICHAJLIK A., Dr, II Klin. Chorób Wewn. AM, ul. Nowogrodzka 59
MIGDALSKA Barbara, Lek., Inst. Doskonalenia i Specjalizacji Kadr Lekarskich, Warszawa-Bielany, ul. Ceglowska 80
MOCHNACKA Irena, Prof. dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Krak. Przedm. 26/28
MURAWSKI Krzysztof, Lek., Inst. Hematologii, Zakł. Biochemii, ul. Chocimska 5
MYSZKOWSKI Leopold, Dr, II Klin. Położn. i Chorób, Kobięcych AM, ul. Karowa
NIEMIERKO Stella, Doc. dr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biochemii, ul. Pasteura 3

- NIEMIERKO Włodzimierz, Prof. dr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Biochemii, ul. Pasteura 3
- NIEWIAROWSKA Marta, Mgr, III Klin. Położn., ul. Karowa
- NIZIOŁEK Stanisław, Mgr, Katedra Biochemii SGGW, ul. Rakowiecka 8
- NYREK Stefan, Doc. dr, Katedra Chemii Fizjologicznej SGGW, ul. Grochowska 272
- OBOJSKA Krystyna, Dr, Inst. Leków, Pracownia Kontroli Antybiotyków, ul. Chocimska 24
- ODERFELD Barbara, Mgr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Biochemii, ul. Pasteura 3
- ODRZYWOLSKA Anna, Mgr, Inst. Gruźlicy, Zakł. Biochemii, ul. Płocka 26
- OLKOWSKA Danuta, Mgr, Państw. Zakł. Higieny, Zakł. Wirusologii, ul. Chocimska 24
- ORŁOWSKA Barbara, Mgr, Państw. Zakł. Higieny, Zakł. Biochemii, ul. Chocimska 24
- PAWELEC Jerzy, Mgr, Inst. Gruźlicy, Zakł. Biochemii, ul. Płocka 26
- PIECHOWSKA Maria, Dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Krak. Przedm. 26/28
- PIEKARSKA Zofia, Mgr, Inst. Antybiotyków, ul. Starościńska 5
- PIETRZYKOWSKA Irena, Mgr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, Zakł. Mikrobiologii AM, ul. Chałubińskiego 5
- POREMBSKA Zofia, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Krak. Przedm. 26/28
- POSZWIŃSKI Przesław, Dr, Inst. Hematologii, Dział Plazmy, ul. Chocimska 5
- POZNAŃSKA-LINDE Hanna, Lek., II Klinika Chorób Zakaźnych, ul. Wolska 37
- PRIEGNITZ Anna, Mgr, Inst. Gruźlicy, Zakł. Biochemii, ul. Płocka 26
- PRZEŁĘCKA Aleksandra, Dr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Biochemii, ul. Pasteura 3
- PRZEZDZIECKA-DROESE Janina, Mgr, Katedra Biochemii SGGW, ul. Rakowiecka 8
- PRZYBYLSKI Edmund, Mgr, Inst. Leków, ul. Długa 16
- RACZYŃSKA-BOJANOWSKA Konstancja, Dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Krak. Przedm. 26/28
- REIFER Ignacy, Prof. dr, Katedra Biochemii SGGW, ul. Rakowiecka 8
- RZENDOWSKA Franciszka, Mgr, Państw. Zakł. Higieny, Zakł. Biochemii, ul. Chocimska 24
- SASKA Janina, Mgr, Zakł. Fizjol. Zwierząt UW, ul. Żwirki i Wigury 6
- SHUGAR David, Prof. dr, Państw. Zakł. Higieny, Zakł. Biochemii, ul. Chocimska 24
- SIKORSKA Ewa, Mgr, Państw. Zakł. Higieny, Zakł. Badania Żywności, ul. Chocimska 24
- STACHURSKA Jolanta, Mgr, Inst. Reumatologii, ul. Spartańska 8
- STREBEYKO Piotr, Prof. dr, Katedra Fizjologii Roślin UW, ul. Krak. Przedm. 26/28
- STRZELECKA-GOŁASZEWSKA Hanna, Mgr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Biochemii, ul. Pasteura 3
- SULKOWSKI Eugeniusz, Dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Krak. Przedm. 26/28
- SZAFRAŃSKI Przemysław, Doc. dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Krak. Przedm. 26/28
- SZAJBEL Wacław, Lek., Inst. Psychoneur., Pruszków Wsch., ul. Partyzantów 65
- SZARKOWSKA Ludmiła, Dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Krak. Przedm. 26/28
- SZARKOWSKI Jan, Dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Krak. Przedm. 26/28
- SZER Włodzimierz, Dr, Państw. Zakł. Higieny, Zakł. Biochemii, ul. Chocimska 24
- SZOT Zbigniew Dr Inst. Badań Jądrowych, ul. Dorodna 16
- SZYMANOWSKA Zofia, Dr, Inst. Hematologii, Zakł. Biochemii, ul. Chocimska 5
- SZYMCZYK Teresa, Lek., Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Krak. Przedm. 26/28

- SZYNKIEWICZ Zbigniew M., Dr, Katedra Mikrobiologii SGGW, ul. Grochowska 272
TOCZKO Kazimierz, Mgr, Katedra Biochemii UW, ul. Żwirki i Wigury 6
TOCZKO Maria, Dr, Inst. Biochemii i Biofizyki PAN, Zakł. Biochemii Roślin,
ul. Rakowiecka 8
TOMASZEWSKI Leszek, Dr, Państw. Szpital Klin. Nr 3, Laboratorium, ul. Dział-
dowska 1/3
TRZAŚKI Mieczysław, Dr, Centr. Szpital Kliniczny MSW, Laboratorium, ul. Wo-
łoska 2
TYSAROWSKI Wiesław, Doc. dr, Zakł. Chemii Fizjol. Wydz. Farmacji AM,
ul. Płocka 26
WEHR Hanna, Dr, Szpital Zakaźny Nr 1, I Klin. Chorób Zakaźn. AM, ul. Wol-
ska 37
WIERZCHOWSKI Piotr, Prof. dr, Katedra Chemii Ogólnej AM, ul. Krak. Przedm.
26/28
WITWICKI Jerzy, Dr, Labor. Technologiczne Zjednocz. Wytwórni Surowic
i Szczepionek, ul. Chełmska 30
WŁODAWER Paulina, Doc. dr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł.
Biochemii, ul. Pasteura 3
WOJNAROWSKA Maria, Mgr, Inst. Hematologii, Zakł. Biochemii, ul. Chocimska 5
WOJTCZAK Anna, Mgr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Bio-
chemii, ul. Pasteura 3
WOJTCZAK Antoni, Dr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Bio-
chemii, ul. Pasteura 3
WOJTCZAK Lech, Doc. dr, Inst. Biologii Doświad. im. M. Nenckiego PAN, Zakł.
Biochemii, ul. Pasteura 3
WOLAŃSKA Aniela, Dr, Inst. Gruźlicy, Pracownia Analityczna, ul. Płocka 26
ZAKRZEWSKA Amelia, Lek., Państw. Zakł. Higieny, Zakł. Badania Surowic
i Szczepionek, ul. Chocimska 24
ZAKRZEWSKI Kazimierz, Doc. dr, Inst. Badań Jądrowych, ul. Dorodna 16
ZAŁĘSKI Jan, Dr, Państw. Zakł. Higieny, Zakł. Badania Żywności, ul. Cho-
cimska 24
ZAŁUSKA Halina, Mgr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł. Bio-
chemii, ul. Pasteura 3
ZBROŻYNA Antoni Jacek, Mgr, Państw. Zakł. Higieny, Zakł. Bakteriologii,
ul. Chocimska 24
ZIELIŃSKA Zofia, Doc. dr, Inst. Biologii Dośw. im. M. Nenckiego PAN, Zakł.
Biochemii, ul. Pasteura 3

Oddział we Wrocławiu

30 członków

Siedziba: Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Wrocław, ul. Chałubińskiego 10

Zarząd oddziału: Prof. dr Tadeusz BARANOWSKI — Przewodniczący,
Prof. dr Wanda MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN — Vice-
przewodniczący,
Dr Apolinary SZEWCZUK — Sekretarz

Lista członków

BARANOWSKI Tadeusz, Prof. dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Chałubińskiego 10
BOGDANIKOWA Beata, Doc. dr, III Klin. Chorób Wewn., ul. Pasteura 4

- BOGUŚLAWSKA-JAWORSKA Janina, Lek., II Klin. Pediatria, ul. Curie-Skłodowskiej 50
- DOBRYSZYCKA Wanda, Dr, Zakł. Biochemii AM, ul. Szewska 38
- HENDRICH Wacław, Dr, Zakł. Biochemii, Inst. Immunol. i Terapii Dośw. PAN, ul. Chałubińskiego 4
- KARPIAK Stanisław, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Chałubińskiego 10
- KLECZEŃSKI Aleksander, Prof. dr, II Klin. Chorób Wewn., ul. Pasteura 4
- KOCHMAN Marian, Dr, Zakł. Biochemii Inst. Immunol. i Terapii PAN, ul. Chałubińskiego 4
- KOCÓR Marian, Doc. dr, Zakł. Chemii Ogólnej WSR, ul. Norwida 25
- KOWARZYK Hugon, Prof. dr, Zakł. Patologii Ogólnej i Dośw. AM, ul. Marcinkowskiego 1
- KOWARZYKOWA Zofia, Prof. dr, Zakł. Patologii Ogólnej i Dośw. AM, ul. Marcinkowskiego 1
- KUBICZOWA Aleksandra, Mgr, Katedra Biochemii UW, ul. Szewska 38
- KWIATKOWSKA Janina, Dr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Chałubińskiego 10.
- LISOWSKA Elwira, Mgr inż., Zakł. Biochemii Inst. Immunol. i Terapii Dośw. PAN, ul. Chałubińskiego 4
- LISOWSKI Józef, Dr, Zakł. Biochemii Inst. Immunol. i Terapii Dośw. PAN, ul. Chałubińskiego 4
- MASTALERZ Przemysław, Dr, Zakł. Biochemii Inst. Immunol. i Terapii Dośw. AM, ul. Chałubińskiego 4
- MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN Wanda, Doc. dr, Katedra Biochemii UW, ul. Szewska 38
- MEJER Stanisław, Dr, Zakł. Chemii Ogólnej WSR, ul. Norwida 25
- MORAWIECKA Bronisława, Dr, Katedra Biochemii UW, ul. Szewska 38
- MORAWIECKI Andrzej, Dr, Zakł. Biochemii Inst. Immunol. i Terapii Dośw. PAN, ul. Chałubińskiego 4
- MORDARSKI Marian, Doc. dr, Zakł. Antybiotyków Inst. Immunol. i Terapii Dośw. PAN, ul. Chałubińskiego 4
- NOWAK Kornel, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Chałubińskiego 10
- ORŁOWSKI Marian, Dr, III Klin. Chorób Wewn., ul. Pasteura 4
- POPADIUK Leonard, Lek., Zakł. Biochemii Inst. Immunol. i Terapii Dośw. PAN, ul. Chałubińskiego 4
- ROMANOWSKA Elżbieta, Dr, Zakł. Biochemii Inst. Immunol. i Terapii Dośw. PAN, ul. Chałubińskiego 4
- SIEMION Ignacy, Mgr, Zakł. Chemii Fizjol. AM, ul. Chałubińskiego 10
- SZEWCZUK Apolinary, Dr, Zakł. Biochemii Inst. Immunol. i Terapii Dośw. PAN, ul. Chałubińskiego 4
- SZCZEKLIK Edward, Prof. dr, III Klin. Chorób Wewn., ul. Pasteura 4
- WOLNY Marian, Mgr, Zakł. Biochemii Inst. Immunol. i Terapii Dośw. PAN, ul. Chałubińskiego 4
- WOLNY Elżbieta, Mgr, Zakł. Biochemii Inst. Immunol. i Terapii Dośw. PAN, ul. Chałubińskiego 4

SPIS TREŚCI

Z. R. Grabowski — O niektórych metodach badania kinetyki procesów enzymatycznych	3
I. Szumiel — Stereospecyficzność enzymów	29
Z. Kasprzyk — Reakcje fotochemiczne w fotosyntezie	53
L. Wojtczak — Fosforylacja oksydacyjna	73
E. Nalborczyk — Zastosowanie trytu w badaniach biochemicznych i biologicznych	95
K. Łangowska i Z. Roth — Kwas muraminowy	109
T. Chojnacki — Biosynteza fosfolipidów	119
Zmiany w fizjologicznych i biochemicznych właściwościach mięśni i serca żaby pod wpływem odwadniania i uwadniania (M. Dydyńska)	135
Niektóre zagadnienia metabolizmu aniliny z punktu widzenia ilościowej oceny wchłaniania tego związku u robotników w przemyśle (J. Piotrowski)	136
Struktura peptydowa kwasów proteinowych (M. Sarnecka-Keller)	137
Enzymy proteolityczne soku trzustkowego i soku jelitowego psa (Z. Szafran)	138
Otrzymywanie analizy osocza ludzkiego i niektóre jej właściwości (A. Gryszkiewicz)	139
Esterazy soku trzustkowego i soku jelitowego psa (H. Szafran)	140
Międzynarodowa Unia Biochemiczna (J. Heller)	141
Sprawozdanie z Konferencji Chromatograficznej w Pradze (J. Opieńska-Blauth)	145
Wykaz Władz i spis członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w 1961 roku	147

POSTĘPY BIOCHEMII

February 1962

Volume 8

Number 1

CONTENTS

Z R. Grabowski — Some Methods of Enzyme Kinetics (Institute Physic. Chem. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	3
I. Szumieli — The Stereospecificity of Enzymes (Dep. Biochem. Univ. Warszawa)	29
Z. Kasprzyk — The Primary Reactions in Photosynthesis (Dep. Biochem. Univ., Warszawa)	53
L. Wojtczak — Oxydative Phosphorylation (Institute Exptl. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	73
E. Nalborczyk — Application of Tritium in Biochemical and Biological Investigations (Dep. Plant Physiol. Centr. College Agricult., Warszawa)	95
K. Langowska and Z. Roth — Muramic Acid (Dep. Physiol. Chem. School Med., Poznań)	109
T. Chojnacki — The Biosynthesis of Phospholipids (Institute Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	119
Chronicle	135

WARUNKI PRENUMERATY

POSTĘPY BIOCHEMII

Kwartalnik

Cena w prenumeracie zł 80.— rocznie
zł 40.— półrocznie

Zamówienia i wpłaty przyjmują:

- Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw „Ruch” Warszawa, ul. Srebrna 12, konto PKO nr 1-6-100.020.
- Urzędy pocztowe i listonosze.
- Księgarnie Domu Książki.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę — 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch”, Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100.024.

Bieżące numery do nabycia w księgarniach naukowych „Domu Książki” oraz w Ośrodku Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych Polskiej Akademii Nauk — wzorcownia Wydawnictw PAN — Ossolinemu — PWN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter).

TYLKO PRENUMERATA
ZAPEWNI REGULARNE
OTRZYMYWANIE CZASO-
PISMA

INFORMACJE I WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

1. *Postępy Biochemii* publikują artykuły referatowe ze wszystkich dziedzin biochemii nie drukowane w innych czasopismach. Artykuły drukowane w *Postępkach Biochemii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych czasopismach.

2. Prace należy przysyłać do Redakcji w 2 egzemplarzach maszynopisu i wszelkich załączników. Powinny one odpowiadać podanym dalej wskazówkom.

Nieodpowiednio przygotowane maszynopisy lub załączniki nie będą rozpatrywane przez Redakcję i będą odsyłane Autorom.

3. Maszynopis powinien być pisany jednocześnie z podwójną interlinią, z marginesem około 4 cm po lewej stronie i około 1 cm po prawej stronie, oraz z numeracją stron. W tekście maszynopisu nie należy robić żadnych podkreśleń na maszynie ani atramentem. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek.

4. Na pierwszej stronie maszynopisu należy zamieścić tylko informacje w następującej kolejności: imiona i nazwiska autorów, tytuł pracy (w języku polskim i angielskim), omówienie tematu pracy (w języku angielskim), stopnie i tytuły naukowe autorów wraz z nazwami placówek naukowych.

Imiona należy podawać w pełnym brzmieniu. Przy każdym nazwisku powinien znajdować się odsyłacz gwiazdkowy do notki, tj. *, ** itd. (bez nawiasu).

Omówienie tematu pracy może obejmować najwyżej 5 wierszy maszynopisu. Przekład na język angielski może być dokonany w redakcji i w tym przypadku należy pozostawić wolne miejsce w maszynopisie, zaś na oddzielnej kartce dołączyć polski tekst omówienia.

Na dole pierwszej strony maszynopisu należy zamieścić notki oznaczone odsyłaczami gwiazdkowymi (jak przy nazwiskach). Tekst notki powinien być podany następująco. * Dr, adiunkt Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w ...

5. Właściwy tekst pracy rozpoczyna się od drugiej strony maszynopisu. W przypadku podziału tekstu na rozdziały i podrozdziały należy ich tytuły oznaczyć odpowiednio numeracją rzymską I., II. itd. oraz arabską 1., 2. itd. Tekstowe tytuły (tj. nie wydzielone z tekstu) nie powinny być numerowane.

W tekście nie należy zamieszczać żadnych tablic, rysunków ani schematów. W tych przypadkach należy pozostawić wolny wiersz maszynopisu w żądanym miejscu i odpowiednio oznaczyć, Tablica 1, Rys. 1, Schemat 1.

Ta sama wskazówka odnosi się do pojedynczych wzorów chemicznych i innych. Żądane miejsce w wolnym wierszu zaznacza się wówczas odpowiednim numerem w nawiasach, do którego należy odwołać się po odpowiednim słowie tekstu, np. kwas glutaminowy (I).

Odwoływanie się w tekście do notek wyjaśniających może być stosowane tylko w wyjątkowych przypadkach.

6. Cytowaną literaturę należy wypisać oddzielnie na ostatniej stronie (stronach) maszynopisu, wymieniając pozycje w alfabetycznej kolejności nazwisk autorów. W wykazie powinny być podane kolejno: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery imion, skrócony tytuł czasopism, tom (podkreślony), stronica i rok wydania (w nawiasach), np. 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202, 793 (1953) Należy wymienić nazwiska wszystkich współautorów w kolejności podanej w oryginalnej pracy.

Wykaz stosowanych skrótów czasopism podają *Post. Biochem.* 7, 601 (1961).

Dla cytowanych książek (nie czasopism) należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora, tytuł dzieła, miejsce i rok wydania, np. Przyłęcki S. J., *Podręcznik chemii fizjologicznej*, Łódź 1947. W przypadku odwoływania się do artykułu w pracy zbiorowej należy dodatkowo podać tom i nazwiska wydawców (redaktorów) dzieła po tytule oraz na końcu — stronicie, np. Schneider W. C., *Methods in Enzymology*, tom III, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, New York 1957, str. 680.

Odwoływanie się w tekście na odnośną pozycję cytowanej literatury następuje przez wymienienie liczby porządkowej pozycji w nawiasach, np. (10).

7. Załączniki do pracy obejmują tablice, rysunki, schematy, wzory itp. Wszystkie powinny być oznaczone u góry nazwiskiem autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tablice należy dołączyć na oddzielnych kartkach. Każda z nich powinna być oznaczona z prawej strony u góry kolejnym numerem arabskim, np. Tablica 1, oraz posiadać nagłówek opisujący jej treść. Sens tablic powinien być zrozumiały bez odnoszenia się do tekstu pracy, a każda rubryka — zaopatrzona w odpowiedni tytuł.

8. Wszelkie rysunki, wykresy i fotografie należy dołączyć do maszynopisu w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Wszystkie te załączniki należy oznaczyć jako rysunki i zaopatrzyć u dołu kolejnym numerem arabskim z podaniem właściwego ustawienia, np. Rys. 1 (dół).

Podpisy pod rysunki powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Po tytule należy podać odpowiednie objaśnienia lub uwagę (objaśnienia w tekście).

9. Schematy reakcji i pojedyncze wzory należy zamieścić na oddzielnej kartce (kartkach). Oznaczenia, których nie można napisać na maszynie, powinny być bardzo wyraźnie naniesione czarnym tuszem.

Schematy należy oznaczyć u dołu kolejnym numerem arabskim, np. Schemat 1, oraz właściwym podpisem (tytuł i objaśnienia).

Pojedyncze wzory powinny posiadać numery rzymskie zgodne z numeracją w tekście.

10. Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonania skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy. W przypadku konieczności wprowadzenia zmian w treści odsyła się Autorowi egzemplarz pracy dla dokonania poprawek; drugi — pozostaje w aktach redakcji.

11. Autora obowiązuje korekta autorska, którą należy zwracać redakcji w ciągu 3 dni. Korektę należy wykonać kolorowym (nie czerwonym) ołówkiem.

Koszty spowodowane zmianami tekstu w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor.

12. Artykuły są honorowane według ustalonych stawek. Autorzy otrzymują 25 bezpłatnych odbitek pracy. Żądanie większej ilości odbitek (płatnych) należy zgłosić pisemnie przy zwrocie korekty autorskiej.