

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 25 (2)
113-283 (1979)

1979

tom 25 nr 2

PL ISSN 0032-5422



PW

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu jedynie piśmiennictwo z ostatniego roku lub dwu lat. Kwartalnik publikuje także krótkie noty informujące o nowych i ważniejszych osiągnięciach biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

Forma maszynopisu: maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie; nie może zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

Układ maszynopisu: strona okładowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy, na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, adres prywatny, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim), oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i jego (ich) miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

Strona 2 i następne obejmują tekst pracy do spisu piśmiennictwa włącznie, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin na stronach końcowych.

Dla przejrzystości tekstu obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły rzeczowo winny informować o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I-1.). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku np. kwas glutaminowy (I).

Redakcja prosi autorów o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o niewprowadzanie do tekstu tworzonych doraźnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

Palubski

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1979 TOM 25 ZESZYT 2

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 25(2)
113—283 (1979)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Zastępca: W. Ardelt (Warszawa)

Sekretarz: I. Szumił (Warszawa)

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Bagdasarian (Warszawa), M. Choraży (Gliwice), W. Drabikowski (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), J. Gregorczyk (Szczecin), B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Legocki (Poznań), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa)

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

SEKRETARZ REDAKCJI

M. Balińska

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (Warszawa), E. Czuryło (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

W opracowaniu zeszytu wzięli udział A. Jerzmanowski (Warszawa) i J. Rytkowa (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1979

Nakład 2.310	Oddano do składania 15.II.1979 r.
Ark. wyd. 12,75, ark. druk. 10,75	Podpisano do druku w czerwcu 1979 r.
Pap. druk. sat. kl. IV, 70 g, 70×100	Druk ukończono w czerwcu 1979 r.
Zam. nr 237/79	Cena zł 20,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

DO AUTORÓW I CZYTELNIKÓW

OD REDAKCJI I RADY REDAKCYJNEJ POSTĘPÓW BIOCHEMII

Zbliża się do końca 25-ty tom *Postępów Biochemii* a z nim pierwsze dwudziestopięcioletnie naszego kwartalnika. Jubileuszowe daty zwykle są okazją do refleksji o charakterze raczej retrospektywnym, my zaś pragniemy się podzielić z naszymi Autorami i Czytelnikami refleksjami dotyczącymi przyszłości a nie przeszłości. Chcemy wspólnie z Wami zastanowić się, jaki ma być nasz kwartalnik w latach nadchodzących, czy taki sam jak dotąd, czy też należy go zmienić, i jak?

Można by tutaj zapytać: dlaczego w ogóle rozważać potrzebę wprowadzania zmian, skoro *Postępy Biochemii* takie, jakimi były w chwili powstania, przetrwały pomyślnie przez tyle lat w niezmienionej formie. Są one jednym z nielicznych czasopism przeglądowych w naszym obszarze geograficznym uwzględnianych w *Current Contents*; posługują się nim liczne uczelnie na saminariach studenckich i doktoranckich; krąg czytelników jest szeroki i utrzymuje się na niezmienionym poziomie prawie po początku wydawania *Postępów Biochemii*. Ale — *tempora mutantur...* i z nimi zmieniają się potrzeby.

Postępy Biochemii powstały jako pismo, dostarczające wyczerpujących a jednocześnie stosunkowo zwięzłych informacji o stanie wiedzy w różnych dziedzinach biochemii. Nie ulega kwestii, że tak musi być również i w przyszłości. Założycielom *Postępów Biochemii* przyświecał jednak jeszcze jeden cel, który — choć nigdy formalnie nie ogłoszony — nakładał na redakcję poważne obowiązki i dużą odpowiedzialność: uczenie młodych adeptów biochemii sposobu pisania prac naukowych. Stąd też tak znaczną część artykułów stanowiły odpowiednio przepracowane wstępy do rozpraw doktorskich i habilitacyjnych. W rezultacie w *Postęпах Biochemii* przeważały artykuły monograficzne przeznaczone głównie dla tych, którzy chcieli się zapoznać z jakąś dziedziną biochemii, często w związku z podejmowaniem nowego, czy pierwszego tematu pracy badawczej. Dziś jednak ówczesni młodzi adepci biochemii, a obecnie docenci i profesorowie, sami schylają swoje posiwiśle skronie (lub powinni to czynić...) nad mniej lub bardziej udanymi manuskryptami swych uczniów. Funkcja dydaktyczna *Postępów Biochemii*, choć nadal nie mniej ważna, schodzi jednak na nieco dalszy plan nowe bowiem pojawiają się potrzeby.

Wszędzie na świecie narastają trudności w nadążaniu za piśmiennictwem w związku z wykładniczo rosnącą liczbą publikacji coraz bardziej

rozproszonych w coraz liczniejszych czasopismach. U nas trudności takie odczuwa się tym dotkliwiej, że biblioteki są na ogół ubogie i pogarsza się dostęp do czasopism a nawet wydawnictw zbiorczych „*Annual Reviews...*”, czy „*Advances in...*”, *Postępy Biochemii* winny łagodzić tę niebezpieczną dla rozwoju naszej dyscypliny sytuację w miarę swoich możliwości. Nie zamierzamy jednak odwołać naszych Autorów od pisania wąskotematycznych artykułów **typu monograficznego**, lecz chcemy zachęcać do pisania również artykułów nieco szerzej traktujących omawiane problemy, stanowiących **przegląd najnowszych osiągnięć** w wybranej dziedzinie. W odróżnieniu od artykułów monograficznych artykuły o szerszej tematyce należy, podobnie jak w „*Annual Reviews...*” adresować nie do czytelnika wchodzącego w nowy dla niego dział biochemii, lecz do biochemika, który w danej dziedzinie już pracuje, aby mu ułatwić herkulesowy (a może — jak by powiedział pesymista — syzyfowy) trud przyswajania sobie potrzebnego mu piśmiennictwa. Nie mogą to być, oczywiście, proste kompilacje, lecz wewnętrznie spójne, poprawne językowo prace z odnośnikami do piśmiennictwa za ostatni rok lub dwa lata. Wolne od gwary laboratoryjnej takie artykuły przeglądowe cechować może język nieco bardziej hermetyczny niż stosowany w typowych artykułach monograficznych.

We wszystkich naukach ścisłych a przede wszystkim w naukach biologicznych, obserwuje się już od szeregu lat szczególne zjawisko: z jednej strony — wąska specjalizacja staje się warunkiem osiągnięcia efektywnego postępu w badaniach, z drugiej zaś — szybko narasta współzależność rozwoju między różnymi pozornie odległymi dyscyplinami wiedzy. Wytwarza się sytuacja konfliktowa, żeby nie powiedzieć kompleksorodna, będąca przedmiotem troski wielu czasopism (i nie tylko czasopism) na świecie. Pamiętając, że *Postępy Biochemii* są pismem biochemicznym a nie ogólnonaukowym chcielibyśmy choćby anonsować naszym czytelnikom różne ważne, czy nawet tylko potencjalnie ważne osiągnięcia naukowe w rozmaitych dziedzinach biochemii i nauk pokrewnych, za nim zostaną one omówione w szerszym artykule. Dlatego też planujemy utworzenie w *Postęпах Biochemii* działu pod tytułem „**Nowe w biochemii**”. Publikować tu będziemy krótkie, 1-2 stronicowe noty oparte na kilku zaledwie, ściśle ze sobą związanych publikacjach. Autor takiej noty winien jasno wyłożyć dlaczego uważa, że omawiany przez niego temat jest ważny i uczynić to językiem prostym, dostępnym dla niespecjalisty, bez pseudo-popularyzującej manieri. Jest to zadanie trudne, ale — wbrew pozorom — przynoszące uznanie i wdzięczność czytelników. To, co nazywa się „cyklem produkcyjnym” wydawnictwa, a na co Redakcja *Postępów Biochemii* nie ma żadnego wpływu, sprawia, że termin ukazania się noty w dziale „**Nowe w biochemii**” wynosić będzie 6—7 miesięcy. Robimy jednakże starania, aby parę not móc publikować w każdym zeszycie w czasie krótszym.

Zamierzamy ponadto wznowić dział: **Kronikę z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego** i dążyć by w miarę nadsyłanych materiałów,

pojawiał się on w każdym zeszycie. Utrzymane zostaną działy: **Sprawozdania i Recenzje**. Postępy Biochemii od pewnego czasu otrzymują wiele książek do recenzji od różnych wydawnictw zagranicznych; zadziwiający jest fakt, że wydawnictwa polskie swoich książek do recenzji nigdy nie przysyłają. Jak dotąd większość recenzji w naszym kwartalniku miała dość formalny charakter. Zamierzamy tu proponować pewną inowację. Z zazdrością bowiem można czytać — w wielu nie tylko humanistycznych czasopismach — piękne nieraz obszerne recenzje oceniające na szerszym tle omawiane w książce zagadnienia i poglądy oraz sposób ich przedstawienia. Otóż taki właśnie rodzaj recenzji, zbliżony bardziej do eseju niż do suchego streszczenia, chcielibyśmy częściej widzieć w Postęпах Biochemii. Prosimy o zgłaszanie gotowości do pisania takich recenzji z podaniem tematyki i preferowanego języka książki. Autor recenzji oprócz honorarium otrzymuje oczywiście książkę na własność.

Przedstawiliśmy nasze refleksje i wynikające z nich propozycje. Prosimy o ich dyskusję oraz dalsze sugestie i wnioski — w redagowaniu bowiem czasopisma niezmiennie potrzebny jest kontakt z czytelnikami. Kwartalnik nasz jest wspólnym dobrem całej społeczności biochemicznej i nie może w pełni spełniać swego zadania, jeżeli Czytelnicy nie stają się współtwórcami jego programu wydawniczego.

KRYSTIAN KALETHA *)

Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej przy użyciu scałkowanej postaci równania szybkości reakcji

The Evaluation of the Kinetic Constants of Enzyme-Catalysed Reaction with the Use of Integrated Rate Equation

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Scałkowana postać równania szybkości reakcji enzymatycznej
- II-1. Reakcje niehamowane przez nagromadzający się produkt
- II-2. Reakcje hamowane przez nagromadzający się produkt
- II-3. Reakcje odwracalne i wielosubstratowe
- III. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Integrated rate equation for enzyme-catalysed reaction
- II-1. Reactions uninhibited by the product
- II-2. Reactions inhibited by the product
- II-3. Reversible and multisubstrate reactions
- III. Concluding remarks

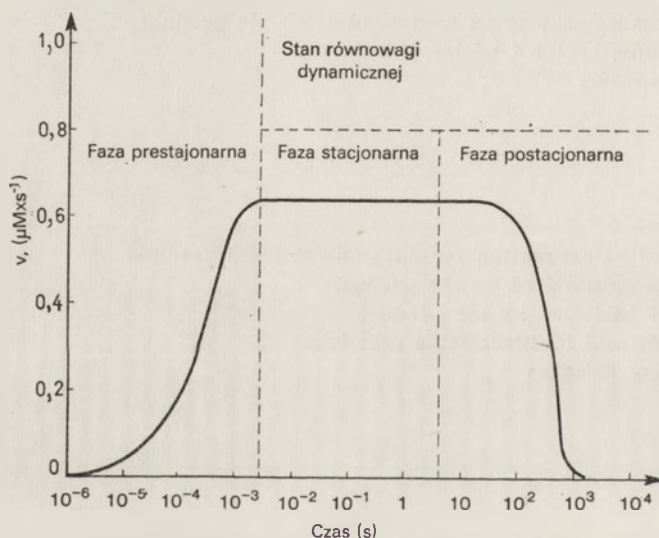
I. Wstęp

W przebiegu każdej reakcji enzymatycznej wyróżnić możemy trzy, wyraźnie oddzielone od siebie w czasie fazy (1). Pierwsza z nich zwana prestacjonarną lub przejściową (*transient phase*) trwa bardzo krótko (kilka milisekund) i rozpoczyna się z chwilą dodania enzymu do mieszaniny inkubacyjnej. Zgodnie z klasyczną teorią Michaelisa prowadzi to do na-

*) Dr, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Medycznej, Akademia Medyczna, Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

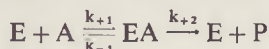
Autor uczestniczy w realizacji Problemu MR II-15 01, 02 koordynowanego przez Politechnikę Wrocławską.

tychmiastowego wytworzenia się kompleksu enzym-substrat (EA), który po uprzedniej aktywacji rozkłada się z odtworzeniem wolnej formy enzymu (E) i wytworzeniem produktu reakcji (P). W fazie prestacjonarnej, stężenie kompleksu EA początkowo szybko wzrasta, po czym szybkość jego tworzenia zostaje zrównoważona szybkością rozkładu. Wtedy stężenie kompleksu enzym-substrat ustala się na określonym poziomie a szybkość reakcji osiąga wartość stałą — rozpoczyna się druga faza reakcji zwana fazą stacjonarną lub inaczej fazą szybkości początkowej (*initial velocity phase*). Charakterystyczną cechą fazy stacjonarnej jest to, że w czasie jej trwania ilość wytwarzanego w jednostce czasu produktu (lub rozkładanego w jednostce czasu substratu) jest stała — zatem w fazie tej reakcja enzymatyczna przebiega wedle kinetyki rzędu zerowego. Faza stacjonarna w przeciwieństwie do prestacjonarnej trwa wystarczająco długo, aby możliwe było dokonanie odpowiednich pomiarów szybkości reakcji bez pomocy technik wymagających specjalnej aparatury. Z chwilą, kiedy stężenie zużywającego się substratu obniży się na tyle, że przestaje wysycać enzym, kinetyka reakcji enzymatycznej zmienia się z zerorzędowej na pierwszorzędową i rozpoczyna się trzeci, ostatni etap reakcji zwany fazą poststacjonarną (Ryc. 1).



Ryc. 1. Skala czasowa reakcji enzymatycznej przebiegającej wedle mechanizmu Michaelisa (schemat 1): $k_{+1} = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-1} = 10^3 \text{ s}^{-1}$, $k_{+2} = 10^2 \text{ s}^{-1}$, $k_{-2} = 0$, $[A]_0 = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[E]_0 = 10^{-8} \text{ M}$ (19).

W reakcji enzymatycznej przebiegającej wedle najprostszego, ujętego w schemacie 1 mechanizmu,



Schemat 1

produkt wytwarza się w drugim etapie reakcji określonym przez stałą szybkości k_{+2} , a szybkość reakcji wyrażona zużyciem substratu w czasie określona jest wzorem:

$$(I.1) \quad v = \frac{-d[A]}{dt} = k_{+2}[EA].$$

Chwilowe stężenie kompleksu EA determinujące szybkość reakcji przebiegającej wedle schematu 1 wyraża się różnicą szybkości jego tworzenia i rozkładu. Mając na względzie równanie zachowania masy,

$$(I.2) \quad ([E]_0 - [EA]) + [EA] = [E]_0$$

szybkość zmian stężenia kompleksu EA przedstawić można równaniem,

$$(I.3) \quad \frac{d[EA]}{dt} = k_{+1}([E]_0 - [EA])[A] - k_{-1}[EA] - k_{+2}[EA],$$

skąd otrzymujemy, że:

$$(I.4) \quad [EA] = \frac{k_{+1}[E]_0[A] - d[EA]/dt}{k_{+1}[A] + k_{-1} + k_{+2}}.$$

W pierwszej, prestacjonarnej fazie reakcji stężenie kompleksu EA w mieszaninie inkubacyjnej szybko wzrasta, stąd wzór określający jego stężenie, otrzymany po scałkowaniu równania (I.3.) ma następującą postać:

$$(I.5) \quad [EA] = \frac{k_{+1}[E]_0[A] \{1 - \exp[-(k_{+1}[A] + k_{-1} + k_{+2})t]\}}{k_{+1}[A] + k_{-1} + k_{+2}}$$

Po podstawieniu powyższego do zależności I.1. otrzymujemy równanie szybkości enzymatycznej w fazie prestacjonarnej:

$$(I.6) \quad v = \frac{V[A] \{1 - \exp[-(k_{+1}[A] + k_{-1} + k_{+2})t]\}}{K_m + [A]},$$

gdzie $K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$ określa tzw. stałą Michaelisa, a $V = k_{+2}[E]_0$ szybkość maksymalną reakcji.

Zgodnie z założeniami Briggsa i Haldane'a po krótkim czasie odpowiadającym fazie prestacjonarnej w mieszaninie inkubacyjnej dochodzi do ustalenia się tzw. stanu równowagi dynamicznej (steady state). W stanie równowagi dynamicznej chwilowe zmiany stężenia kompleksu enzym—substrat są tak niewielkie, że wobec dużej szybkości tworzenia tego kompleksu uznać je można za nieistotne ($k_{+1}[E]_0[A] \gg d[EA]/dt$) i popołniając niewielki błąd przyjąć za stałe, tzn. $d[EA]/dt = 0$. W tej sytuacji wyrażenie w liczniku we wzorze (I.4.) upraszcza się a równanie szybkości reakcji enzymatycznej w fazie stacjonarnej przyjmie postać:

$$(I.7) \quad v = \frac{k_{+1}k_{+2}[E]_0[A]}{k_{+1}[A] + k_{-1} + k_{+2}} = \frac{V[A]}{K_m + [A]}.$$

Przyjęte przez Briggsa i Haldane'a założenia istnienia stanu równowagi dynamicznej stanowią podstawę do wyprowadzenia większości równań kinetycznych w enzymologii. Istnieje kilka równoważnych sposobów definiowania warunków koniecznych do osiągnięcia stanu równowagi dynamicznej w przebiegu reakcji enzymatycznej; zawsze jednak zakłada się spełnienie następujących założeń (2):

a) stężenie kompleksu pośredniego (tzn. kompleksu EA) jest stałe, lub co najwyżej szybkość zmian jego stężenia jest minimalna w porównaniu z szybkością reakcji (tzn. $d[EA]/dt \approx 0$).

b) szybkość zużywania się substratu oraz wytwarzania się produktu w czasie są jednakowe i stałe (tzn. $-d[A]/dt = d[P]/dt = \text{const}$).

c) stężenie substratu jest znacznie wyższe od stężenia enzymu (tzn. $[A] \gg [E]_0$).

Po osiągnięciu stanu równowagi dynamicznej, we wczesnym okresie przebiegu reakcji, kiedy aktualne stężenie substratu nie odbiega zbyt od stężenia wyjściowego, a stężenie nagromadzającego się produktu jest jeszcze minimalne, przyjęcie założenia: $[A] = [A]_0$ oraz $[P]_0 = 0$, gdzie $[A]_0$ i $[P]_0$ to odpowiednio stężenia substratu i produktu w czasie $t = 0$, nie wpływa istotnie na wartość wyznaczonych parametrów kinetycznych. W późniejszym jednak okresie przebiegu reakcji zmiany w stężeniu substratu i produktu są już tak znaczne, że założenie powyższe przestaje być słuszne, a stężenie kompleksu EA wyraża się teraz wzorem:

$$(I.8) \quad [EA] = \frac{k_{+1}[E]_0([A]_0 - [P])}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}([A]_0 - [P])}$$

Stąd równanie szybkości reakcji enzymatycznej w poststacjonarnej fazie jej przebiegu ma postać następującą:

$$(I.9) \quad v = \frac{k_{+1}k_{+2}[E]_0([A]_0 - [P])}{k_{-1} + k_{+2} + k_{+1}([A]_0 - [P])} = \frac{V([A]_0 - [P])}{K_m + [A]_0 - [P]}$$

II. Scałkowana postać równania szybkości reakcji enzymatycznej

Równanie kinetyczne przedstawić można w dwu różnych postaciach

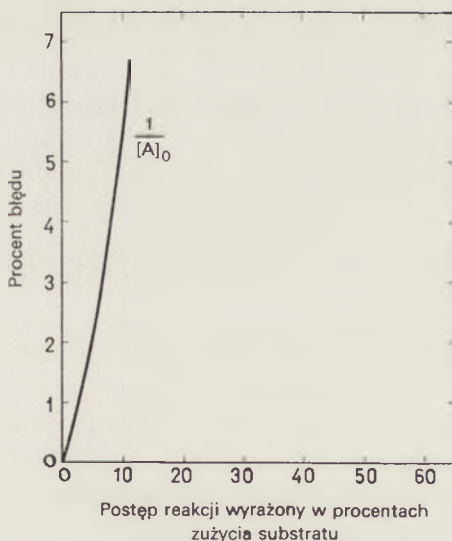
a) jako zależność wyrażającą zmiany stężenia reaktantów w czasie, lub

b) jako zależność wyrażającą szybkość reakcji od zmian stężenia reaktantów.

W przeciwieństwie do chemików, którzy w swych badaniach preferują pierwszy ze sposobów opisywania badanych procesów kinetycznych, biochemicy w swych badaniach wyłącznie prawie korzystają z drugiego. Sytuacja ta ma swoje uwarunkowanie historyczne. Próby prostego przeniesienia zasad wyprowadzania równań kinetycznych stosowanych przy

badaniu zwykłych, niekatalizowanych reakcji chemicznych na reakcje biologiczne napotkały na wiele zasadniczych trudności związanych ze specyfiką tych reakcji, o której niewiele wiadziiano w latach kiedy przystępowano do badań enzymologicznych. Wykazanie przez Michaelisa i Menten, że stosując pomiary początkowych szybkości reakcji trudności te w znacznym stopniu można wyeliminować, spowodowało całkowite prawie zarzucenie pierwszej z wymienionych metod badawczych. Wprowadzona przez tych badaczy, obecnie powszechnie stosowana metoda badań kinetycznych polega na przeprowadzaniu w warunkach stanu równowagi dynamicznej pomiarów początkowej szybkości reakcji dla szeregu różnych początkowych stężeń substratu. Wyliczone początkowe szybkości reakcji stanowią następnie podstawę do wyznaczenia podstawowych parametrów kinetycznych reakcji takich jak stała Michaelisa (K_m) i szybkość maksymalna (V), najczęściej w oparciu o różnorodne metody graficzne bazujące na różniczkowej postaci równania szybkości reakcji (równanie 1.7.).

Zaletą badań przeprowadzanych w tych warunkach jest to, że pozwalają one wykluczyć z rozważań komplikujący wpływ jaki na przebieg reakcji wywierają efekty związane z nadmiernym zużyciem się substratu jak i nagromadzeniem się produktu w czasie przebiegu reakcji. Fakt ten, jak również wynikająca z pewnego schematyzmu prostota postępowania przy opracowywaniu wyników, jest główną jak się wydaje przyczyną dużej popularności metody wyznaczenia parametrów kinetycznych reakcji opartej o pomiar szybkości początkowych, mimo iż dla wyznaczenia ich wymagana jest niekiedy znaczna liczba pomiarów. Metoda ta obciążona jest jednakże pewnymi wadami, wśród których wymienić należy przede wszystkim to, że w wielu wypadkach dokładne wyliczenie ekstrapolo-



Ryc. 2. Zależność dokładności obliczeń szybkości początkowej reakcji od stopnia zaawansowania jej przebiegu (3).

wanej do czasu zerowego szybkości początkowej nie jest możliwe. Aby otrzymana z pomiarów doświadczalnych szybkość reakcji stanowiła dobre przybliżenie szybkości początkowej, zgodnie z wspomnianymi wyżej założeniami, wymaga się aby stopień zaawansowania reakcji nie był zbyt duży. Wykazano (3), że przy stopniu zaawansowania reakcji odpowiadającemu 10% zużycia substratu, przyjęcie założenia: $v = \Delta [A]/t$, gdzie $\Delta [A] = [A]_0 - [A]_t$, obciąża wartość wyliczonej szybkości reakcji błędem ponad 5% -towym (Ryc. 2). Ponadto metoda ta zaprzepaszcza wiele dodatkowych informacji jakie uzyskać można badając przebieg reakcji w dalszych jej stadiach. Na fakt ten zwraca ostatnio uwagę wielu badaczy starając się podkreślić znaczenie dokonania analizy kinetycznej pełnego przebiegu badanej reakcji enzymatycznej.

Próby wykorzystania dla analizy kinetycznej całej krzywej przebiegu reakcji enzymatycznej idą zasadniczo w dwu kierunkach. Większość z nich bazuje na scałkowanej postaci równania szybkości reakcji, podczas gdy niektóre inne (4, 5, 6) opierają się na różniczkowej jego postaci. Sposoby wyznaczania parametrów kinetycznych wykorzystujące analizę pełnej krzywej przebiegu reakcji podzielić możemy na graficzne i rachunkowe. Te ostatnie wykorzystują najczęściej technikę komputerową i opierają się na różnych metodach rachunku numerycznego i statystyki.

II-1. Reakcje niehamowane przez nagromadzający się produkt

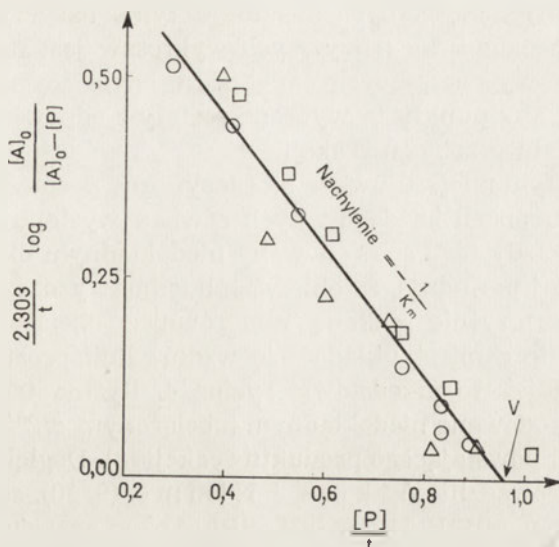
Pierwszymi, którzy wykorzystali scałkowaną postać równania Michaelisa w celu wyznaczenia parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej byli Walker i Schmidt (7). Na przykładzie reakcji katalizowanej przez dezaminazę histydyny wykazali oni, że równanie

$$(II.1) \quad Vt = [P] + K_m \ln \{ [A]_0 / ([A]_0 - [P]) \}$$

otrzymane w wyniku scałkowania w przedziale czasowym $[t_0 = 0, t]$ równania (I.9.), w warunkach kiedy przebieg reakcji determinowany jest jedynie zużywaniem się substratu, może być użyte do wyznaczenia stałej Michaelisa i szybkości maksymalnej bez potrzeby wyznaczania początkowych szybkości reakcji. Po przekształceniu równania (II.1.) do postaci:

$$(II.2) \quad \frac{1}{t} \ln \{ [A]_0 / ([A]_0 - [P]) \} = - \left(\frac{1}{K_m} \right) \frac{[P]}{t} + \frac{V}{K_m}$$

widać, że równanie to w układzie współrzędnych: $\frac{1}{t} \ln \{ [A]_0 / ([A]_0 - [P]) \}$ \div $\frac{[P]}{t}$ opisuje linię prostą przecinającą oś odciętych w punkcie o wartości równej V i o nachyleniu do tej osi równym $-1/K_m$ (Ryc. 3). Wobec zależności: $[A] + [P] = [A]_0$, równanie (II.1.) zapisać możemy w innej, równoważnej postaci:



Ryc. 3. Wyznaczenie stałej Michaelisa (K_m) i szybkości maksymalnej reakcji (V) na przykładzie reakcji hydrolizy histydyny, katalizowanej przez dezaminazę histydyny (7).

Różne symbole na wykresie odpowiadają różnym czasom inkubacji: (○) 2 godz., (△) 3 godz., (□) 4 godz.

$$(II.3) \quad Vt = ([A]_0 - [A]) + K_m \ln([A]_0/[A]),$$

skąd otrzymujemy dalej zależność:

$$(II.4) \quad \frac{([A]_0 - [A])}{t} = V - \frac{K_m}{t} \ln([A]_0/[A]).$$

Dokonując innych przekształceń równania II.3. otrzymamy dwie dalsze zależności liniowe:

$$(II.5) \quad \frac{t}{\ln([A]_0/[A])} = \frac{1}{V} \left[\frac{([A]_0 - [A])}{\ln([A]_0/[A])} \right] + \frac{K_m}{V}$$

$$(II.6) \quad \frac{t}{([A]_0 - [A])} = \frac{K_m}{V} \left[\frac{1}{([A]_0 - [A])} \right] \ln([A]_0/[A]) + \frac{1}{V}.$$

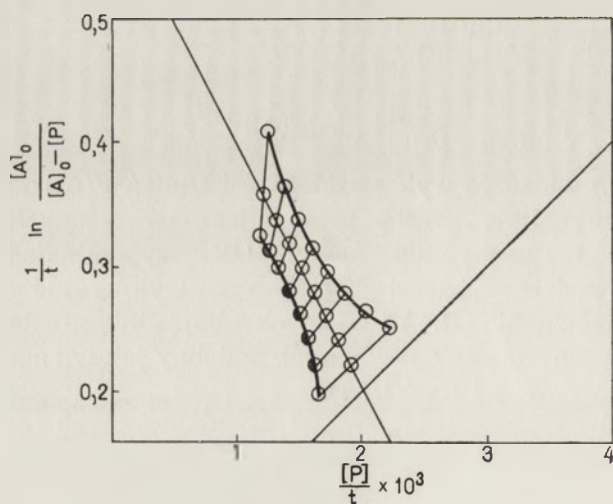
Z postaci równania (II.5.) widać, że wykres zależności $t/\ln([A]_0/[A])$ od $([A]_0 - [A])/\ln([A]_0/[A])$ opisuje linię prostą przecinającą oś rzędnych w punkcie o wartości K_m/V i o nachyleniu równym $1/V$ przypominając tym znany, stosowany w metodzie szybkości początkowych wykres zależności $[A]/v$ od v . Podobnie równania (II.4.) i (II.6.) określają linię prostą wyznaczającą kinetyczne parametry reakcji w sposób podobny jak w znanych wykresach zależności $v \div v/[A]$ i $1/v \div 1/[A]$.

Omówione wyżej sposoby wyznaczania parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej przebiegającej wedle schematu 1, są proste w konstrukcji i posiadają tę zaletę, że teoretycznie umożliwiają ich wyznaczenie

na podstawie danych uzyskanych z jednego tylko eksperymentu. Rzeczą ważną przy konstruowaniu powyższych wykresów jest nie tylko to, aby liczba punktów wyznaczających linię prostą była wystarczająco duża, lecz również to, aby punkty te wybrane zostały z odpowiednio rozległego czasowo przedziału przebiegu reakcji.

Zwróćmy w tym miejscu uwagę na specyficzną postać równań (II.4.)—(II.6.). Po obu stronach każdego z tych równań występuje zmienna $[A]$. W tej sytuacji każdy błąd spowodowany niedokładnym określeniem wartości tej zmiennej powoduje, że obie współrzędne wyznaczające położenie punktów na płaszczyźnie zostaną nim również obciążone, w związku z czym punkty te zamiast układać się wzdłuż linii prostej układają się wzdłuż krzywej jak to przedstawia rycina 4. Rycina ta ilustruje zniekształcenia spowodowane niedokładnym (obciążonym $\pm 2\%$ błędem) oznaczeniem stężenia powstającego produktu reakcji (8). Dogłębną analizę tego problemu przeprowadzili Atkins i Nimmo (9, 10), stosując regresję liniową (11) zależności: $[P]/t \div 1/t \ln(1 - [P]/[A]_0)$ w oparciu o symulowane dla różnych wyjściowych stężeń substratu krzywe przebiegu reakcji. Jednym z ciekawszych wniosków jakie wyciągnięto na podstawie tej analizy było stwierdzenie wyraźnej zależności między początkowym stężeniem substratu a dokładnością i powtarzalnością wyliczeń szukanych parametrów. Wyniki uzyskiwane w warunkach, kiedy reakcję rozpoczynano przy stężeniach wyższych (w przybliżeniu równych lub wyższych aniżeli stężenie odpowiadające hipotetycznej stałej Michaelisa) były dokładniejsze i bardziej powtarzalne (10).

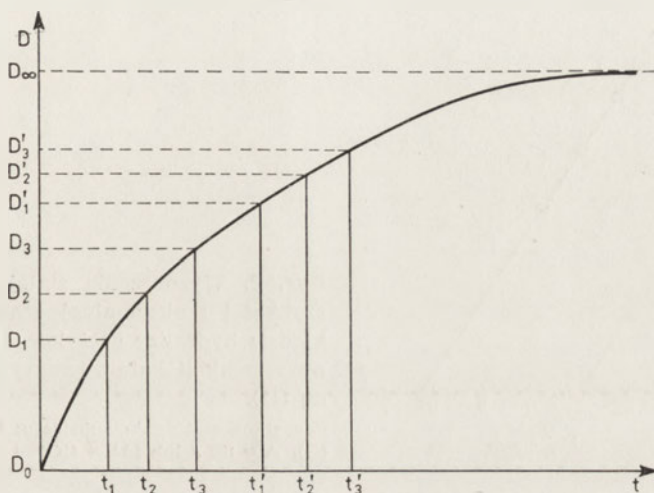
Inny sposób graficznego wyznaczania stałej Michaelisa oraz szybkości maksymalnej reakcji enzymatycznej, bazujący również na scałkowanej postaci równania szybkości reakcji, w którym współrzędne jej przebiegu (stężenie produktu, czas) wyrażono tym razem ich wartościami względnymi



Ryc. 4. Wpływ niedokładności w oznaczeniu stężenia powstającego produktu reakcji (P) na rozkład punktów na wykresie zależności $1/t \ln \frac{[A]_0}{[A]_0 - [P]}$ od $[P]/t$.

Punkty na linii prostej obrazują idealny, nieobciążony błędem rozkład punktów; punkty układające się na krzywych obrazują wpływ niedokładności wynikających z zawyżenia o 2% (krzywa górna), lub zaniżenia o 2% (krzywa dolna) prawidłowej wartości stężenia produktu.

mi podali Klesow i Berezin (12). Jeżeli D jest dowolnym, charakterystycznym parametrem, opisującym zachowanie się układu reagującego w czasie, np. absorbancja, to zmieniające się w czasie stężenie produktu reakcji (P) opisać można zależnością: $[P] = L(D - D_0)$, gdzie L jest pewnym współczynnikiem a D_0 i D oznaczają wartości jakie parametr D przyjmie odpowiednio w początkowym i bieżącym momencie reakcji. Dla dwu dowolnych punktów t_1 i $t'_1 = t_1 + \Delta$ na osi odciętych (Ryc. 5), gdzie



Ryc. 5. Wykres obrazujący przyrost stężenia produktu w czasie trwania reakcji enzymatycznej.

D jest dowolnym parametrem, który zmieniając swą wartość opisuje postęp reakcji (12).

Δ jest pewnym, ustalonym w danym doświadczeniu przyrostem zmiennej t , znaleźć można odpowiadające im poprzez przekształcenie (II.1.) punkty D_1 i D'_1 na osi rzędnych. Tak więc dla punktów t_1 i t'_1 mamy:

$$t_1 = \frac{L(D_1 - D_0)}{V} + \frac{K_m}{V} \ln \frac{D_\infty - D_0}{D_\infty - D_1},$$

$$t_1 + \Delta = \frac{L(D'_1 - D_0)}{V} + \frac{K_m}{V} \ln \frac{D_\infty - D_0}{D_\infty - D'_1},$$

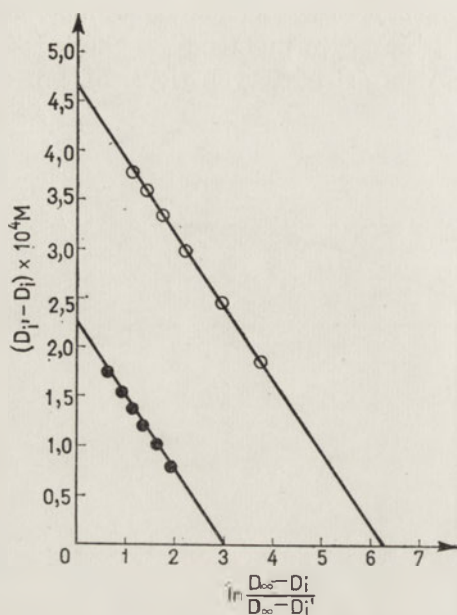
skąd otrzymujemy, że:

$$\Delta = \frac{L(D'_1 - D_1)}{V} + \frac{K_m}{V} \ln \frac{D_\infty - D_1}{D_\infty - D'_1}.$$

W ogólności dla dowolnej pary punktów t_i , t'_i słuszna jest zależność:

$$(II.7) \quad D'_i - D_i = \frac{V\Delta}{L} - \frac{K_m}{L} \ln \frac{D_\infty - D_i}{D_\infty - D'_i},$$

która wykreślona w układzie: $(D'_1 - D_i) \div \ln \frac{D_\infty - D_i}{D_\infty - D'_1}$ przedstawia linię prostą o nachyleniu $-K_m/L$, przecinającą oś rzędnych w punkcie $V\Delta/L$ (Ryc. 6).



Ryc. 6. Wyznaczenie stałej Michaelisa i szybkości maksymalnej reakcji na przykładzie hydrolizy acetylofenyloalanyliolizyny w reakcji katalizowanej przez trypsynę (12).

Początkowe stężenie substratu: $[A]_0 = 8 \times 10^{-4} \text{ M}$ (O), $\Delta = 150 \text{ s}$ lub $[A]_0 = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$ (●), $\Delta = 75 \text{ s}$.

Dwukrotne scałkowanie równania Michaelisa prowadzi do zależności postaci:

$$(II.8) \quad \frac{2 \int_0^{[A]_0} t d[A]}{[A]_0} - 2 t_0 = \frac{2 K_m}{V} + \frac{[A]_0}{V},$$

w którym wartość liczbową całki oznaczonej $S = \int_0^{[A]_0} t d[A]$ podzielona przez początkowe stężenie substratu $[A]_0$, przy warunku $t_0 = 0$, określa „funkcję pola”, czyli pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia substratu (produktu) w czasie przebiegu reakcji. Wykres zależności S od stężenia substratu, dla różnych wartości $[A]_0$ jest linią prostą o nachyleniu $1/V$, przecinającą oś rzędnych w punkcie $2 K_m/V$. Powyższy sposób wyznaczania parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej podany został przez Banfielda (13).

Gwałtowny rozwój techniki komputerowej w ostatnich latach spowodował wiele zmian w sposobach opracowywania uzyskanych z pomiarów doświadczalnych danych. W chwili obecnej istnieje szereg metod dokładnego wyznaczania parametrów reakcji enzymatycznej przy użyciu tej techniki. Metody te wykorzystują różnorodne, oparte na rachunku numerycznym i statystyce sposoby bezpośredniego rozwiązywania równania szybkości reakcji. W 1974 roku Fernley (14) ułożył program komputerowy dla

Tabela 1

Porównanie dokładności obliczeń wartości stałej Michaelisa (K_m) i szybkości maksymalnej reakcji (V) uzyskanych w wyniku przeprowadzenia analizy krzywej przebiegu reakcji dwiema różnymi metodami: metodą regresji liniowej (9) oraz metodą iteracyjną (14)

Wartości K_m i V są dokładnie równe jeden ($K_m = V = 1$)

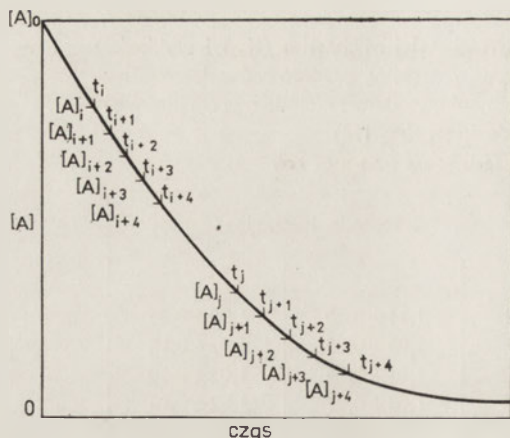
[A] ₀	metoda liniowa		metoda iteracyjna	
	K_m	V	K_m	V
0,5	0,60 ± 0,13	0,70 ± 0,11	1,11 ± 0,40	1,09 ± 0,35
0,7	0,84 ± 0,17	0,89 ± 0,13	1,03 ± 0,25	1,02 ± 0,18
1,0	0,94 ± 0,14	0,97 ± 0,10	1,01 ± 0,15	1,01 ± 0,10
1,4	1,02 ± 0,09	1,01 ± 0,06	1,03 ± 0,07	1,02 ± 0,04
2,0	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,03	1,01 ± 0,04	1,00 ± 0,02

prostej, efektywnej, iteracyjnej metody rozwiązywania równania postaci (II.1.) Istota postępowania w tej metodzie (metoda Newtona rozwiązywania równań nieliniowych (15)) polega na wielokrotnym „poprawianiu” przyjętych arbitralnie wartości K_m i V . „Poprawianie” to prowadzone jest aż do chwili, kiedy parametry te przyjmą wartości minimalizujące odchylenie średniokwadratowe wciąż od nowa wyliczanych, kolejnych wartości stężenia substratu $[\bar{A}]$ od wartości $[A]$ znajdujących z krzywej przebiegu reakcji. W porównaniu do metody Atkinosa i Nimmo (9) opartej na liniowej regresji zależności $[P]/t$ od $1/t \ln(1 - [P]/[A]_0)$ metodą Fernleya charakteryzuje duża precyzja i powtarzalność wyliczeń wartości szukaných parametrów również przy stosunkowo niskich, wyjściowych stężeniach substratu (16). Tabela 1 przedstawia wyniki obliczeń stałej Michaelisa i szybkości maksymalnej dla reakcji enzymatycznej przebiegającej wedle schematu 1 (str. 120), uzyskane po zastosowaniu obu wspomnianych wyżej metod.

Prosty i efektywny sposób wyznaczania parametrów kinetycznych z krzywej przebiegu reakcji przedstawili niedawno Shyun-Long i Suelter (17). Scałkowane równanie szybkości reakcji określone wzorem (II.1.) przekształcili oni do postaci identycznej formalnie z transformacją Lineweaver-Burke'a:

$$(II.9) \quad 1/\bar{v} = 1/V + K_m/V[\bar{A}],$$

gdzie $\bar{v} = ([A]_i - [A]_j)/\Delta t$ jest tzw. średnią szybkością reakcji, a $[\bar{A}] = ([A]_i + [A]_j)/2$ tzw. średnim stężeniem substratu w przedziale czasowym $\Delta t = t_i - t_j$. Podzielenie punktami krzywej przebiegu reakcji na odpowiednią liczbę równych przedziałów pozwala wyznaczyć dla każdego z nich wartość \bar{v} i $[\bar{A}]$ (Ryc. 7). Odwrotności tych wartości są współrzędnymi punktów układających się zgodnie z równaniem (II.9.) na linii prostej o nachyleniu K_m/V i przecinającej oś rzędnych w punkcie $1/V$. Błąd apro-



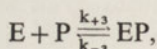
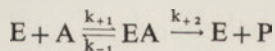
Ryc. 7. Wyznaczenie wartości \bar{v} oraz $[\bar{A}]$ z krzywej przebiegu reakcji enzymatycznej.

$[A]_0$ odpowiada początkowemu stężeniu substratu a $[A]_i$ stężeniu substratu w czasie t_i (17).

ksymacji wynikający z zastąpienia wartości v i $[A]$ odpowiednio przez \bar{v} i $[\bar{A}]$ zależy od wartości liczbowej stosunku $\Delta[A]_i/[A]_i$. Jeżeli długość przedziałów dzielących krzywą przebiegu reakcji jest tak dobrana, że $\Delta[A]_i/[A]_i < 0,3$, to błąd aproksymacji jest nieistotny (17). Uzyskane przy pomocy tego sposobu wyniki oznaczeń stałej Michaelisa i szybkości maksymalnej, przeprowadzonych na przykładzie konkretnych reakcji enzymatycznych (reakcja katalizowana przez AMP-aminohydrolazę mięśnia szkieletowego królika oraz przez kinazę pirogronianową z drożdży), dowiodły jego dużej użyteczności praktycznej ze względu na wysoką, porównywalną z uzyskiwaną w metodach opartych o wyznaczanie szybkości początkowych precyzję pomiaru. Praktycznie, na przykładzie reakcji katalizowanych przez dehydrogenazę mleczanową mięśnia szkieletowego królika oraz przez kwaśną fosfatazę bulwy ziemniaka sprawdzona została również użyteczność innego, opartego na analizie krzywej przebiegu reakcji enzymatycznej metodami regresji nieliniowej (11) sposobu wyznaczania parametrów kinetycznych reakcji, opublikowanego ostatnio w tym samym czasopiśmie (18).

II-2. Reakcje hamowane przez nagromadzający się produkt

Rozważania dotychczasowe ograniczały się do szczególnego, przedstawionego na schemacie 1 przypadku, w którym o reakcji enzymatycznej zakładano, że wytwarzany w trakcie jej przebiegu produkt nie wpływa hamująco na proces enzymatycznej katalizy. Rozpatrzmy teraz reakcję enzymatyczną przebiegającą wedle mechanizmu przedstawionego na schemacie 2:



Schemat 2

w którym zakładamy, że wytworzony w czasie reakcji produkt (P) jest inhibitorem kompetycyjnym enzymu. Równanie szybkości reakcji ma w tym przypadku postać następującą:

$$(II.10) \quad \frac{d[P]}{dt} = \frac{V([A]_0 - [P])}{K_m(1 + [P]/K_p) + [A]_0 - [P]},$$

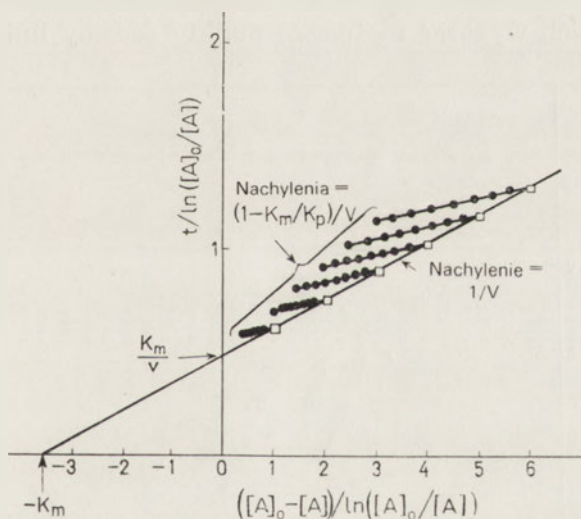
gdzie K_p jest stałą dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor. Po scałkowaniu otrzymujemy równanie:

$$(II.11) \quad Vt = (1 - K_m/K_p)([A]_0 - [A]) + K_m(1 - [A]_0/K_p) \ln([A]_0/[A]),$$

które przekształcić można w równanie następujące:

$$(II.12) \quad \frac{t}{\ln([A]_0/[A])} = \frac{1}{V} (1 - K_m/K_p) \left(\frac{([A]_0 - [A])}{\ln([A]_0/[A])} \right) + \frac{K_m}{V} (1 + [A]_0/K_p).$$

Z postaci tego równania widać, że wykres zależności $t/\ln([A]_0/[A])$ od $([A]_0 - [A])/\ln([A]_0/[A])$ dla różnych wartości $[A]_0$ (przy relacji $K_p < K_m$) generuje rodzinę linii prostych o nachyleniu $\frac{1}{V} (1 - K_m/K_p)$, przecinających oś rzędnych w punkcie o wartości równej $\frac{K_m}{V} (1 + [A]_0/K_p)$. Dla każdej linii prostej należącej do tej rodziny znaleźć można punkt odpowiadający warunkowi $t = 0$, którego współrzędne otrzymamy wyznaczając granice



Ryc. 8. Sposób wyznaczania parametrów kinetycznych w przypadku kompetycyjnego hamowania reakcji enzymatycznej przez nagromadzający się produkt.

Punkty na wykresie (●) reprezentują dane uzyskane z sześciu różnych, odpowiadających różnym wartościom $[A]_0$, krzywych przebiegu reakcji. Dla każdej wartości początkowego stężenia substratu $[A]_0$, otrzymano wartości ekstrapolowane do zerowego czasu reakcji (□) w przecięciu prostych przeprowadzonych przez punkty doświadczalne (●) z odpowiednią prostą $x = [A]_0$. Punkty doświadczalne wybrano z przedziału odpowiadającego od 20 do 80% zaawansowania reakcji (19).

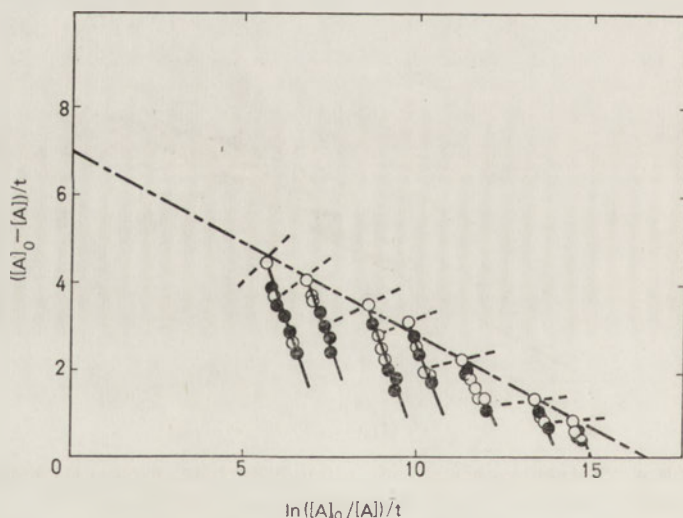
wyrażen $t/\ln([A]_0/[A])$ i $([A]_0 - [A])/\ln([A]_0/[A])$. Ponieważ: $\lim_{t \rightarrow 0} t/\ln([A]_0/[A]) = [A]_0/v_0$, a $\lim_{t \rightarrow 0} [([A]_0 - [A])/\ln([A]_0/[A])] = [A]_0$ przeto punkt odpowiadający warunkowi $t = 0$, leżący na każdej linii należącej do rodziny linii prostych równoległych otrzymanych dla różnych wartości $[A]_0$, ma współrzędne o wartości $[A]_0/v_0$ i $[A]_0$ (gdzie v_0 oznacza szybkość początkową reakcji) odpowiednio na osi rzędnych i odciętych (19). Linia prosta poprowadzona przez te punkty przecina oś rzędnych w punkcie K_m/V a oś odciętych w punkcie $-K_m$ i jest nachylona do niej pod kątem określonym wartością $1/V$. Ma ona zatem tę samą charakterystykę co linia prosta wykreślona w układzie $[A]_0/v_0 \div [A]_0$ w metodzie szybkości początkowych (Ryc. 8).

Równanie (II.12.) przekształcić można w równania postaci:

$$(II.13) \quad \begin{aligned} ([A]_0 - [A])/t &= [VK_p/(K_p - K_m)] - [K_m(K_p + [A]_0)] \\ &\ln([A]_0/[A])/t(K_p - K_m), \end{aligned}$$

$$(II.14) \quad \begin{aligned} t/([A]_0 - [A]) &= (K_p - K_m)/VK_p + [K_m(K_p + [A]_0)/VK_p] \\ &[\ln([A]_0/[A])/([A]_0 - [A])]. \end{aligned}$$

Z postaci tych równań widać, że wykresy zależności: $([A]_0 - [A])/t$ od $\ln([A]_0/[A])/t$ jak również $t/([A]_0 - [A])$ od $\ln([A]_0/[A])/([A]_0 - [A])$ dla różnych wartości $[A]_0$ opisują rodziny linii prostych o nachyleniu odpowiednio $-K_m(K_p + [A]_0)/(K_p - K_m)$ i $K_m(K_p + [A]_0)/VK_p$. W analogiczny jak wyżej sposób wykazać można, że punkty rodziny linii prostych wy-



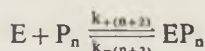
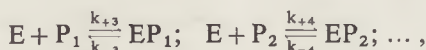
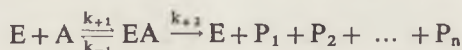
Ryc. 9. Wykres zależności $([A]_0 - [A])/t \div \ln([A]_0/[A])/t$ dla reakcji hydrolizy hydroksyamidu acetylotyrozyny katalizowanej przez chymotrypsynę.

Punkty na wykresie otrzymano z siedmiu różnych, odpowiadających różnym wartościom $[A]_0$, krzywych przebiegu reakcji. Wybrano je z przedziału odpowiadającego od 20 do 80% zaawansowania reakcji (20).

kreślonych dla różnych wartości $[A]_0$, spełniające warunek: $t = 0$, mają współrzędne odpowiednio v_0 i $v_0/[A]_0$ oraz $1/v_0$ i $1/[A]_0$. Linie proste poprowadzone przez punkty o tych współrzędnych mają zaś nachylenie odpowiednio $-K_m$ i K_m/V a przecinają oś rzędnych w punkcie V lub $1/V$, a więc analogicznie jak w dwu innych graficznych przedstawieniach liniowej transformacji równania Michaelisa stosowanych w metodzie szybkości początkowej (19, 20, 21, 22).

Rycina 9 przedstawia wykreśloną dla reakcji hydrolizy acetylotyrozynohydroksyamidu, katalizowanej przez chymotrypsynę zależność $([A]_0 - [A])/t \div \ln([A]_0/[A])/t$ w której to reakcji jeden z jej produktów (acetylotyrozyna) jest kompetycyjnym inhibitorem aktywności enzymatycznej (20).

Nie tak rzadko mamy do czynienia z reakcjami enzymatycznymi przebiegającymi z wytworzeniem kilku produktów z których każdy kompetycyjnie hamuje aktywność enzymu (Schemat 3):



Schemat 3

Równanie szybkości reakcji ma wtedy postać (20):

$$(II.15) \quad Vt = K_m \left(1 + [A]_0 \sum_{j=1}^n 1/K_{p_j} \right) \ln ([A]_0/[A]) + \left(1 - K_m \sum_{j=1}^n 1/K_{p_j} \right) ([A]_0 - [A]),$$

gdzie $K_{p_1}, K_{p_2}, \dots, K_{p_n}$ to odpowiednie stałe dysocjacji kompleksów utworzonych w trakcie odwracalnego wiązania się enzymu z produktami reakcji. W sytuacji tej wyznaczana stała inhibitorowa zdefiniowana jest następująco: $1/K_p = \sum_{j=1}^n 1/K_{p_j}$.

Mając do czynienia z reakcjami przebiegającymi wedle schematu 3 najczęściej chodzi nam o określenie efektu jaki na przebieg katalizy enzymatycznej wywiera osobno każdy z poszczególnych produktów. Dla dokonania tego Foster i Niemann (20) zalecają przeprowadzanie pomiarów przebiegu reakcji w obecności różnych, określonych stężeń każdego z produktów dodanego do mieszaniny inkubacyjnej przed rozpoczęciem reakcji. Równanie opisujące przebieg reakcji w tych warunkach ma postać:

$$(II.16) \quad Vt = (1 - K_m/K_p)([A]_0 - [A]) + K_m(1 + [A]_0/K_p + [i]/K_i) \ln ([A]_0/[A]),$$

gdzie $[i]$ jest stężeniem dodanego przed rozpoczęciem reakcji produktu, a K_1 stałą dysocjacji kompleksu enzymu z badanym produktem reakcji.

Podany przez Boomana i Niemann'a (23) sposób wyznaczania parametrów kinetycznych reakcji stanowi pewną modyfikację sposobu wyżej omówionego. Po scałkowaniu w przedziale $[t_0 = 0, t]$ równania:

$$-\frac{d[A]}{dt} = \frac{k'_{+2}[E][A]}{K'_m + [A]},$$

gdzie $k'_{+2} = k_{+2}K_p/(K_p - K_m)$, $K'_m = K_m(K_p + [A])/(K_p - K_m)$

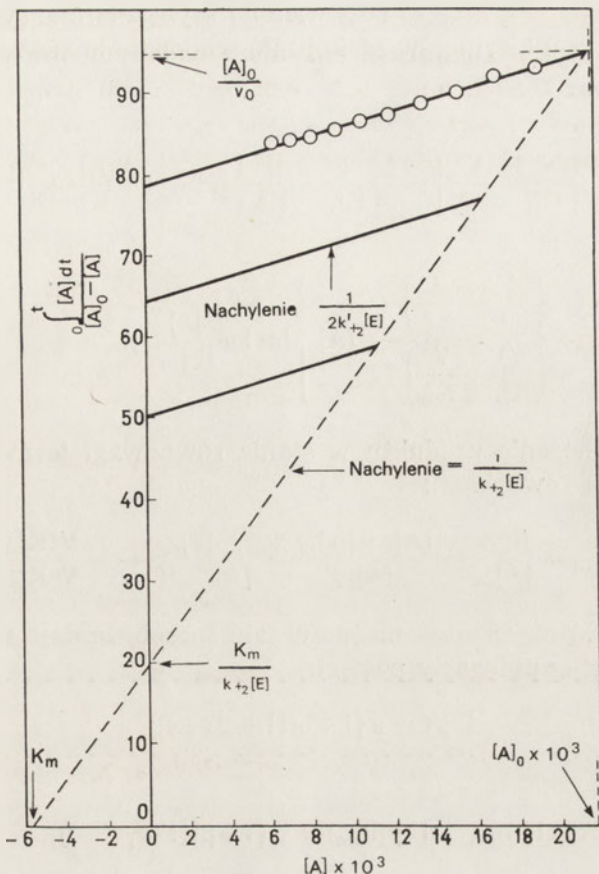
a $K_p = 1/(\sum_{j=1}^n 1/K_{p_j})$, otrzymanego po odpowiednim przekształceniu równania II.10. otrzymujemy zależność postaci:

$$(II.17) \quad \left(\int_0^t [A] dt \right) / ([A]_0 - [A]) = (2K'_m + [A]_0) / 2k'_{+2}[E] + [A] / 2k'_{+2}[E].$$

Wykres zależności $(\int_0^t [A] dt) / ([A]_0 - [A])$ od $[A]$, gdzie wartość $\int_0^t [A] dt$ wyliczono metodą Simpsona całkowania numerycznego (15), określa rodzinę linii prostych o nachyleniu $1/2k'_{+2}[E]$, przecinających oś rzędną w punkcie $(2K'_m + [A]_0) / 2k'_{+2}[E]$ dla różnych wartości $[A]_0$. Na każdej linii należącej do tej rodziny istnieje punkt, którego współrzędne określone są przez warunek $t = 0$, tzn. odpowiadający sytuacji w której $[A] = [A]_0$. Współrzędne te znaleźć można badając granice wyrażen opisujących osie układu współrzędnych. Ponieważ $\lim_{t \rightarrow 0} (\int_0^t [A] dt) / ([A]_0 - [A]) = [A]_0 / (-d[A]/dt) = [A]_0 / v_0$ oraz $\lim_{t \rightarrow 0} [A] = [A]_0$, przeto współrzędne punktów leżących na liniach prostych o nachyleniu $1/2k'_{+2}[E]$, które odpowiadają warunkowi $t = 0$ wynoszą odpowiednio $[A]_0 / v_0$ i $[A]_0$. Linia prosta przeprowadzona przez te punkty ma nachylenie $1/k'_{+2}[E] = 1/V$ i przecina oś rzędną w punkcie $K_m / k'_{+2}[E] = K_m / V$ a oś odciętych w punkcie $-K_m$ (Ryc. 10). Dysponując wartościami K_m i V , wartość K_p wyliczyć można z nachylenia linii przeprowadzonych przez punkty eksperymentalne (tzn. linii o nachyleniu $1/2k'_{+2}[E]$) oraz zależności: $K_p = K_m(K'_m + [A]_0) / (K'_m - K_m)$.

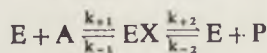
II-3. Reakcje odwracalne i wielosubstratowe

Rozważania dotychczasowe ograniczały się do najprostszego przypadku nieodwracalnej, jednosubstratowej reakcji przebiegającej wedle jednego z przytoczonych wyżej schematów. Alberty i Koerber (24) byli pierwszymi, którzy zastosowali scałkowaną postać równania szybkości reakcji dla wyznaczenia parametrów kinetycznych odwracalnej, dającej się ująć schematem 4:



Ryc. 10. Wykres zależności $\int_0^t [A] dt / ([A]_0 - [A]) \div [A]$ dla reakcji hydrolizy hydroksy-amidu tryptofanu (23).

Wartość liczbowa $\int_0^t [A] dt$ obliczono metodą Simpsona całkowania numerycznego.



Schemat 4

reakcji enzymatycznej katalizowanej przez fumarazę. Równanie szybkości reakcji przebiegającej wedle takiego schematu ma w warunkach stanu równowagi dynamicznej postać następującą:

$$(II.18) \quad -d[A]/dt = d[P]/dt = \frac{[A] \frac{V^a}{K_m^a} - [P] \frac{V^p}{K_m^p}}{1 + \frac{[A]}{K_m^a} + \frac{[P]}{K_m^p}}$$

gdzie V^a , V^p oraz K_m^a , K_m^p to odpowiednio szybkości maksymalne i stała Michaelisa dla obu kierunków reakcji. Po scałkowaniu równanie to przyjmuje postać:

$$(II.19) \quad \left[\frac{V^a}{K_m^a} + \frac{V^p}{K_m^p} \right] t = \left[\frac{1}{K_m^a} - \frac{1}{K_m^p} \right] [P] - \left\{ 1 + \frac{[A]_0}{K_m^p} + \frac{\left(\frac{1}{K_m^a} - \frac{1}{K_m^p} \right) V^p}{\left(\frac{V^a}{K_m^a} + \frac{V^p}{K_m^p} \right) K_m^p} [A]_0 \right\} \ln \left(1 - \frac{[P]}{[P]_{eq}} \right),$$

gdzie $[P]_{eq}$ to stężenie produktu w stanie równowagi termodynamicznej określonej stałą równowagi:

$$K_{eq} = \frac{[P]_{eq}}{[A]_{eq}} = \frac{[A]_0 - [A]_{eq}}{[A]_{eq}} = \frac{[P]_{eq}}{[A]_0 - [P]_{eq}} = \frac{V^a K_m^p}{V^p K_m^a}$$

Równanie II.19. przekształcić można w taki sposób, że daje się ono przedstawić jako szereg potęgowy postaci:

$$[P]/t = a \{ 1 + bt[1 + ct(\dots)] \}$$

lub

$$-(1/t) \ln(1 - [P]/[P]_{eq}) = \alpha \{ 1 + \beta t[1 + \gamma t(\dots)] \},$$

gdzie a , b , c względnie α , β , γ , to współczynniki szeregu wyrażone parametrami kinetycznymi reakcji. Ekstrapolując zależność $[P]/t \div t$ do czasu zerowego, dla określonego stężenia substratu wyznaczyć możemy szybkość początkową reakcji. Znając szybkości początkowe reakcji dla dwu przynajmniej stężeń substratu, wartości K_m i V wyznaczyć możemy graficznie, względnie też możemy je wyliczyć z odpowiedniego wzoru (24).

Inny sposób wykorzystania scałkowanego równania szybkości reakcji dla wyznaczenia parametrów kinetycznych odwracalnej, jedno i dwustratowej reakcji enzymatycznej przedstawił *S c h w e r t* (25). Opisana przez niego metoda, sprawdzona na przykładzie reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę mleczanową (26) polega w ogólności na badaniu przebiegu reakcji dla dwu różnych wyjściowych stężeń substratu $[A]_0$. Szukane parametry kinetyczne (K_m , V) otrzymujemy rozwiązując układ dwu równań opisujących krzywe przebiegu reakcji.

W miarę postępu jaki dokonał się ostatnio w badaniach kinetycznych, możliwe stało się w wielu wypadkach wniknięcie w mechanizm badanej reakcji enzymatycznej. Opisano do tej pory wiele rodzajów mechanizmów wedle których mogą przebiegać reakcje enzymatyczne (27). Odpowiadające

im równania szybkości reakcji bardzo często mają postać złożoną. Scałkowaną postać równań szybkości reakcji dla szeregu wielosubstratowych, przebiegających wedle mechanizmów uporządkowanych reakcji enzymatycznych wyprowadzili *Darvey* i *Williams* (28, 29). Przeprowadzona przez nich komputerowa analiza danych uzyskanych z pomiarów przyrostu stężeń produktów reakcji pozwoliła ustalić czy krzywa przedstawiająca przebieg badanej reakcji odpowiada określonemu, reprezentującemu konkretny mechanizm równaniu szybkości, jak również wyznaczyć parametry kinetyczne reakcji. Wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji przebiegającej wedle mechanizmu typu Ping-Pong (aminotransferaza asparaginianowa) na podstawie analizy krzywej przebiegu reakcji metodą regresji nieliniowej opisane zostało ostatnio przez *Duggleby* i *Morrisona* (30).

III. Uwagi końcowe

Wspomniano wcześniej, że stosując przedstawione w tej pracy metody w przypadku jednosubstratowej reakcji enzymatycznej, przebiegającej wedle mechanizmu przedstawionego na schemacie 1, wyznaczyć można wartości stałej Michaelisa oraz szybkości maksymalnej na podstawie jednego tylko eksperymentu. Można by zatem uznać, że metody wykorzystujące scałkowane równanie szybkości reakcji są bardziej efektywne, niż metody oparte na oznaczaniu szybkości początkowej. Wniosek taki jest jednak tylko częściowo słuszny. W badaniach kinetycznych chodzi nam o to, aby parametry kinetyczne badanej reakcji wyznaczyć możliwie najdokładniej.

Poszukujemy zatem metody precyzyjnej, dającej wyniki dokładne i powtarzalne. Z komputerowych analiz porównawczych przeprowadzonych przez *Nimmola* i *Atkinsa* (16) oraz z prac innych autorów (17, 18) wynika, że metody wyznaczania parametrów kinetycznych reakcji bazujące na scałkowanym równaniu szybkości reakcji są porównywalne z metodami opierającymi się na wyznaczaniu szybkości początkowych reakcji zarówno jeśli idzie o dokładność jak i powtarzalność otrzymywanych oznaczeń. Metoda iteracyjna *Fernleya* (14) daje w tym względzie szczególne dobre wyniki (16). W pewnych okolicznościach metody te mogą być jednak zawodne. Wartości parametrów kinetycznych wyliczone na podstawie danych uzyskanych z jednego tylko eksperymentu mogą być obciążone istotnymi nieraz błędami wynikającymi z nieuwzględnienia:

- a) utraty aktywności enzymu w trakcie przeprowadzania pomiaru jako skutku pojawiającej się denaturacji enzymu oraz
- b) hamowania aktywności enzymu przez nagromadzający się produkt reakcji.

Możliwość popełnienia błędu wynikająca z pojawiającej się w trakcie

przeprowadzania eksperymentu denaturacji enzymu ma mniejsze znaczenie. Jedynie enzymy wyjątkowo mało stabilne ulegają zmianom denaturacyjnym w tak krótkim czasie jaki jest potrzebny do przeprowadzenia eksperymentu. Jest to zjawisko rzadkie w szczególności wtedy, kiedy warunki przeprowadzania pomiarów odpowiadają optymalnym warunkom przebiegu reakcji. Przeprowadzenie pomiarów w dwu różnych stężeniach enzymu pozwala uchwycić wystąpienie tego błędu (19).

Znacznie częściej możemy mieć do czynienia z błędnym oznaczeniem parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej wynikającym z nieuwzględnienia hamującego wpływu nagromadzającego się produktu na przebieg enzymatycznej katalizy. Również i w tym przypadku przeprowadzenie pomiarów w kilku stężeniach substratu wyjaśnia sytuację (19). Zatem o ile nie mamy wystarczająco dokładnych informacji odnośnie ewentualności występowania hamowania reakcji przez nagromadzający się produkt, nie wolno nam poprzestawać na dokonaniu jednego tylko pomiaru. Najlepszym sposobem postępowania, kiedy parametry kinetyczne wyznaczamy przy użyciu metod wykorzystujących pełną krzywą przebiegu reakcji jest założenie z góry możliwości popełnienia tego rodzaju błędu i przeprowadzenie pomiarów przynajmniej w dwu różnych początkowych stężeniach substratu (19). Postępowanie takie nie tylko bowiem wykluczy możliwość uzyskania błędnych oznaczeń wartości stałej Michaelisa i szybkości maksymalnej reakcji, lecz także, w przypadku kiedy zaistnieje sytuacja określona w punkcie b), możliwe będzie jednoczesne wyznaczenie stałej inhibitorowej produktu reakcji.

Reasumując możemy powiedzieć, że metody wyznaczania parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej opierające się o scałkowaną postać równania szybkości reakcji są użyteczne i równie dobre jak stosowane powszechnie metody opierające się o wyznaczanie szybkości początkowych. Ponadto w przypadku, kiedy z powodów zasadniczych (brak dostatecznej ilości enzymu lub substratu) liczba pomiarów musi być ograniczona, metody te mogą okazać się wręcz niezastąpione.

Zaakceptowano 4.10.1978

Autor wyraża wdzięczność prof. dr hab. Mariuszowi Żydowo za cenne uwagi i życzliwą zachętę w trakcie przygotowywania niniejszego artykułu.

PIŚMIENNICTWO

1. Penasse L., (1974), „Les Enzymes: Cinétique et Mécanisme d'Action”, 1 wyd., str. 20, Masson et Cie., Paris.
2. Gutfreund H., (1965), „An Introduction to the Study of Enzymes”, 1 wyd., str. 32, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
3. Hyun-Jae Lee, Wilson I. B., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 519—522.
4. Algranati I. D., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 152—155.

5. Balcolm J. K., Fitch W. M., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1637—1647.
6. Bizzozero S. A., Kaiser A. W., Dutler H. (1973), *Eur. J. Biochem.*, **33**, 292—300.
7. Walker A. C., Schmidt C. L. A., (1944), *Arch. Biochem.*, **5**, 445—467.
8. Fleisher G. A., (1953), *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4487—4490.
9. Atkins G. L., Nimmo I. A., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 779—784.
10. Newman P. F. J., Atkins G. L., Nimmo I. A., (1974), *Biochem. J.*, **143**, 779—781.
11. Draper N. R., Smith H., (1973), „Analiza regresji stosowana”, 2 wyd., str. 11, 315, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
12. Klesow A. A., Berezin I. W., (1972), *Biokhimiya*, **37**, 170—183.
13. Banfield J. E., (1964), *J. Chem. Soc.*, 383—386.
14. Fernley H. N., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **43**, 377—378.
15. Ralston A., (1971), „Wstęp do analizy numerycznej”, 1 wyd., str. 128, 328, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
16. Nimmo I. A., Atkins G. L., (1974), *Biochem. J.*, **141**, 913—914.
17. Shyun-Long Yun, Suelter C. H., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **480**, 1—13.
18. Duggleby R. G., Morrison J. F., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **481**, 297—312.
19. Cornish-Bowden A., (1976), „Principles of Enzyme Kinetics”, 1 wyd., str. 145, Butterworths, London-Boston.
20. Foster R. J., Niemann C., (1953), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **39**, 999—1003.
21. Applewhite T. H., Niemann C., (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4923—4924.
22. Jennings R. R., Niemann C., (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5432—5433.
23. Booman K. A., Niemann C., (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5733—5735.
24. Alberty R. A., Koerber B. M., (1957), *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 6379—6382.
25. Schwert G. W., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1278—1284.
26. Schwert G. W., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1285—1290.
27. Cleland W. W., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104—137.
28. Darvey I. G., Williams J. F., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 1—10.
29. Darvey I. G., Shrager R., Kohn L. D., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4696—4701.
30. Duggleby R. G., Morrison J. F., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **526**, 398—409.

STYPENDIA FEDERACJI EUROPEJSKICH TOWARZYSTW BIOCHEMICZNYCH

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego podaje poniżej w oryginalnej wersji zasady przyznawania stypendiów FEBS. Zgodnie z punktem 4E stypendia przyznawane są tylko członkom towarzystw biochemicznych zrzeszonych w FEBS. Formularz, w którym mowa w punkcie 4C (letter of acceptance), można otrzymać w biurze Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Guidelines for FEBS fellowships

1. The fellowships are to support usually short-term (no longer than two months) visits by members of any FEBS Constituent Society to laboratories in another country in the FEBS area for the purpose of carrying out experiments with special techniques or other forms of scientific collaboration or advanced training, and especially to support developments arising at short notice.

2. The travel costs will be paid on the basis of 2nd class railway fares, or plane if the train journey exceeds 18 hours. For long travels couchettes will also be paid by FEBS. The basic daily allowance in 1979 will be of DM 50 per day possibly with a geographic adaptation factor. It is a condition of any award by FEBS that a full declaration be made to FEBS of all other grants, awards or contributions towards the same travel and subsistence expenditure; and FEBS may reduce its financial support accordingly.

3. The fellowships are intended to cover travel plus subsistence of the fellow only and not of any dependents. Fellows ARE NOT insured by FEBS against medical expenses for themselves or their families; neither are they insured for accidents during their travel to and from the host institute. FEBS does not recognize recipients of its fellowships as agents or employees of FEBS and accepts no liability in respect of any of their actions or activities or in respect of the health or safety of their persons. In their own interest, recipients of fellowships are, therefore, urged to make sure that both they, their families and the institutions which receive them are fully covered by the necessary insurances. FEBS is a non-governmental organization whose awards are not automatically endowed with any particular tax privileges. It is the sole responsibility of the recipient of an award to pay any tax which may be levied upon it by the appropriate national authority.

(c.d. na str. 196)

MAŁGORZATA WILK ^{*)}, ANNA B. WOJTCZAK ^{**)}

Metabolizm aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym

Metabolism of Branched-chain Amino Acids

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Katabolizm aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym
 - II-1. Transaminacja
 - II-2. Oksydacyjna dekarboksylacja
 - II-3. Karboksylacja propionylo-CoA
- III. Udział aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym w metabolizmie różnych tkanek
 - III-1. Cykl alaninowy
 - III-2. Glukoneogeneza
- IV. Regulacja katabolizmu aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym

Contents

- I. Introduction
- II. Catabolic pathways of branched-chain amino acids
 - II-1. Transamination
 - II-2. Oxidative decarboxylation
 - II-3. Carboxylation of propionyl-CoA
- III. The participation of branched-chain amino acids in the metabolism in various tissues
 - III-1. Alanine cycle
 - III-2. Gluconeogenesis
- IV. Regulation of the catabolism of branched-chain amino acids

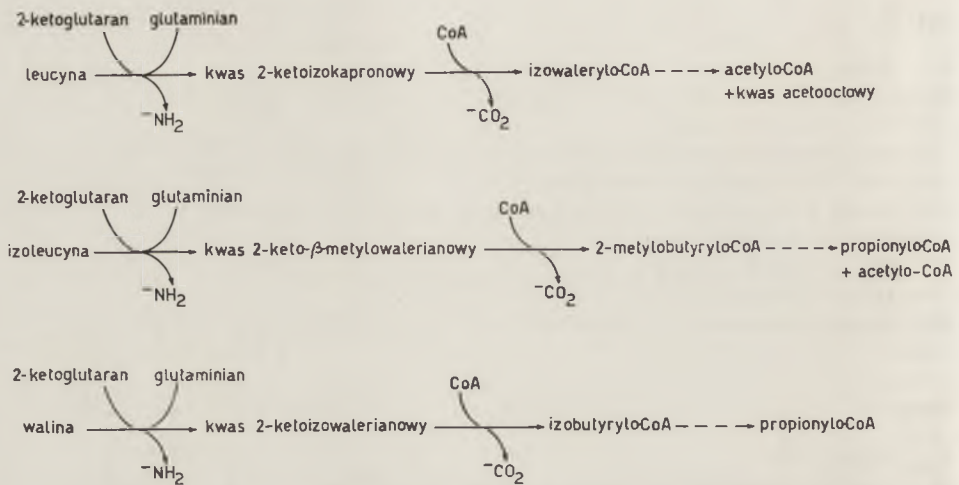
I. Wstęp

Aminokwasy o rozgałęzionym łańcuchu węglowym: leucyna, walina i izoleucyna, syntetyzowane przez bakterie i rośliny, są ważnymi składnikami pokarmowymi dla zwierząt. W organizmie, razem z innymi ami-

^{*)} Dr, Zakład Leków Hormonalnych, Instytut Leków, Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa.

^{**)} Doc. dr hab., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

nokwasami stanowią materiał budulcowy białek, mogą powstawać z nich kwasy tłuszczowe o rozgałęzionym łańcuchu, albo też w wyniku degradacji są wprowadzane do cyklu Krebsa. Cooon i wsp. (1) badali drogę degradacji tych trzech aminokwasów w tkankach ssaków i stwierdzili, że pierwszymi etapami w ich katabolizmie są transaminacja oraz oksydacyjna dekarboksylacja, prowadząca do utworzenia tioestrów koenzymu A. Następnie, w serii reakcji podobnych do reakcji utleniania kwasów tłuszczowych, acylowe pochodne ketokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym i koenzymu A zostają przekształcone do fragmentów dwuwęglowych (leucyna) i trójwęglowych (izoleucyna, walina) (2, 3). Przemiany te przedstawia schematycznie rycina 1.



Ryc. 1. Katabolizm aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym.

Powstały z izoleucyny i waliny propionyl-CoA zostaje karboksylowany przy udziale karboksylazy propionyl-CoA (EC. 6.4.1.3) do metylomalonylo-CoA (4, 5). Izomeryzacja metylomalonylo-CoA do sukcylo-CoA przebiega w dwóch etapach:

- w pierwszym następuje racemizacja metylomalonylo-CoA do jego optycznego izomeru, katalizowana przez racemazę metylomalonylo-CoA (EC. 5.1.99.1);
- w drugim zachodzi izomeryzacja powstałego izomeru do sukcylo-CoA, katalizowana przez mutazę metylomalonylo-CoA (EC. 5.4.99.2).

Kofaktorem tej reakcji jest witamina B_{12} (6—9). Brak jej powoduje znaczny wzrost propionyl-CoA i metylomalonylo-CoA w komórce (10), prowadząc między innymi do ciężkich zaburzeń neurologicznych spowodowanych, jak się wydaje, syntezą nieparzystych kwasów tłuszczowych z propionyl-CoA [11—13] i syntezą kwasów tłuszczowych o rozgałęzionym łańcuchu węglowym z metylomalonylo-CoA (13, 14).

Droga degradacji aminokwasów rozgałęzionych została wprawdzie poznana, mało jednak jeszcze wiadomo na temat enzymów katalizujących oksydacyjną dekarboksylację rozgałęzionych 2-ketokwasów i regulacji dalszego ich katabolizmu. Szczegółowe poznanie powiązań przemian aminokwasów rozgałęzionych z innymi szlakami metabolicznymi może wyjaśnić przyczyny niektórych chorób metabolicznych. Na przykład występująca u ludzi ketoaminoaciduria przejawia się podwyższonym poziomem wszystkich trzech aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu i ich pochodnych 2-ketokwasów we krwi i w moczu (15—19). Zaobserwowano również *in vivo* współzależność metaboliczną pomiędzy aminokwasami rozgałęzionymi; na przykład wzrost ilości leucyny w diecie szczurów powodował wzrost zapotrzebowania tych zwierząt na izoleucynę i walinę (20).

Zaburzenia metabolizmu aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu i związanych z tym wad metabolicznych omówiono już obszernie w artykule opublikowanym w *Postęпах Biochemii* (18). Obecnie przedstawiono zagadnienia dotyczące poszczególnych etapów katabolizmu aminokwasów rozgałęzionych oraz udziału produktów degradacji tych aminokwasów w metabolizmie komórkowym.

II. Katabolizm aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym

W badaniach na zwierzętach stwierdzono, że aminokwasy rozgałęzione są utleniane przede wszystkim pozawątrobowo, głównie w mięśniach szkieletowych (21). Wykazano bowiem w doświadczeniach *in vitro*, że izolowana tkanka mięśniowa utlenia aminokwasy rozgałęzione (22—24), a perfuzja serca i mięśni szkieletowych aminokwasami rozgałęzionymi powoduje znaczny wzrost propionylkarnityny i rozgałęzionych acylokarnityn w tych narządach (25, 26). Oznaczając szybkość transaminacji i oksydacyjnej dekarboksylacji rozgałęzionych aminokwasów w homoge-

Tabela 1

Transaminacja leucyny i oksydacyjna dekarboksylacja kwasu 2-ketoizokapronowego przez homogenaty z różnych tkanek szczura (31)

Tkanka	Transaminacja $\mu\text{mole KIC/godz/g tkanki}$	Oksydacyjna dekarboksylacja $\mu\text{mole CO}_2/\text{godz/g tkanki}$
mózg	$46,7 \pm 4,8$	$1,13 \pm 0,03$
przepona	$42,2 \pm 4,4$	$0,47 \pm 0,01$
serce	$72,5 \pm 8,0$	$0,55 \pm 0,08$
nerka	$63,2 \pm 5,4$	$8,69 \pm 0,41$
wątroba	$5,77 \pm 0,56$	$30,1 \pm 1,91$
mięśnie	$28,1 \pm 1,5$	$0,05 \pm 0,01$

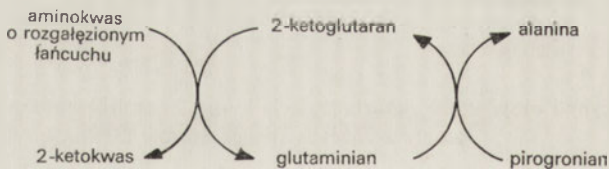
KIC — kwas 2-ketoizokapronowy

natach niektórych tkanek szczura (27, 30, 31) i innych zwierząt (16) stwierdzono, że największa aktywność transaminaz cechuje mięśnie, a największa szybkość oksydacyjnej dekarboksylacji — wątrobę.

II-1. Transaminacja

Przez długi czas nie wiadziło, czy transaminacja poszczególnych aminokwasów rozgałęzionych zachodzi przy udziale specyficznych enzymów, czy też przeprowadza ją tylko jeden enzym. Wiadomo, że aminokwasy te ulegają szybkiej transaminacji w różnych tkankach, spośród których nerkę cechuje najwyższa aktywność transaminaz, a wątrobę tylko około 10% tej aktywności (27). W roku 1966 Ichihara i Koyama (28) i Taylor i Jenkins (32) niezależnie opisali enzym z serca wieprza, (EC. 2.6.1.6) katalizujący transaminację wszystkich trzech rozgałęzionych aminokwasów. Następnie Aki i wsp. (29) stwierdzili, że enzym ten występuje zarówno we frakcji mitochondrialnej jak i cytosolowej serca wieprza, jako dwa izoenzymy.

W wątrobie szczura wykazano (33) następnie dwie transaminazy, które mogą być rozdzielone chromatograficznie na DEAE celulozie. Jedna z nich katalizuje transaminację wszystkich trzech rozgałęzionych aminokwasów (K_m dla leucyny $7,5 \times 10^{-4}$ M) występuje w aktywnościach podobnych w cytosolu i mitochondriach. Druga transaminaza specyficznie dezaminuje leucynę ($K_m = 2,5 \times 10^{-2}$ M) i przeważająca część jej aktywności znajduje się we frakcji mitochondrialnej, a tylko nieznaczna część w cytosolu. Zauważono, że wysokobiałkowa dieta albo podanie hydrokortyzonu indukowały jedynie transaminazę leucyny występującą we frakcji cytosolowej wątroby (29). Ogólny schemat procesu transaminacji przedstawia się następująco:



Ryc. 2. Transaminacja aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym.

Szybkość transaminacji a w konsekwencji i utleniania waliny, izoleucyny i leucyny zależy od stężenia 2-ketoglutaranu jako akceptora grup NH_2 (27, 32, 34, 35). Oprócz 2-ketoglutaranu w transaminacji akceptorem może być również pirogronian, gdyż w tkankach utleniających aktywnie aminokwasy rozgałęzione, jak na przykład w mięśniach szkieletowych, przeponie czy sercu, rośnie zarówno poziom glutaminianu jak i alaniny (36, 37, 39).

Dostępność pirogronianu wpływa na intensywność produkcji alaniny, ponieważ stosując dwuchlorooctan, związek aktywujący dehydrogenazę pirogronianową, obserwowano spadek uwalniania pirogronianu z przepony szczura o 86% i alaniny o 45% (40, 41). Stosując inhibitory aminotransferazy wykazano również, że uwolniona przez mięśnie alanina powstaje głównie przez transaminację pirogronianiu. Cykloseryna, inhibitor cytoplazmatycznej transaminacji, a szczególnie aminotransferazy alani- nowej, hamuje uwalnianie alaniny z mięśni w obecności waliny, glutami- nianu lub glukozy odpowiednio w 60, 90 i 86 procentach (42, 43). Podobne dane uzyskano stosując aminooksyoctan, hamujący mitochondrialną i cyto- plazmatyczną transaminację (42, 44). Dalsze badania wykazały, że jedynie 2-ketoglutaran jest bezpośrednim akceptorem grup aminowych pocho- dzących z rozgałęzionych aminokwasów. Pirogronian natomiast potrzebny jest do regenerowania 2-ketoglutaranu z glutaminianu przy udziale trans- aminazy alani- nowej. Sprzężenie tych dwóch transaminacji odgrywa szcze- gólnie ważną rolę w mięśniach. Koncepcja tak zwanego cyklu alanino- wego (omówionego szczegółowiej w następnej części artykułu) ma swój początek właśnie w obserwacjach dotyczących współzależności dwóch transaminacji przedstawionych na rycinie 2.

Jeżeli transaminacja aminokwasów nie jest reakcją ograniczającą, ze względu na wystarczającą ilość akceptora grup NH_2 , wówczas etapem limitującym proces degradacji może stać się szybkość oksydacyjnej de- karboksylacji 2-ketokwasów, zależna między innymi od aktywności de- hydrogenaz aminokwasów rozgałęzionych obecnych w poszczególnych tkankach (35).

II-2. Oksydacyjna dekarboksylacja

Mało jest danych dotyczących własności i specyficzności enzymu(ów), który(e) katalizują oksydacyjną dekarboksylację rozgałęzionych 2-keto- kwasów. Enzym oczyszczony częściowo z wątroby wołu katalizuje oksy- dacyjną dekarboksylację kwasu 2-ketoizokapronowego i 2-keto- β -metylo- walerianowego (45). Wartości K_m obu substratów są stosunkowo wysokie: $3,5 \times 10^{-3}$ M i $2,5 \times 10^{-3}$ M. Uważa się, że dekarboksylacja rozgałęzionych 2-ketokwasów przebiega analogicznie jak reakcje katalizowane przez dehydrogenazy pirogronianową i 2-ketoglutaranu ze względu na wyma- ganą obecność pirofosforanu tiaminy, CoASH i NAD [45, 46]. Z badań dekarboksylacji rozgałęzionych 2-ketokwasów w ekstraktach wątroby szczura wynikało, że pojedynczy kompleks enzymatyczny może katalizo- wać dekarboksylację wszystkich trzech rozgałęzionych 2-ketokwasów (30, 47). Ostatnio Parker i Randle (48) oczyścili dehydrogenazę roz- gałęzionych 2-ketokwasów z mitochondriów wątroby wołu i podali jej kinetyczne własności. Wszystkie trzy 2-ketokwasy są utleniane przez

jeden kompleks enzymatyczny. Wartości K_m dla poszczególnych 2-ketokwasów zawarte są w zakresie 8—20 μM a V_{max} w granicach 1,2—2,1 nmola/min/mg białka. Utlenianie każdego 2-ketokwasu jest hamowane przez izowalerylo-CoA (K_i w zakresie 7—18 μM) i NADH (K_i w zakresie 33—52 μM). Maksymalną aktywność kompleksu wobec kwasu 2-ketoizokapronowego uzyskano w obecności pirogronianu tiaminy ($K_m = 0,35 \mu\text{M}$, Mg^{2+} ($K_m = 4,2 \mu\text{M}$), CoA (K_m w zakresie 7—9 μM) i NAD (K_m w zakresie 100—126 μM). Wykazano, że wszystkie trzy rozgałęzione 2-ketokwasy w stężeniu powyżej 500 μM hamują aktywność kompleksu.

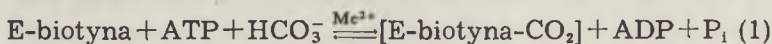
Oznaczenie składników kompleksu dehydrogenazy 2-ketokwasów rozgałęzionych potrzebne jest dla potwierdzenia, że jest to analogiczny kompleks jak kompleksy dehydrogenazy pirogronianowej i dehydrogenazy 2-ketoglutaranu. Ze względu na to, że zaburzenia w przemianie aminokwasów rozgałęzionych leżą u podstaw szeregu chorób metabolicznych, ważne jest również wyjaśnienie roli rozpuszczalnej dehydrogenazy rozgałęzionych 2-ketokwasów, którą znaleziono we frakcji supernatantu wątroby wołu (45, 47).

II-3. Karboksylacja propionilo-CoA

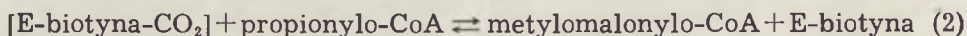
Karboksylaza propionilo-CoA z serca świni została po raz pierwszy otrzymana w krystalicznej formie w pracowni Ochoa (49) a jako homogeny preparat białkowy z mitochondriów wątroby wołu (50). Karboksylaza jest enzymem biotynowym; na jedną cząsteczkę enzymu przypadają cztery grupy biotynowe (51, 52). Ciężar cząsteczkowy enzymu z serca świni wynosi 697 000 (49, 52). Karboksylaza propionilo-CoA jest enzymem wyłącznie mitochondrialnym, występującym w matriks (53—55). Badania enzymu otrzymanego z serca świni (51, 56—58) oraz enzymu z mitochondriów wątroby wołu (59, 60) przyczyniły się do wyjaśnienia mechanizmu karboksylacji propionilo-CoA.

Karboksylacja ta zachodzi w dwóch etapach:

— pierwszy etap to przyłączenie CO_2 i utworzenie karboksybiotyny przy udziale ATP i kationu dwuwartościowego, którym może być Mg^{2+} lub Mn^{2+} .



— drugi etap to transkarboksylacja związana z przeniesieniem grupy karboksylowej z kompleksu $[\text{E-biotyna-CO}_2]$ na odpowiedni akceptor, którym w tym przypadku jest propionilo-CoA.



W etapie pierwszym magnez potrzebny jest do utworzenia kompleksu MgATP^{2-} , który stanowi jeden z substratów reakcji (52, 61), podczas gdy powstający ADP jest inhibitorem karboksylacji ($K_i = 5,72 \times 10^{-4} \text{ M}$) (58).

Reakcja druga jest nie specyficzna substratowo, a szybkość transkarboksylacji zależy od rodzaju akceptora. Jeśli akceptorem jest acetylo-CoA lub butyrylo-CoA, wówczas szybkość ich karboksylacji różni się znacznie od szybkości karboksylacji propionilo-CoA. V_{max} z propionilo-CoA, acetylo-CoA i butyrylo-CoA wynoszą odpowiednio 1,42, 0,0147 i 0,0656 nmoli/min/mg białka (52). Przyjmuje się, że koenzym A odgrywa rolę w wiązaniu substratu z enzymem, podczas gdy część acylowa substratu wpływa głównie na szybkość reakcji (50).

Aktywność karboksylazy propionilo-CoA stymulują kationy jednowartościowe: K^+ , NH_4^+ , Rb^+ , Cs^+ . Najsilniej, bo 7—9 razy podwyższa aktywność karboksylazy jon K^+ (K_m wobec jonu K^+ wynosi $1,5 \times 10^{-3} M$) (62). W tabeli 2 przedstawiono rozkład aktywności karboksylazy propionilo-CoA w różnych narządach różnych zwierząt.

Tabela 2

Aktywność karboksylazy propionilo-CoA w mitochondriach różnych narządów szczura, królika i świnki morskiej (55)

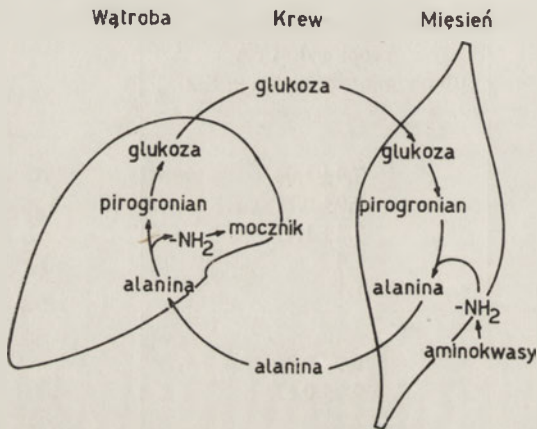
	Aktywność karboksylazy propionilo-CoA $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ białka \pm SD
Szczur	
wątroba	7,4 \pm 1,04
nerka	9,9 \pm 0,71
serce	7,2 \pm 1,4
mózg	1,4
mięśnie szkieletowe	1,1
Świnka morska	
wątroba	10,9 \pm 0,45
nerka	9,0 \pm 0,87
serce	2,2
Królik	
wątroba	6,3 \pm 0,45
nerka	7,3 \pm 1,48
serce	2,4
Owca	
wątroba	10,6 \pm 0,61

W sercu szczura aktywność enzymu jest podobna do jego aktywności w wątrobie, ale w sercu królika i świnki morskiej jest ona przeszło trzy razy niższa. Ta stosunkowo niska aktywność enzymu w sercu tych dwóch zwierząt jest zastanawiająca, gdyż metabolizm propionianu w sercu jest dość intensywny (25, 63) a perfuzja serca świnki morskiej propionianem powoduje znaczny wzrost poziomu produktu karboksylacji propionianu, to jest bursztynianu, oraz powstających z niego w dalszych etapach, jabłczanu i asparagianu (64).

III. Udział aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym w metabolizmie różnych tkanek

III-1. Cykl alaninowy

W ostatnich latach dużo uwagi poświęcono dezaminacji aminokwasów rozgałęzionych i ich dalszemu metabolizmowi. Zaobserwowano, że ilość alaniny uwalnianej przez mięśnie szkieletowe podczas głodzenia przekracza znacznie ilość, jaka występuje w białkach mięśni (65). Stwierdzono, że alanina jest pobierana przez wątrobę z krwiobiegu w ilości większej niż inne aminokwasy (66). Aminokwas ten bowiem jest bardzo dobrym substratem glukoneogenezy w perfudowanej wątrobie (67, 68). Felig i wsp. (65) i Malette i wsp. (67) zaproponowali „cykl alaninowy”, według którego alanina syntetyzowana *de novo* w mięśniu jest źródłem grup aminowych dla syntezy mocznika i prekursorem szkieletu węglowego dla syntezy glukozy w wątrobie.

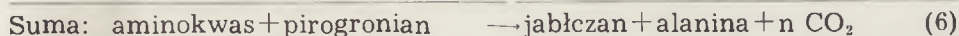
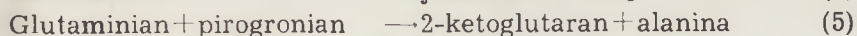
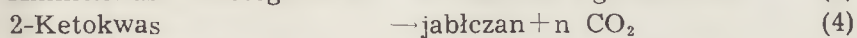
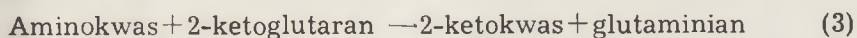


Ryc. 3. Cykl alaninowy (66).

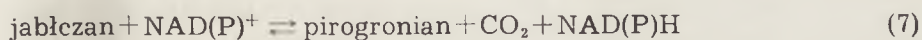
Alanina produkowana w mięśniach i przenoszona przez krew do wątroby jest tam przekształcana do glukozy. Z kolei glukoza syntetyzowana w wątrobie, dostarczana jest z krwią do mięśni i tam rozkładana glikolitycznie do pirogronianu, z którego powstaje alanina. Cykl alaninowy umożliwia transport azotu do wątroby bez wzrostu amoniaku we krwi, a także dostarcza substratu glukoneogenezy w okresach ograniczonego dopływu glukozy, na przykład podczas głodu. Także nadmiar kwasu mlekowego powstającego w mięśniach podczas intensywnej pracy jest tą drogą przekształcany ponownie do glukozy w wątrobie. Wydaje się, że aminokwasy rozgałęzione są głównymi donorami grup NH_2 do syntezy alaniny w mięśniach. Stymulacji pobierania alaniny przez wątrobę towarzyszy uwalnianie z niej rozgałęzionych aminokwasów do krwi i wzrost utlenienia tych aminokwasów w mięśniach (22, 36, 66, 69). Ponadto z badań przepony szczura wynikało, że spośród wszystkich badanych aminokwa-

sów tylko leucyna, walina i izoleucyna, w stężeniach fizjologicznych, powodują powstawanie znacznych ilości alaniny (36). Wykazano też, że przepona szczura utlenia głównie izoleucynę, leucynę, walinę, alaninę, aspariginian, glutaminian, natomiast utlenianie innych aminokwasów zachodzi w tej tkance w bardzo niewielkim stopniu (23). Ostatnio stwierdzono, że w mięśniach donorami grup NH_2 mogą być też: cysteina, metionina, seryna, treonina, glicyna, histydyna, ale udział ich (szczególnie trzech ostatnich) w syntezie alaniny w porównaniu z aminokwasami rozgałęzionymi nie jest duży.

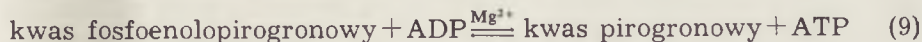
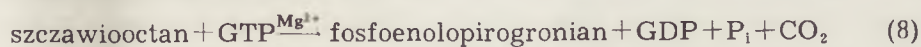
Cykl alaninowy nie dostarcza netto glukozy. Zasilanie cyklu substratami glukogennymi wymaga tworzenia się pirogronianu z niewęglowodanowych prekursorów w mięśniu. Koncepcję cyklu alaninowego rozszerzyli Davis i wsp. (25) włączając w ten cykl również utlenianie 2-ketokwasów powstałych w mięśniu między innymi z aminokwasów rozgałęzionych.



Utlenienie 2-ketokwasów daje wzrost ilości intermediatów cyklu Krebsa, głównie jabłczanu. W reakcji tworzenia alaniny (reakcja 5) 2-ketoglutaran ulega regeneracji. Sumarycznie: z aminokwasu powstaje jabłczan, alanina i odpowiednia ilość CO_2 . Davis i wsp. (25) uważają, że jabłczan utworzony w ten sposób w nadmiarze w mięśniu jest usuwany przez dekarboksylującą dehydrogenazę jabłczanową (EC. 1.1.1.40) z wytworzeniem pirogronianu:

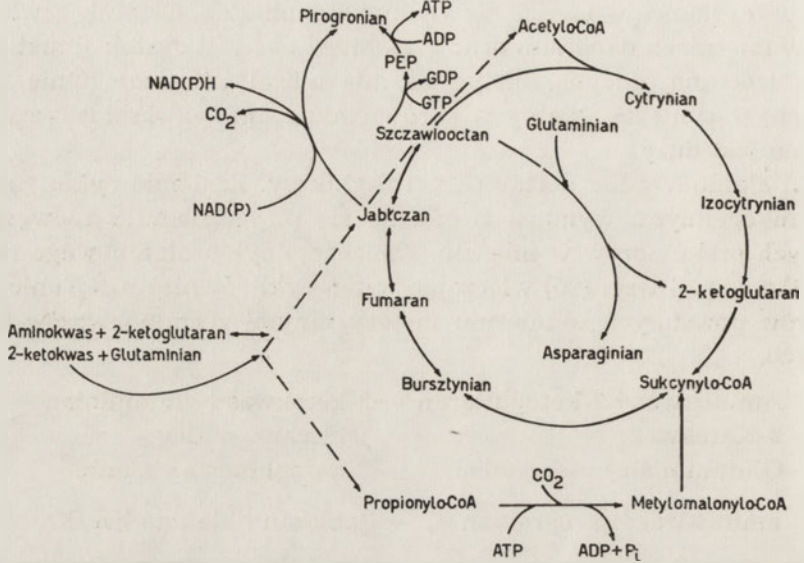


Sugeruje się też inną drogę powstawania pirogronianu w mięśniach. Okazało się bowiem, że uwolnienie alaniny stymulowane przez walinę lub glutaminian w przeponach szczurów głodzonych było hamowane przez kwas 3-merkaptopikolinowy, inhibitor cytosolowej i mitochondrialnej karboksylazy fosfoenolpirogronianu (EC. 4.1.1.32) (70). Jeżeli jednak przepony otrzymano ze szczurów żywionych, to kwas 3-merkaptopikolinowy nie miał hamującego wpływu (44). Możliwe, że tylko podczas głodu pirogronian powstaje przy udziale karboksylazy fosfoenolpirogronianu i kinazy pirogronianowej:



Reakcje 4, 7, 8 i 9 przedstawiają drogi powstawania pirogronianu w mięśniach ze źródeł niewęglowodanowych. Proponowany mechanizm, w powiązaniu z cyklem alaninowym (Ryc. 4), pozwala zrozumieć, dlaczego

utlenianie propionianu w sercu daje znaczny wzrost pirogronianu, cytrynianu, jabłczanu, 2-ketoglutaranu i asparaginianu (64) i w jaki sposób propionylo-CoA pochodzący z aminokwasów rozgałęzionych w mięśniach może być prekursorem glukoneogenezy w wątrobie.



Ryc. 4. Źródła pośredników cyklu Krebsa w mięśniach i usuwanie ich nadmiaru.

Głównym jednak źródłem alaniny w mięśniach jest pirogronian powstający podczas glikolizy (36, 39). Nasuwa się pytanie, jaka część alaniny w mięśniach pochodzi ze źródeł niewęglowodanowych. Inkubując przepony z głodzonych szczurów z rozgałęzionymi aminokwasami i U-¹⁴C glukozą stwierdzono, że 60—80% węgla w uwolnionej alaninie pochodziło z radioaktywnej glukozy, 20—40% alaniny zatem nie powstało z glukozy (36). W przeponach szczurów trzymanyh na normalnej diecie 30—60% alaniny pochodziło z glukozy, a reszta ze źródeł niewęglowodanowych. Podobny wzrost syntezy alaniny, to jest około 50%, z izoleucyny i waliny w obecności glukozy uzyskali Goldstein i Newsholme (39) oraz Chang i Goldberg (89).

Głównym źródłem energii w mięśniach są glukoza i kwasy tłuszczowe; jednak pomiary utlenienia tych substratów nie pokrywały całkowitego zużycia tlenu przez tę tkankę. Biorąc pod uwagę powyższe dane oraz wartości dotyczące uwolnienia alaniny, tyrozyny oraz całkowite zużycie tlenu przez mięsień szkieletowy człowieka obliczono, że utlenianie aminokwasów rozgałęzionych może być odpowiedzialne za dostarczenie mięśniom około 14% energii (36). Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż zaburzenia katabolizmu aminokwasów mają ważne reperkusje metaboliczne. Dzieci, u których stwierdzono zahamowanie katabolizmu rozgałęzionych aminokwasów na etapie oksydacyjnej dekarboksylacji (ketoaminoaciduria), mają poziom alaniny we krwi 3—5 razy niższy w porównaniu

z dziećmi zdrowymi. Również pomimo normalnego poziomu insuliny we krwi często cierpią na hipoglikemię (36).

Pozostaje sprawą nierozwiązaną, jaka część 2-ketokwasów pochodzących z aminokwasów rozgałęzionych jest utleniania w komórce mięśniowej, a jaka zostaje uwalniana z mięśni do krwi. Z jednej strony istnieje bowiem pogląd, że są one w stosunkowo małym stopniu uwalniane do krwi (22, 71), z drugiej zaś strony wydaje się, że w pewnych warunkach może następować względnie znaczny wzrost ich poziomu we krwi i w tym przypadku 2-ketokwasy są metabolizowane w wątrobie (31). Wykazano, że po inkubacji przepony szczura z leucyną następuje duże nagromadzenie kwasu 2-ketoizokapronowego w środowisku inkubacyjnym. Stwierdzono też po podaniu szczurom pokarmów zawierających dużo aminokwasów rozgałęzionych znaczny wzrost poziomu rozgałęzionych 2-ketokwasów w osoczu (31). Łącznie ze znanymi danymi, że homogenaty lub izolowane mitochondria z wątroby szczura aktywnie utleniają każdy z trzech rozgałęzionych 2-ketokwasów (17, 45, 72, 73), wydaje się, że przy wzroście podaży rozgałęzionych aminokwasów wątroba odgrywa istotną rolę w oksydacyjnej dekarboksylacji rozgałęzionych 2-ketokwasów.

III-2. Glukoneogeneza

Na temat udziału aminokwasów rozgałęzionych w glukoneogenezie wiemy stosunkowo niewiele i, co więcej, dostępne dane nie są zgodne. Propionyl-CoA, będący pośrednikiem przemian kilku aminokwasów stanowi substrat glukoneogenezy, co wykazano w skrawkach kory nerki (74) i perfudowanej wątrobie szczura (68, 75). Stwierdzono, że glukoneogeneza z propionianu w skrawkach wątroby szczura jest o 30% niższa niż z alanyiny i około 2,5 raza niższa niż z pirogronianiu (68). W doświadczeniach z perfuzją wątroby szczura propionianem uzyskano podobne wyniki (75). Stwierdzono ponadto, że dodatek oleinianu do środowiska perfuzyjnego powodował nieznaczną stymulację syntezy glukozy z propionianu (76). Natomiast podając w roztworze perfuzyjnym walinę i izoleucynę uzyskiwano bardzo niską produkcję glukozy z tych prekursorów (68, 75). Badania przy użyciu izolowanych hepatocytów i zastosowaniu wysokich stężeń izoleucyny i waliny potwierdziły także niską wydajność glukoneogenezy z tych aminokwasów (55). Tłumaczyć to można małą przepuszczalnością błony hepatocytów dla rozgałęzionych aminokwasów (68) oraz nieznaczną szybkością transaminacji, która z kolei może ograniczać dalszy metabolizm tych aminokwasów w komórce wątroby. Aktywność transaminazy leucyny w wątrobie wynosi około 7—10% aktywności tego enzymu w innych tkankach (31). W sumie czynniki te sprawiają, że glukoneogeneza z aminokwasów rozgałęzionych jest 12—20 razy niższa niż z mleczanu z pirogronianem (Tabela 3) i 5—9 razy niższa niż z pirogronianu (68). Omi-

nięcie etapu transaminacji i podanie na przykład 2-ketomaślanu powoduje, że glukoneogeneza z 2-ketomaślanu jest tylko około 3,3 razy niższa niż z mleczanu i pirogronianu (Tabela 3).

Tabela 3

Produkcja glukozy z aminokwasów rozgałęzionych i z 2-ketomaślanu w izolowanych hepatocytach szczura. Wpływ kwasów tłuszczowych (55).

Substrat mM	Glukoza μmole/g m. masy/godz.		
	—	+ kaprylan 1 mM	+ oleinian 0,25 mM
mleczan 10+			
pirogronian 1,5	45	68	64
L-izoleucyna 10	2,2	1,2	2,2
DL-walina 10	3,6	2,2	4,0
2-ketomaślan 5	13,6	7,4	16,6

W warunkach kiedy rośnie intensywność glukoneogenezy (np. w głodzie), aminokwasy rozgałęzione uwalniane są z wątroby, podwyższa się ich poziom we krwi, wzrasta także ich utlenianie w mięśniach (Rozdział IV). Część rozgałęzionych 2-ketokwasów prawdopodobnie zostaje przetransportowana z mięśni do wątroby, gdzie mają miejsce dalsze ich przemiany (porównaj III-1). W wątrobie, propionylo-CoA po wejściu w cykl Krebsa i włączeniu się w pulę szczawiooctanu, może przejść na drogę glukoneogenezy. Interesujące jest obniżenie intensywności glukoneogenezy z mleczanu i pirogronianu przez propionian (75, 76). Wydaje się, że obniżenie ilości powstającej z mleczanu i pirogronianu glukozy przez propionian wynika z nagromadzenia metylomalonylo-CoA, który jest inhibitorem karboksylazy pirogronianowej (77). Obniżenie ilości CoA, zużywanego w procesie aktywacji propionianu, zmniejsza ilość acetylo-CoA — aktywatora karboksylazy pirogronianowej, co z kolei także może wpływać hamująco na aktywność glukoneogenezy z mleczanu i pirogronianu (78). Ograniczanie przez propionian syntezy glukozy z mleczanu i pirogronianu ma miejsce prawdopodobnie także u przeżuwaczy (75), u których propionian powstaje w znacznych ilościach podczas fermentacji błonnika w przewodzie pokarmowym. U tych zwierząt właśnie propionian jest głównym prekursorem w procesie glukoneogenezy w wątrobie.

IV. Regulacja katabolizmu aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym

Zaobserwowano wzrost uwalniania izoleucyny, waliny i leucyny z wątroby szczurów głodzonych (86), cukrzycowych (21) i po podaniu glukagonu (66, 85), a więc wtedy, gdy poziom insuliny ulegał obniżeniu.

W tych warunkach zwiększał się poziom aminokwasów rozgałęzionych we krwi (36, 66) i kilkakrotnie wzrastało ich utlenianie w mięśniach (23, 36, 66, 86). Wzrost intensywności utleniania aminokwasów rozgałęzionych w przeponie zaobserwowano również po podaniu epinefryny (66). Nie stwierdzono natomiast podwyższenia intensywności utleniania aminokwasów rozgałęzionych ani w skrawkach wątroby, ani w mózgu zwierząt głodzonych (66).

Dosyć kontrowersyjne są dane dotyczące wpływu kwasów tłuszczowych na intensywność utleniania aminokwasów rozgałęzionych. Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w mięśniu szkieletowym rośnie znacznie w niektórych warunkach żywieniowych i hormonalnych. W cukrzycy i podczas głodu obserwowano w przeponie szczura wzrost wolnych kwasów tłuszczowych o 200—400% (22), co może wpływać na utlenianie rozgałęzionych 2-ketokwasów. Podczas perfuzji serca kwasem kaprylowym z walina, izoleucyną i leucyną powstawało trzy razy więcej $^{14}\text{CO}_2$ z radioaktywnych aminokwasów w porównaniu z perfuzją bez kwasu kaprylowego (22). Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, jak palmitynian i oleinian, stymulują słabiej niż kwas kaprylowy utlenianie aminokwasów rozgałęzionych w sercu. Podobny wzrost produkcji radioaktywnego CO_2 obserwowano po inkubacji przepony szczura w środowisku zawierającym kwas kaprylowy lub długołańcuchowe kwasy tłuszczowe i radioaktywne aminokwasy rozgałęzione. Krótkołańcuchowe kwasy monokarboksylowe nie wywierały żadnego wpływu. Paul i Adibi (24) badając homogenaty mięśni szkieletowych wykazali stymulację utleniania leucyny przez kwasy tłuszczowe średniołańcuchowe (C_6 — C_8) a hamowanie utleniania przez długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Ostatnio (72) badano wpływ kwasów tłuszczowych na szybkość utleniania aminokwasów rozgałęzionych w mitochondriach nerki, serca i mięśni szkieletowych. Dodatek estrów karnitynowych średnio- i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (C_6 — C_{16}) hamował utlenianie aminokwasów rozgałęzionych przede wszystkim w mitochondriach będących w stanie wysokoenergetycznym (bez dodanego ADP). W mitochondriach serca dodatek ADP zmniejszał hamujący wpływ acylokarnitynu. Interpretacja wyników dotyczących wpływu kwasów tłuszczowych na utlenianie aminokwasów rozgałęzionych jest bardzo trudna. Davis i Bremer (72) stoją na stanowisku, że hamujący wpływ średnio- i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych na intensywność katabolizmu izoleucyny, waliny i leucyny jest konsekwencją podwyższenia stosunku NADH/NAD w mitochondriach. Stanowisko to jednak trudno pogodzić z danymi Goldberga i Odessya (23), które wskazują, że przepony głodzonych szczurów około 5 razy szybciej utleniają aminokwasy rozgałęzione niż przepony normalnie karmionych zwierząt. Ostatnie, niepublikowane jeszcze dane z pracowni Bremera (Konferencja w Tönsberg — Norwegia, 1978) potwierdzają dawniejsze wyniki Buse i wsp. (22), że kwasy tłuszczowe stymulują jednak oksydacyjną

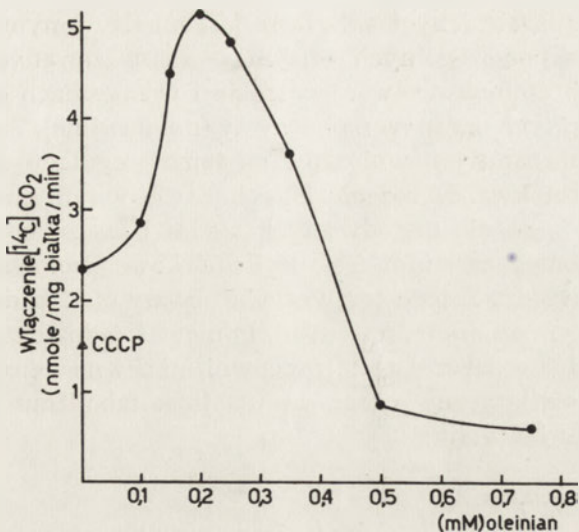
dekarboksylację 2-ketokwasów rozgałęzionych w perfudowanych mięśniach. Wynika z tego, że nie można wysnuwać wniosków dotyczących regulacji *in vivo* z doświadczeń wykonanych na izolowanych mitochondriach. Widocznie czynniki pozamitochondrialne wpływają istotnie na szybkość degradacji aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu w komórkach wątroby, jak i w mięśniach.

Powstaje pytanie, czy zmiany szybkości utleniania aminokwasów rozgałęzionych mają związek ze zmianą szybkości reakcji na etapach transaminacji, oksydacyjnej dekarboksylacji czy karboksylacji propionylo-CoA.

Mierząc ilość powstającego glutaminianu oznaczano sumaryczną aktywność transaminazy waliny w wątrobie oraz mięśniach szkieletowych. Stwierdzono, że w głodzeniu, cukrzycy, czy po podaniu kortizonu następuje w mięśniach niewielki wzrost ilości utworzonego glutaminianu. Wyraźny natomiast spadek glutaminianu zaobserwowano w mięśniach po podaniu tyroksyny (24, 38). W innych doświadczeniach nieznaczny wzrost aktywności transaminazy leucyny w wątrobie zaznaczył się po podaniu szczurom wysokobiałkowej diety, znaczny zaś wzrost jej aktywności powodował podany dodatkowo kortizon. W nerce natomiast aktywność transaminazy leucyny zwiększyła się o 65% po zastosowaniu diety wysokobiałkowej, a kortizon tylko nieznacznie tę aktywność podwyższył (30).

Znacznie mniej jest danych dotyczących zmian na poziomie oksydacyjnej dekarboksylacji aminokwasów rozgałęzionych. Aktywność dehydrogenazy 2-ketoizokapronianowej rośnie w wątrobie po podaniu szczurom diety wysokobiałkowej prawie 5-krotnie, w nerce zaś 2-krotnie. Głodzenie stymuluje aktywność tej dehydrogenazy w wątrobie trzy razy, a w nerce aktywność pozostaje prawie niezmieniona (30). W piśmiennictwie nie ma właściwie żadnych danych na temat regulacji degradacji aminokwasów rozgałęzionych na etapie karboksylacji propionylo-CoA. Ostatnio wykazano w badaniach przeprowadzonych na mitochondriach wątroby szczura oraz izolowanych hepatocytach, że karboksylacja propionylo-CoA jest niska w stanie 3 (w obecności ADP) a rośnie znacznie w stanie 4 (bez ADP) lub po dodaniu atraktylanu oraz, że długołańcuchowe kwasy tłuszczowe stymulują tę karboksylację (55). Zaobserwowano również korelację pomiędzy szybkością karboksylacji propionylo-CoA i stosunkiem ATP/ADP wewnątrz mitochondriów (55, 87). Stymulujący wpływ niskich stężeń oleinianu na karboksylację propionylo-CoA przedstawiono na rycinie 5.

Przemianami propionylokarnityny i propionylo-CoA zajmowano się także w innych laboratoriach. Otrzymane wyniki wskazują na znaczny spadek ilości propionylokarnityny w wątrobie po 36 godzinach głodzenia (88). Obserwowane zjawisko może być spowodowane przyspieszeniem dalszej przemiany propionylo-CoA lub zmniejszeniem ilości jego prekursorów. Stwierdzono, że w warunkach podwyższenia ilości kwasów tłuszczowych w mitochondriach, aktywność karboksylacji propionylo-CoA wyka-



Ryc. 5. Wpływ oleinianu na karboksylację propionilo-CoA w mitochondriach wątroby szczura (55).

Mitochondria inkubowano z 2,5 mM propionylkarnityną, 10 mM $[^{14}\text{C}] \text{KHCO}_3$, 3 mM glutaminianem i 5 mM malonianem. Karboksylacja propionilo-CoA wyrażona jest w nmolach $^{14}\text{CO}_2$ włączonego do bursztynianu. Na wykresie pokazano także, ile $^{14}\text{CO}_2$ włącza się w obecności karbonylocyanidu chlorofenylohydrazonu (CCCP), substancji rozprzegającej oksydacyjną fosforylację.

zuje tendencję wzrostu. Zaobserwowano również, że w hepatocytach ma miejsce stymulacja przez oleinian glukoneogenezy z aminokwasów rozgałęzionych i 2-ketomaślanu (55). Wydaje się więc, że przy wzroście poziomu kwasów tłuszczowych w komórce wątroby, metabolizm propionilo-CoA ulega przyspieszeniu w tym narządzie. Stymulujący wpływ na degradację aminokwasów rozgałęzionych mają tylko długocząłkowe kwasy tłuszczowe (55). Ze względu na małą intensywność przemian aminokwasów rozgałęzionych w wątrobie, regulacja karboksylacji propionilo-CoA przez kwasy tłuszczowe nie ma specjalnie dużego znaczenia fizjologicznego w tym narządzie. Opublikowane niedawno dane omówione szerzej w rozdziale III-1, wskazują jednak na to, że wtedy, gdy wzrasta we krwi poziom 2-ketokwasów rozgałęzionych, intensywność ich oksydacyjnej dekarboksylacji w wątrobie znacznie wzrasta. Wtedy też stymulujący wpływ kwasów tłuszczowych na karboksylację propionilo-CoA może w rezultacie przyspieszyć całkowite utlenienie 2-ketokwasów w cyklu Krebsa.

Podsumowując należy stwierdzić, że dane dotyczące regulacji utleniania aminokwasów rozgałęzionych są jeszcze bardzo fragmentaryczne, niekompletne a często niejednoznaczne. Nie można również dać jednoznacznej odpowiedzi na pytanie postawione w tym rozdziale — czy można skorelować zmiany utleniania aminokwasów rozgałęzionych ze zmianą szybkości reakcji na etapach transaminacji, oksydacyjnej dekarboksylacji czy karboksylacji propionilo-CoA. Niejasny obraz regulacji utleniania

aminokwasów rozgałęzionych związany jest między innymi z bardzo różną aktywnością poszczególnych enzymów zaangażowanych w procesie degradacji tych aminokwasów w wątrobie i w mięśniach oraz różny stopień odpowiedzi tych organów na hormony (np. insulinę). Trudności w wyciągnięciu jednoznacznych wniosków na temat regulacji utleniania aminokwasów i 2-ketokwasów rozgałęzionych, nawet w tym samym narządzie, mogą wynikać z różnic metodycznych. Jedni badacze bowiem biorą do doświadczeń homogenat, inni frakcje komórkowe, izolowane hepatocyty czy też całe narządy. Z tego też względu obecny etap badań można nazwać intensywnym zbieraniem danych. Ponieważ jednak zaangażowanych jest w tę dziedzinę bardzo wiele pracowni, napewno wkrótce znany będzie bardziej syntetyczny obraz regulacji katabolizmu aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu.

Zaakceptowano 30.10.1978

PISMIENNICTWO

1. Coon M. J. (1955) w *Amino Acid Metabolism*, red. McElroy W. D., Glass H. B., str. 431—441, Johns Hopkins Press, Baltimore.
2. Kaplan J. H., Pitot H. C. (1970) w *Mammalian Protein Metabolism*, red. Munro H. N., t. 4, str. 387—443, Academic Press, New York, London.
3. Bøhmer T. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* **208**, 167—170.
4. Kornberg H. L. (1966) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 2, str. 1—31, Academic Press, London.
5. Moss J., Lane D. M. (1971) w *Adv. Enzymology*, **35**, 321—416.
6. Stadtman E. R., Overath P., Eggerer H., Lynen F. (1960) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2**, 1—7.
7. Lengyel P., Mazumder R., Ochoa S. (1960) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **46**, 1312—1318.
8. Hogenkamp H. P. C. (1968) *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 225—248.
9. Mahoney M. J., Rosenberg L. E. (1970) *Am. J. Med.*, **48**, 584—593
10. Frenkel E. P., Kitchens R. L., Hersh L. B. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 6984—6991.
11. Barley F. W., Sato G. H., Abeles R. H. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 4270—4276.
12. Frenkel E. P., Kitchens L., Johnston J. M. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 7540—7546.
13. Burton W. C., Frenkel E. P. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **398**, 217—223.
14. Cardinale G. J., Carty T. J., Abeles R. H. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 3771—3775.
15. Bowden J. A., Connelly J. L. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 3526—3531.
16. Connelly J. L., Danner D. J., Bowden L. J. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 1198—1203.
17. Kanzaki T., Hayakawa T., Hamada M., Fukuyoshi Y., Koike M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 1183—1187.
18. Tomaszewski L. (1973) *Postępy Biochemii* **19**, 91—122.
19. Angielski S. (1976) w *Zarysie Biochemii Klinicznej i Analityki*, red. Angielski S., Rogulski J, str. 348—356, PZWL, Warszawa.

20. Shinnick F. L., Harper A. E. (1977) *J. Nutr.*, **107**, 887—895.
21. Miller L. L. (1962) w *Amino Acid Pools*, red. J. T. Holden, 708—722, Elsevier, Amsterdam.
22. Buse M. G., Biggers J. F., Friderici K. H., Buse J. F. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 8085—8096.
23. Goldberg A. L., Odessey R. (1972) *Am. J. Physiol.*, **223**, 1384—1391.
24. Paul H. S., Adibi S. A. (1976) *J. Nutr.*, **106**, 1079—1088.
25. Davis E. J., Bremer J. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **38**, 86—97.
26. Speydevold Ø, Davis E. J., Bremer J. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **71**, 155—165.
27. Awapara J., Seale B. (1952) *J. Biol. Chem.*, **194**, 497—502.
28. Ichihara A., Koyama E. (1966), *J. Biochem. Tokyo* **59**, 160—169.
29. Aki K., Ogawa K., Shirai A., Ichihara A. (1967), *J. Biochem. Tokyo* **62**, 610—617.
30. Wohlueter R. M., Harper A. E. (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2391—2401.
31. Shinnick F. L., Harper A. E. (1976), *Biochim. Biophys. Acta* **437**, 477—486.
32. Taylor R. T., Jenkins W. T. (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 4396—4405.
33. Aki K., Ogawa K., Ichihara A. (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **159**, 276—284.
34. Taylor R. T., Jenkins W. T. (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 4391—4395.
35. Dawson A. G., Hird F. J. R. (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**, 622—626.
36. Odessey R., Khairallah E. A., Goldberg A. L. (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7623—7629.
37. Garber A. J., Karl I. E., Kipnis D. M. (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 836—843.
38. Karl I. E., Garber A. J., Kipnis D. M. (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 844—850.
39. Goldstein L., Newholme E. A. (1976), *Biochem. J.* **154**, 555—558.
40. Whitehouse S., Randle P. J. (1973), *Biochem. J.*, **134**, 651—653.
41. Whitehouse S., Cooper R. H., Randle P. J. (1974) *Biochem. J.*, **141**, 761—744.
42. Williamson J. R., Meijer A. J., Ohkawa K. (1974), w *Regulation of Hepatic Metabolism*, red. Lundquist F., Tygstrup N., Thaysen J. H., 457—479, Munksgaard, Copemhagen.
43. Wong D. T., Fuller R. W., Molloy B. B. (1973) *Adv. Enzymol. Regul.* **11**, 139—159.
44. Snell K., Duff D. A. (1977), *Biochem. J.*, **162**, 399—403.
45. Connelly J. L., Danner D. J., Bowden J. A. (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 1198—1203.
46. Bowden J. A., Connelly J. L. (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3526—3531.
47. Johnson W. A., Connelly J. L. (1972), *Biochemistry* **11**, 1967—1973.
48. Parker P. J., Randle P. J. (1978) *Biochem. J.*, **171**, 751—758.
49. Kaziro Y., Ochoa S., Warner R. C., Chen J. Y. (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 1917—1923.
50. Hegre C. S., Lane M. D. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 172—180.
51. Kaziro Y., Leone E., Ochoa S. (1960) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **46**, 1319—1327.
52. Halenz D. R., Feng J. Y., Hegre C. S., Lane M. D. (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 2140—2147.
53. Scholte H. R. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* **178**, 137—144.
54. Scholte H. R., Groot P. H. E. (1975), *Biochim. Biophys. Acta* **409**, 283—296.
55. Wilk M. (1977), praca doktorska.
56. Kaziro Y., Ochoa S. (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 3131—3136.
57. Ochoa S., Kaziro Y. (1961), *Fed. Proc.*, **20**, 982—988. -

58. Kaziro Y., Ochoa S. (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 1460—1468.
59. Kosow D. P., Lane M. D. (1962), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 439—443.
60. Lane M. D., Lynen F. (1963), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **49**, 379—385.
61. Mc Clure W. R., Lardy H. A., Cleland W. W. (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3584—3590.
62. Giorgio A. J., Plaut G. W. (1967), *Biochim. Biophys. Acta* **139**, 487—501.
63. Davis E. J., Quastel J. H. (1964), *Can. J. Biochem.*, **42**, 1605—1621.
64. Davis E. J., Lin R. C., Li-Shan Chao D. (1972) w *Energy metabolism and the regulation of metabolic processes in mitochondria*, red. M. A. Mehlman, R. W. Hanson, str. 211—238, Academic Press, London, New York.
65. Felig P., Pozefsky T., Marliss S., Cahill G. F. (1970), *Science* **167**, 1003—1004.
66. Felig P. (1975) *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 933—955.
67. Malette L. E., Exton J. H., Park C. R. (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5713—5723.
68. Ross B. D., Hems R., Krebs H. A. (1967), *Biochem. J.*, **102**, 942—951.
69. Manchester K. L. (1965), *Biochim. Biophys. Acta* **100**, 295—298.
70. Crabtree B., Higgins S. J., Newsholme E. A. (1972), *Biochem. J.*, **130**, 391—396.
71. Solberg H. E., Bremer J. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **222**, 372—380.
72. Bremer J., Davis E. J. (1978), *Biochim. Biophys. Acta* **528**, 269—275.
73. Danner D. J., Bowden J. A. (1966), *Fed. Proc.*, **25**, 747.
74. Weidemann M. J., Krebs H. A. (1969), *Biochem. J.*, **111**, 69—81.
75. Chan T. M., Freedland R. A. (1972), *Biochem. J.*, **127**, 539—543.
76. Blair J. B., Cook D. E., Lardy H. A. (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3608—3614.
77. Scrutton M. C., Utter M. F. (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1723—1735.
78. Utter M. F., Barden R. E., Taylor B. L. (1975), *Adv. Enzymol.*, **42**, 2—65.
79. Pennington R. J., Sutherland T. M. (1956), *Biochem. J.*, **63**, 618—628.
80. Leng R. A., Steel J. W., Luick J. R. (1967), *Biochem. J.*, **103**, 785—790.
81. Bergman E. N., Katz M. L., Kaufman C. F. (1970), *Am. J. Physiol.*, **219**, 785—792.
82. Smith R. M., Osborne-White W. S. (1971), *Biochem. J.*, **124**, 867—876.
83. Wolff J. E., Bergman E. N. (1972), *Am. J. Physiol.* **223**, 455—459.
84. Weckes T. E. C. (1974), *Comp. Biochem. Physiol.*, **49/3B**, 393—406.
85. Malette L. E., Exton J. H., Park C. R. (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5724—5728.
86. Buse M. G., Biggers J. F., Drier C., Buse J. F. (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 697—706.
87. Wilk M. (1974), XII Zjazd PTBioch., Warszawa, Streszczenia D-27, str. 104.
88. Bøhmer T., Bremer J. (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **152**, 559—567.
89. Chang T. W. (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3677—3684.

Tabelę 1 i Ryc. 3 reprodukowano za zgodą autorów i wydawców: Elsevier/North-Holland, Amsterdam i Annual Reviews Inc., Palo Alto.

IRENA BORKOWSKA *)

Metabolizm aminokwasów i białek mózgu w przebiegu fenyloketonurii

Brain Amino Acids and Protein Metabolism in Phenylketonuria

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Katabolizm fenyloalaniny w mózgu
- III. Zaburzenia procesu syntezy serotoniny i katecholamin
- IV. Fenyloketonuria a metabolizm witaminy B₆
- V. Fenyloalanina jako inhibitor glikolizy w mózgu
- VI. Mechanizmy hamowania syntezy białek mózgowych
- VII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Catabolism of phenylalanine in the brain
- III. Disorders of serotonin and catecholamines synthesis
- IV. Phenylketonuria and vitamin B₆ metabolism
- V. Phenylalanine as an inhibitor of the brain glycolysis
- VI. Mechanisms of the inhibition of neural protein synthesis
- VII. Concluding remarks

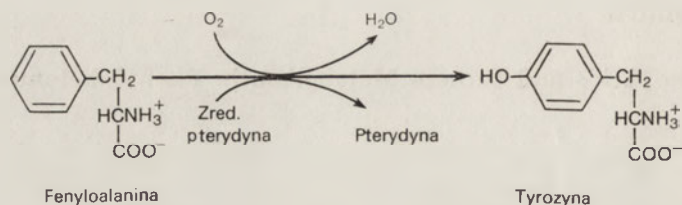
I. Wstęp

Syntezę białka w ośrodkowym układzie nerwowym zwierząt cechuje szczególna wrażliwość na wszelkie nieprawidłowości, które prowadzą do zakłócenia równowagi aminokwasów wewnątrz komórki. Zapotrzebowanie mózgu na aminokwasy jest w zasadzie takie samo jak innych tkanek, z tą jednak różnicą, że do tzw. aminokwasów niezbędnych należy również tyrozyna. Stanowi ona nie tylko składnik białek mózgowych, lecz jest również prekursorem neurotransmiterów, takich jak dopamina i noradrenalina. Ważnym źródłem tyrozyny w ustroju jest fenyloalanina, a enzy-

*) Prof. dr hab., Zakład Chemii Fizjologicznej, Instytut Chemii Podstawowych, Akademia Medyczna, ul. Lubartowska 85, 20-123 Lublin.

mem katalizującym swoiście utlenianie fenyloalaniny do tyrozyny jest hydroksylaza fenyloalaninowa (E.C. 1.14.16.1).

Enzym ten występuje przede wszystkim w wątrobie, nie wykryto go natomiast w mózgu (1). Wprowadzie obecna w tkankach mózgu hydroksylaza tyrozynowa również katalizuje utlenienie fenyloalaniny do tyrozyny, lecz jej aktywność wobec fenyloalaniny jest zbyt mała aby zabezpieczyć zapotrzebowanie mózgu na ten aminokwas (2). Tak więc tyrozyna musi być doń dostarczona, przy czym jej transport zależy w znacznym stopniu od stężenia innych aminokwasów we krwi (3).



Ryc. 1. Utlenianie fenyloalaniny przy udziale hydroksylazy fenyloalaninowej

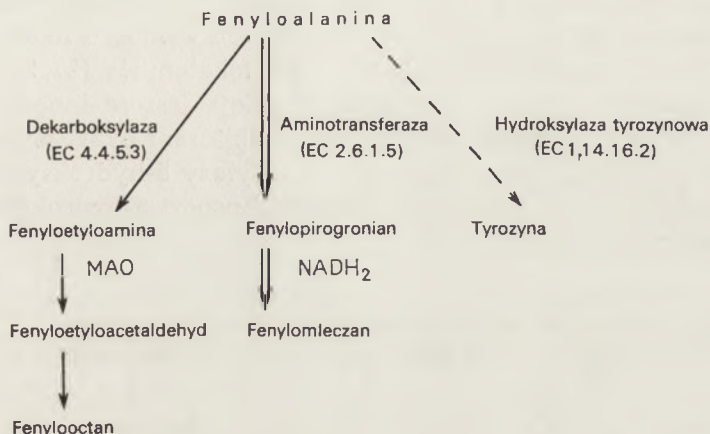
W przypadku wady metabolicznej polegającej na braku lub obniżonej aktywności hydroksylazy fenyloalaninowej w ustroju, dochodzi do gwałtownego wzrostu poziomu fenyloalaniny we krwi i w mózgu. Stężenie fenyloalaniny w osoczu osiąga nawet 50-krotnie wyższą wartość od prawidłowej wynoszącej 1,4 mg⁰%. Stan ten nazywamy hyperfenyloalaniniemią.

Równocześnie pojawiają się we krwi i moczu produkty katabolizmu fenyloalaniny pod postacią fenylopirogronianu i jego pochodnych. Schorzenie wywołane brakiem w ustroju hydroksylazy fenyloalaninowej jest zaburzeniem genetycznie uwarunkowanym i w związku z jego objawami nazywanym fenyloketonurią. Groźną jej konsekwencją jest niedorozwój umysłowy i somatyczny. Stąd też pierwotnie nazwano schorzenie *imbecilitas phenilopyruvica* (4), lub *oligophrenia phenilopyruvica* (5). Mimo, że częstotliwość występowania fenyloketonurii jest stosunkowo niewielka (1 na 10 000 do 20 000), zainteresowanie tą wadą metaboliczną jest wciąż duże, ponieważ próby wyjaśnienia w jaki sposób prowadzi ona do zmian psychicznych i somatycznych nie dały dotąd jednoznacznej odpowiedzi.

Doświadczalną fenyloketonurię można wywołać różnymi sposobami. Zwierzętom podaje się duże dawki L-fenyloalaniny bądź w diecie pokarmowej (7—10 g/kg wagi ciała) (6), bądź też drogą dootrzewnowej iniekcji (1—2 mg/g wagi ciała). Inny sposób polega na podawaniu analogów fenyloalaniny, a mianowicie p-chlorofenyloalaniny (7, 8, 9, 10) lub α -metylofenyloalaniny (11), które *in vivo* hamują hydroksylazę fenyloalaninową. W efekcie dochodzi do hyperfenyloalaninonii wraz z jej typowymi następstwami.

II. Katabolizm fenyloalaniny w mózgu

W warunkach fizjologicznych fenyloalanina po przejściu z krwi do mózgu zostaje wbudowana do białek, lub też ulega procesom katabolicznym przedstawionym na rycinie 2.

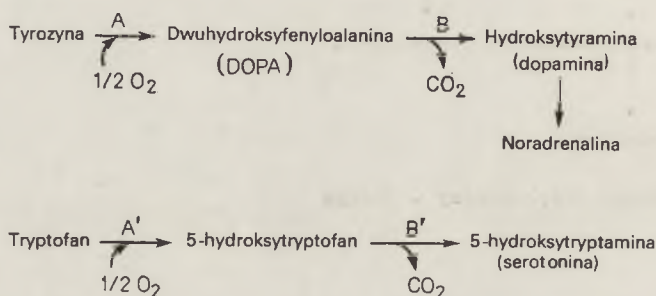


Ryc. 2. Katabolizm fenyloalaniny w mózgu

Główną drogą przemiany fenyloalaniny w komórce nerwowej jest jej transaminacja prowadząca do powstania kwasu fenylopirogronowego zredukowanego następnie do kwasu fenylmleczkowego. Drugą drogę stanowi dekarboksylacja fenyloalaniny do β -fenyletyloaminy, która podobnie jak inne aminy biogenne jest utleniana przy udziale monoaminooksydazy do kwasu fenylloctowego. Trzecia możliwość przemiany fenyloalaniny poprzez utlenianie do tyrozyny zachodzi tylko w niewielkim stopniu, ponieważ hydroksylaza tyrozynowa wykazuje małą aktywność wobec fenyloalaniny. Wszystkie produkty katabolizmu fenyloalaniny zostały dobrze scharakteryzowane (12, 13, 14, 15, 16), a z enzymów uczestniczących w przemianach wykazano w mózgu zarówno aminotransferazę katalizującą proces transaminacji fenyloalaniny (17), jak i dekarboksylazę aminokwasów aromatycznych (18) oraz dwa typy monoaminooksydazy (19). Nie wykryto natomiast oksydazy fenylopirogronianowej, która katalizuje w wątrobie reakcję powstawania kwasu o-hydroksyfenylloctowego (20). Nagromadzenie w ustroju fenylopirogronianu, fenylmleczanu i fenylloctanu jest typowym objawem towarzyszącym hiperfenylalaninemii. Nic więc dziwnego, że właśnie kwasom aromatycznym przypisywano od dawna toksyczne działanie na centralny układ nerwowy.

III. Zaburzenia procesu syntezy serotoniny i katecholamin

W licznych przypadkach hyperfenyloalaninemii zaobserwowano wyraźny spadek poziomu katecholamin (21, 22) i serotoniny (23, 24) zarówno w mózgu, jak i innych tkankach. Fakt ten tłumaczono między innymi tym, że kwasy aromatyczne są inhibitorami zarówno dekarboksylazy dwuhydroksyfenyloalaniny (25) (reakcja B na Ryc. 3), jak i dekarboksylazy 5-hydroksytryptofanu (26) (reakcja B' na Ryc. 3). Powstały nawet sugestie, że właśnie niski poziom amin biogennych w mózgu może powodować niedorozwój umysłowy u dzieci z fenyloketonurią (27, 28, 29). Odnosnie zahamowanej syntezy serotoniny istnieją jeszcze inne koncepcje, a mianowicie, że sama fenyloalanina jest inhibitorem hydroksylazy tryptofanu (30) (reakcja A' na Ryc. 3), dekarboksylazy 5-hydroksytryptofanu (31) (reakcja B' na Ryc. 3) oraz, że hamuje transport 5-hydroksytryptofanu do tkanki mózgu (32).



Ryc. 3. Hamujący wpływ fenyloalaniny i jej metabolitów na syntezę amin biogennych w mózgu

IV. Fenyloketonuria a metabolizm witaminy B₆

Ciekawą hipotezę dotyczącą neurotoksycznego działania metabolitów przemiany fenyloalaniny w mózgu wysunięto na podstawie badań nad funkcją witaminy B₆. Jak wiadomo pod nazwą witaminy B₆ rozumiemy mieszaninę pirydoksalu, pirydoksaminy oraz pirydoksyny — inaczej zwanej pirydoksolem ze względu na obecność grupy alkoholowej. Związki te łatwo przechodzą jedne w drugie i spełniają różnorodną rolę. Szczególnie ważny jest udział fosforanu pirydoksalu w reakcjach transaminacji. W badaniach nad metabolizmem witaminy B₆ w mózgu zwierząt z fenyloketonurią wykazano, że podany drogą iniekcji [¹⁴C]pirydoksol ulega najpierw utlenieniu do pirydoksalu, a następnie ufosforylowaniu do fosforanu pirydoksalu. Jednakże aktywność właściwa fosforanu pirydoksalu w mózgu zwierząt z hyperfenyloalaninią okazała się znacznie niższa niż u zwierząt zdrowych (33). Inhibitorem reakcji fosforylacji pirydoksalu jest pirydoksylidenofenylloaminy (34, 35). Jest to związek o charakte-

rze zasady Schiffa, który powstaje *in vivo* z połączenia β -fenyloetyloaminy, (a więc produktu dekarboksylacji fenyloalaniny) z pirydoksałem (15). Posiada on działanie neurotoksyczne.

Równocześnie z doświadczeniami przy użyciu [^{14}C]pirydoksołu przeprowadzono badania po dootrzewnowym podaniu [^3H]L-fenyloalaniny. Stwierdzono, że zarówno u zwierząt z doświadczalną fenyloketonurią, jak i u zwierząt kontrolnych, 95% produktów katabolizmu fenyloalaniny w mózgu stanowią kwasy aromatyczne, przy czym pirydoksamina zapobiega ich nagromadzeniu się (36). Opierając się na tych danych wysunięto koncepcję, że fosforan pirydoksaminy, bądź sama pirydoksamina spełniają rolę przENOŚNIKA, który pomaga w usuwaniu nadmiaru kwasu fenylopirogonowego z tkanki mózgu. Za tą koncepcją przemawiać może fakt, że w mitochondriach mózgowych występuje fosforan pirydoksaminy (37), a także aminotransferaza fenyloalaninowa (38, 39, 40).

V. Fenyloalanina jako inhibitor glikolizy w mózgu

Jest rzeczą znaną, że układ nerwowy jest szczególnie wrażliwy na spadek dopływu glukozy i tlenu. Tkanki nerwowe czerpią bowiem potrzebną im energię prawie wyłącznie ze spalania glukozy, gdyż stężenie glikogenu wynosi zaledwie około 0,1%. Podstawową reakcję zapoczątkowującą proces glikolizy jest fosforylacja glukozy katalizowana przez heksokinazę. W badaniach *in vivo* wykazano, że fenyloalanina jest inhibitorem kompetycyjnym heksokinazy, a także kinazy pirogronianowej (41, 42), która katalizuje przeniesienie reszty fosforanowej z fosfoenolpirogonianu na ADP, w wyniku czego tworzy się ATP oraz pirogronian, który jest podstawowym substratem oksydatywnej fosforylacji w mózgu. Takie zaburzenia procesu glikolizy i brak efektu energetycznego odbijają się niekorzystnie na pracy ośrodkowego układu nerwowego i mogą być powodem niedorozwoju umysłowego.

VI. Mechanizmy hamowania syntezy białek mózgowych

Wiele uwagi poświęcono badaniom dotyczącym wpływu dużych stężeń fenyloalaniny na metabolizm białka w tkance mózgowej. Wydawało się bowiem wielce prawdopodobne, że zaburzenia syntezy makrocząsteczek mogą być główną przyczyną zmian w centralnym układzie nerwowym.

Zarówno w doświadczeniach przeprowadzonych *in vitro*, jak i *in vivo* wykazano, że fenyloalanina hamuje proces syntezy białek mózgowych (43, 44, 45, 46, 47). Zaobserwowano wyraźny spadek inkorporacji [^{35}S]metioniny do białek mielinowych (48), [^{14}C]lizyny do białek rybosomalnych (49), a także [^{14}C]tyrozyny do frakcji białek jądrowych (50).

Nasuwa się pytanie, który z etapów syntezy białka ulega zahamowaniu przez nadmiar fenyloalaniny. Wysunięto wiele sugestii dotyczących tego

zagadnienia. Proces syntezy białek mózgowych jest ściśle uzależniony od transportu aminokwasów poprzez barierę krwimózgową, od wewnątrzkomórkowej kompartmentacji, a także od różnic w stężeniu aminokwasów w zależności od obszaru mózgu. Ze względu na złożoność każdego z tych procesów, badania są szczególnie trudne, a wyniki często kontrowersyjne.

Jak wynika z dotychczasowych obserwacji, przechodzenie aminokwasów przez barierę krwimózgową jest uzależnione od chemicznego charakteru aminokwasu oraz od stężenia poszczególnych aminokwasów we krwi. Aminokwasy obojętne o długim łańcuchu alifatycznym łatwiej przechodzą do mózgu w porównaniu z pozostałymi aminokwasami. Ponadto w szybkości przechodzenia przez barierę krwimózgową istotne znaczenie posiada mechanizm kompetycyjnego hamowania jednego aminokwasu przez inny (51—59).

Jest faktem bezspornym, że przy wysokim stężeniu fenyloalaniny zmienia się poziom puli wolnych aminokwasów w mózgu (43, 44, 47, 49, 60, 61, 62). Obserwuje się wyraźny spadek wewnątrzkomórkowej zawartości aminokwasów, przede wszystkim leucyny, izoleucyny, waliny, tryptofanu i metioniny (47, 60). Fenyloalanina hamuje bowiem transport aminokwasów do wnętrza komórki mózgowej, co wykazano zarówno *in vitro* (59, 63, 64, 65), jak i *in vivo* (66). Dotyczy to szczególnie transportu aminokwasów obojętnych o długim łańcuchu alifatycznym oraz tyrozyny (67). Co więcej stwierdzono, że nadmiar fenyloalaniny powoduje nie tylko zaburzenie procesu przenikania powyższych aminokwasów do wnętrza komórki, lecz również ich ucieczkę z mózgu (47, 61). Tak więc hiperfenyloalaninemia pociąga za sobą znamienne zmiany w metabolizmie leucyny, izoleucyny, tyrozyny, waliny, tryptofanu i metioniny. Warto zauważyć, że są to aminokwasy, których stężenie w mózgu jest bardzo niskie. Zdaniem wielu autorów, spadek wewnątrzkomórkowego stężenia aminokwasów jest podstawowym powodem zahamowanej syntezy białka w hiperfenyloalaninemii (48, 60, 61, 62).

Równocześnie zwrócono uwagę na polirybosomy komórek mózgu, które charakteryzują się małą stabilnością w porównaniu z polisomami innych tkanek zwierzęcych (68, 69). Okazało się, że podanie fenyloalaniny w badaniach *in vivo* powoduje ich szybką dezagregację (61, 62, 70). Zjawisko to występuje w mózgu niedojrzałym, szczególnie w obszarze kory mózgowej młodych zwierząt (71).

Zdaniem niektórych autorów dezagregacja polirybosomów jest wynikiem rybonukleolitycznej aktywności, która wzrasta w hiperfenyloalaninemii (72). Odmienne wnioski wypływają z pracy, w której udowodniono, że obserwowany rozpad polisomów zachodził niezależnie od hydrolitycznego działania rybonukleazy, a gromadzące się w cytoplazmie monorybosomy były nieaktywne, tzn. niezwiązane ani z mRNA, ani z peptydylo-tRNA (71). Wskazywać to może, że fenyloalanina nie wpływa bezpośrednio na

rozpad polisomów, lecz powoduje raczej zakłócenie równowagi między zakończeniem, a reinicjacją syntezy białka. Jest rzeczą niezmiernie interesującą, że ten negatywny wpływ fenyloalaniny można częściowo znieść przez jednorazowe wstrzyknięcie do mózgu 7 aminokwasów obojętnych. Iniekcja mieszaniny zawierającej walinę, leucynę, metioninę, tyrozynę, tryptofan i treoninę w ilości po 0,075 mg każdego z aminokwasów na gram wagi ciała, powoduje w efekcie zmniejszenie ilości wolnych monorybosomów, a wzrost ilości polirybosomów (73). Przestrzeganie ściśle określonej ilości wyżej wymienionych aminokwasów jest rzeczą niezmiernie ważną, okazało się bowiem, że wyższe dawki prowadzą do rozpadu polirybosomów podobnie jak to obserwowano w przypadku nadmiaru fenyloalaniny (74).

Jednym z powodów hamowania etapu inicjacji syntezy białka może być zaburzony proces aminoacylacji tRNA. Wysłunęto sugestie, że nadmiar fenyloalaniny przeszkadza w aktywacji syntetaz aminoacylo-tRNA, a tym samym nie dopuszcza do utworzenia aminoacylo-tRNA (65). W badaniach *in vitro* wykazano, że podczas inkubacji zawiesiny komórek mózgowych ze znakowanymi aminokwasami w obecności 14 mM fenyloalaniny, tworzy się znacznie mniej [¹⁴C]leucylo-tRNA oraz [¹⁴C]izoleucylo-tRNA, w porównaniu z doświadczeniami bez dodatku fenyloalaniny (47). Wynik ten jednak nie świadczy o zahamowaniu procesu aminoacylacji tRNA, ponieważ leucyna i izoleucyna są właśnie tymi aminokwasami, których transport do wnętrza komórki jest utrudniony w obecności nadmiaru fenyloalaniny.

Najwięcej danych na temat procesu aminoacylacji tRNA dostarczyły wyniki badań przeprowadzonych *in vivo* (75). W doświadczeniach zastosowano metodę utleniania nadjodanem wolnego tRNA, pozwalającą określić ilości tRNA występującego *in vivo* w postaci specyficznych aminoacylo-tRNA (76, 77). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że jednorazowe dootrzewnowe podanie L-fenyloalaniny powodowało już po 45 min. wzrost w tkance mózgu ilości alanylo-tRNA, lizylo-tRNA i leucylo-tRNA. Ich stężenie było około 15% wyższe w porównaniu z wartościami uzyskanymi w doświadczeniach kontrolnych. Równocześnie wykazano, że stężenie metionylo-tRNA^{met} zapoczątkowującego syntezę białka wyraźnie spada po podaniu fenyloalaniny. Na tej podstawie wyrażono pogląd, że wzrost stężenia alaniny, lizyny i leucyny w formie związanej z tRNA przy równoczesnym spadku ich stężenia w puli wolnych aminokwasów, świadczy o zahamowanej syntezie białka. Odpowiedzialnym natomiast za proces hamowania jest przede wszystkim etap inicjacji syntezy na skutek bezpośredniego wpływu fenyloalaniny na aminoacylację tRNA^{met} (75). Tym cenniejsze wydają się być spostrzeżenia dotyczące możliwości zniesienia negatywnego działania fenyloalaniny przez podawanie odpowiednich ilości aminokwasów obojętnych. W najnowszych badaniach wykazano, że można w ten sposób sprowadzić do normy poziom aminoacylacji inicjatorowego tRNA^{met} oraz przyspieszyć proces przedłużenia łańcucha polipeptydowego (74).

VII. Uwagi końcowe

Jak widać z przytoczonych danych, badania nad przebiegiem syntezy białek mózgowych w hiperfenyloalaninemii zajmują centralną pozycję wśród prac dotyczących fenyloketonurii. Fakt ten jest uzasadniony, bowiem fenyloketonuria należy do tej grupy schorzeń, które są najbardziej niebezpieczne w okresie rozwoju osobniczego (78, 79, 80). Ostatnim procesem, który można zaliczyć do zjawisk rozwoju osobniczego jest mielinogeneza. U człowieka rozpoczyna się już w ostatnich miesiącach życia płodowego, a czas tworzenia włókien mielinowych pozostaje w pewnym związku z okresem włączania się odnośnych włókien w tok normalnej pracy układu nerwowego. Nic więc dziwnego, że obserwowany u chorych z fenyloketonurią (81, 82), jak i w doświadczalnej hiperfenyloalaninemii u zwierząt (83, 84) niedostateczny proces mielinizacji, może prowadzić do zakłócenia normalnego toku rozwoju somatycznego i umysłowego.

Trudno w obecnym stanie wiedzy odpowiedzieć na pytanie, który z molekularnych mechanizmów przedstawionych w niniejszym artykule ponosi główną odpowiedzialność za zaburzenia w biosyntezie białka w hiperfenyloalaninemii. Wydaje się wielce prawdopodobne, że ze względu na dużą wrażliwość metaboliczną mózgu w okresie rozwojowym, każda zmiana bądź nieprawidłowość przemiany aminokwasów, a szczególnie metioniny i tryptofanu, musi znaleźć odbicie w zaburzeniu biosyntezy białek mózgowych.

Zaakceptowano 18.12.1978

PIŚMIENNICTWO

1. Udenfriend S., Cooper J. R., (1952), *J. Biol. Chem.*, **194**, 503—511.
2. Dunn A. J., Bondy S. C., (1974), *Functional Chemistry of the Brain, Nutritional Requirement*, str. 30—32, Spectrum Publications, Inc. Flushing, New York.
3. Chirigos M. A., Greengard P., Udenfriend S., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 2075—2079.
4. Fölling A., (1934), *Ztschr. Physiol. Chemie*, **277**, 169—
5. Jervis G. H., (1937), *Arch. Neurol. Psychiatr.*, **38**, 944—
6. Wang H. L., Waisman H. A., (1961), *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, **108**, 332—335.
7. Koe B. K., (1967), *Med. Pharmac. Exp.*, **17**, 129—138.
8. Lipton M. A., Gordon R., Guroff F., Udenfriend S., (1967), *Science*, **N. Y.**, **156**, 248—250.
9. Pryor G., Mitoma C., (1970), *Neuropharmacology*, **9**, 269—276.
10. Dhondt J. L., Dautrevaux M., Biserte G., Farriaux J. J., (1977), *Biochemie*, **59**, 713—717.
11. Greengard O., Yoss M. S., Del Valle J. A., (1976), *Science*, **192**, 1007—1008.
12. Goldstein F. B., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 2656—2661.
13. Zannoni V. G., Weber W. W., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 1340—1344.
14. Weber W. W., Zannoni V. G., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 1345—1349.

15. Loo Y. H., (1967), *J. Neurochem.*, **14**, 813—821.
16. Blau K., (1970), *Clin. Chim. Acta*, **27**, 5—18.
17. Fonnum F., Haavaldsen R., Tangen O., (1964), *J. Neurochem.*, **11**, 109—118.
18. Lovenberg W., Weissbach H., Udenfriend S., (1962), *J. Biol.Chem.*, **237**, 89—93.
19. Johnston J. P., (1968), *Biochem. Pharmac.*, **17**, 1285—1297.
20. Taniguchi K., Armstrong M. D., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 4091—4097.
21. Weil-Malherbe H., Bone A. D., (1955), *J. Ment. Sci.*, **101**, 733—739.
22. Boylen J. B., Quastel J. H., (1961), *Biochem. J.*, **80**, 644—648.
23. Pare C. M. B., Sandler M., Stacey R. S., (1957), *Lancet*, **1**, 551—553.
24. Huang I., Hsia D. Y. Y. (1963), *Proc. Soc. Exp. Biol.* **112**, 81—85.
25. Fellman J. H., (1956), *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **93**, 413—417.
26. Davison A. N., Sandler M., (1958), *Nature* **181**, 186—187.
27. Perry T. L., (1962), *Science*, **136**, 879—880.
28. Woolley D. W., van der Hoeven T., (1964). *Science* **144**, 883—884.
29. Woolley D. W., van der Hoeven T., (1964), *Science* **144**, 1593—1594.
30. Baldrige R. C., Borofsky L., Baird H., Reichle F., Bullock D., (1959), *Proc. Soc. Exp Biol. Med.*, **100**, 529—531.
31. Boggs D. E., Rosenberg R., Waisman H. A., (1963), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **114**, 356—358.
32. McKean C. M., Schanberg S. M., Giarman N. J., (1962), *Science* **137**, 604—605.
33. Loo Y. H., Mack K., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 2377—2383.
34. Loo Y. H., Ritman P., (1967), *Nature*, **213**, 914—916.
35. Loo Y. H., Whittaker U. P., (1967), *J. Neurochem.*, **14**, 997—1011.
36. Loo Y. H., Mack K., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 2385—2394.
37. Loo Y. H., Mack K., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 499—502.
38. Miller J. E., Litwack G., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**, 149—159.
39. Mark J., Pugge H., Mandel P., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 1393—1401.
40. Semba T., Civen M., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 795—800.
41. Weber G., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **63**, 1365—1369.
42. Miller A. L., Hawkins R. A., Veech R. L., (1973), *Science* **179**, 904—906.
43. Appel S. H., (1969), *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **29**, 63—70.
44. Roberts S., (1967), *Progress in Brain Research*, red. Ford D. H. Lajtha A., str. 235—243, Elsevier Amsterdam.
45. Lindroos O. F. C., Oja S. S. (1971), *Exp. Brain Res.*, **14**, 48—60.
46. Barra H. S., Arce C. A., Rodriguez J. A., Caputto R., (1973), *J. Neurochem.* **21**, 1241—1251.
47. Hughes J. V., Johnson T. C., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 1105—1113.
48. Agrawal H. C., Bone A. H., Davison A. N., (1970), *Biochem. J.* **117**, 325—331.
49. Swaiman K. F., Hosfield W. B., Lemieux B., (1968), *J. Neurochem.*, **15**, 687—690.
50. Peterson N. A., McKean C. M., (1969), *J. Neurochem.*, **16**, 1211—1217.
51. Richter J. J., Wainer A., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 613—620.
52. Oldendorf W. H., Szabo J., (1976), *Am. J. Physiol.*, **230**, 94—98.
53. Wade L. A., Katzman E., (1975), *J. Neurochem.*, **25**, 837—842.
54. Pardridge W. M., Oldendorf W. H., (1977), *J. Neurochem.*, **28**, 5—12.
55. Pardridge W. M., (1977), *J. Neurochem.*, **28**, 103—108.
56. Etienne P., Young S. N., Sourkes T. L., (1976), *Nature*, **262**, 144—145.
57. Fernstrom J. D., (1977), *Metabolism*, **26**, 207—223.

58. Yuwiler A., Oldendorf W. H., Geller E., Braun L., (1977), *J. Neurochem.*, **28**, 1015—1023.
59. Tews J. K., Good S. S., Harper A. E., (1978), *J. Neurochem.*, **31**, 581—589.
60. Mc-Kean C. M., Boggs D. E., Peterson N. A., (1968), *J. Neurochem.*, **15**, 235—241.
61. Aoki K., Siegel F. L., (1970), *Science*, **168**, 129—130.
62. Siegel F. L., Aoki K., Colwell R. E., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 537—547.
63. Neame K. D., (1961), *Nature*, **192**, 173—174.
64. Neame K. D., (1968), *Prog. Brain Res.*, **29**, 185—199.
65. Appel S. H., (1970), *Protein Metabolism of Nervous System* red. Lajtha A., str. 621—630, Plenum Press N. York.
66. Linneweh F., Ehrlich M., Graul E. H., Hundeshagen H., (1963), *Klin. Wschr.*, **41**, 253—255.
67. Guroff G., Udenfriend S., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 803—806.
68. Zomzely C. E., Roberts S., Brown D. M., Provost C., (1966), *J. Mol. Biol.*, **20**, 455—468.
69. Zomzely C. E., Roberts S., Gruber C. P., Brown D. M., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5396—5409.
70. MacInnes J. W., Schlesinger S., (1971), *Brain Res.*, **29**, 101—110.
71. Taub F., Johnson T. C., (1975), *Biochem. J.*, **151**, 173—180.
72. Roberts S., Morelos B. S., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 387—400.
73. Hughes J. V., Johnson T. C., (1977), *Science*, **195**, 402—404.
74. Hughes J. V., Johnson T. C., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **517**, 473—485.
75. Hughes J. V., Johnson T. C., (1977), *Biochem. J.*, **162**, 527—537.
76. Allen R. E., Raines P. L., Regen D. M., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **190**, 323—336.
77. Johnson T. C., Chou L., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 405—414.
78. Waisman H. A., Wang H. L., Palmer G., Harlow H. F., (1960), *Nature*, **188**, 1124—1125.
79. Johnson T. C., Luttgies M. W., (1966), *J. Neurochem.*, **13**, 545—552.
80. Gilbert B. E., Johnson T. C., (1972), *J. Cell. Biol.*, **53**, 143—147.
81. Menkes J. H., (1968), *Neurology*, **18**, 1003—1008.
82. Shah S. M., Peterson N. A., McKean C. M., (1972), *J. Neurochem.* **19**, 2369—2376.
83. Prenskey A. L., Fishman M. A., Daftari B., (1971), *Brain. Res.*, **33**, 181—191.
84. Shah S. M., Peterson N. A., McKean C. M., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 479—485.

WIESŁAW MAKAREWICZ *)

Cykl nukleotydów purynowych

The Purine Nucleotide Cycle

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Cykliczność przemiany nukleotydów
- III. Właściwości enzymów katalizujących reakcje cyklu nukleotydów purynowych
- III-1. Syntetaza adenylobursztynianowa
- III-2. Liaza adenylobursztynianowa
- IV. Dowody doświadczalne cyklicznej przemiany nukleotydów purynowych
- V. Znaczenie metaboliczne cyklu nukleotydów purynowych
- V-1. Znaczenie cyklu nukleotydów purynowych w regulacji stężeń AMP, ADP, ATP
- V-2. Cykl nukleotydów purynowych jako droga katabolizmu aminokwasów
- V-3. Cykl nukleotydów purynowych a regulacja glikolizy mięśniowej

Contents

- I. Introduction
- II. Cyclic metabolism of nucleotides
- III. Properties of enzymes of the purine nucleotide cycle
- III-1. Adenylosuccinate synthetase
- III-2. Adenylosuccinate lyase
- IV. Experimental evidence for the occurrence of the purine nucleotide cycle
- V. Metabolic role of the purine nucleotide cycle
- V-1. Significance of the purine nucleotide cycle for regulation of the concentrations of AMP, ADP and ATP
- V-2. The purine nucleotide cycle as a pathway for catabolism of aminoacids
- V-3. Purine nucleotide cycle and regulation of muscle glycolysis

*) Doc. dr hab., Zakład Biochemii, Instytut Biologii Medycznej Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk.

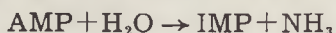
Autor uczestniczył w realizacji problemu R.-1.9-03.02 koordynowanego przez Politechnikę Wrocławską.

Wykaz stosowanych skrótów: EDTA — sól sodowa kwasu etyleno-dwuamino-czterooctowego; P_i — ortofosforan nieorganiczny; PP_i — pirofosforan; SAMP — adenylobursztynian; DG — 2-dezoksyglukoza; CP — fosfokreatyna; FDP — fruktozo-1,6-dwu-fosforan; F6P — fruktozo-6-fosforan; G6P — glukozo-6-fosforan; DHAP — fosfodwu-hydroksyaceton; GAP — aldehyd 3-fosfoglicerynowy.

I. Wstęp

Nukleotydy adeninowe nie tylko uczestniczą bezpośrednio w przemianach energetycznych komórki, lecz także modulują aktywność szeregu enzymów. Wielkość stosunku $[ATP] + 1/2[ADP]/[ATP] + [ADP] + [AMP]$ wyrażająca tzw. „ładunek energetyczny adenylanów” (ang. adenylate energy charge), jest głównym czynnikiem regulującym na poziomie cząsteczkowym natężenie procesów katabolicznych i anabolicznych komórki (1, 2, 3).

Pula nukleotydów adeninowych w komórce w istotny sposób zależy od reakcji katalizowanej przez dezaminazę AMP (EC. 3.5.4.6):



Kwas inozynomonofosforowy będący produktem tej reakcji jest w przeciwieństwie do AMP nukleotydem mało czynnym biologicznie, a amoniak jest związkiem wysoce toksycznym. Enzym katalizujący tę reakcję jest specyficzny dla AMP i występuje powszechnie w tkankach zwierzęcych; szczególnie wysoką jego aktywność obserwowano w mięśniach szkieletowych, gdzie został on opisany po raz pierwszy w 1928 r. przez Gerarda Schmidta (4).

Już w latach 20-tych udowodniono, że reakcja katalizowana przez dezaminazę AMP odpowiedzialna jest za powstawanie amoniaku w pracujących mięśniach szkieletowych i w wynaczynionej krwi (5—8).

W 1934 r. Paweł Oster n (9) pracujący w lwowskiej pracowni kierowanej przez Jakuba Parnasa, opierając się na spostrzeżeniu, że ilość amoniaku oddawanego do krwi przez pracujący mięsień przewyższa wielokrotnie ilość zawartego w nim kwasu adenozy-5-monofosforowego, wysunął hipotezę, że proces ten ma charakter cykliczny i że następować musi reaminacja powstającego podczas amoniogenezy IMP do AMP. Dalszych przesłanek świadczących o tym, że grupa aminowa nukleotydów adeninowych ulega intensywnej wymianie dostarczyły doświadczenia na zwierzętach, którym *in vivo* podawano cytrynian amonu znakowany azotem ^{15}N . Doświadczenia te wykazały, że azot ^{15}N pojawiał się szybko w grupie aminowej nukleotydów adeninowych mięśni szkieletowych (10), przy czym wbudowywanie izotopu ^{15}N do grupy aminowej nukleotydów adeninowych przewyższało dwukrotnie wbudowywanie tego izotopu do pierścienia purynowego (11). Stwierdzono także, że włączanie azotu ^{15}N do grupy aminowej nukleotydów adeninowych było wielokrotnie szybsze jeżeli zamiast cytrynianu amonu użyto jako substratu kwasu asparaginowego znakowanego azotem ^{15}N (11, 12).

Proces reaminacji IMP stanowiący zarazem końcowy etap biosyntezy *de novo* nukleotydów adeninowych, przebiega w tkankach zwierzęcych podobnie jak u drożdży i u bakterii (11, 13—16). Związkiem pośrednim jest kwas adenylobursztynowy, którego synteza z IMP i asparagianu sprzężona jest z hydrolizą GTP.

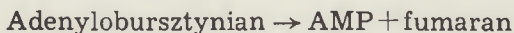
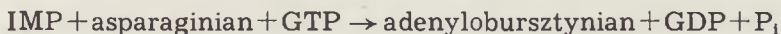
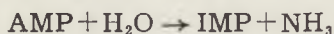
Dopiero w latach 70-tych Tornheim i Lowenstein uzyskali przekonujące dowody doświadczalne na to, że w mięśniach szkieletowych zwierząt, dezaminacja AMP i reaminacja powstałego IMP tworzą proces cykliczny i nazwali go cyklem nukleotydów purynowych (17—20).

W artykule przedstawione zostaną obserwacje świadczące o cyklicznym przebiegu przemian $AMP \rightarrow IMP \rightarrow AMP$, właściwości i rozpoznanie enzymów uczestniczących w tym procesie, jak również znaczenie tego procesu dla metabolizmu komórkowego.

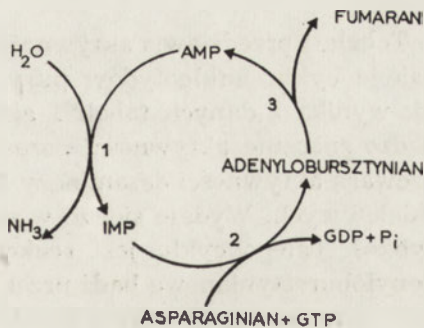
W ubiegłych latach na łamach *Postępów Biochemii* ukazały się artykuły omawiające metabolizm nukleotydów w mięśniach szkieletowych (21) i właściwości dezaminazy AMP (22, 23). W 1972 r. w czasopiśmie *Physiological Review* ukazała się praca przeglądowa J. M. Lowenstaina omawiająca wcześniejsze badania nad cyklem nukleotydów purynowych (19).

II. Cykliczność przemiany nukleotydów

Na proces cykliczny okreśłany mianem cyklu nukleotydów purynowych składają się trzy następujące reakcje:



Powyższe reakcje przedstawione są w formie cyklu na rycinie 1. Pierwszą reakcją hydrolytycznego odszczepienia amoniaku od cząsteczki AMP katalizuje wspomniana już we wstępie dezaminaza AMP. Druga i trzecia reakcja stanowią dwuetapowy proces reaminacji IMP. Azot potrzebny do reaminacji IMP pochodzi z asparagianu, a źródłem energii dla syntezy adenylobursztynianu jest hydroliza GTP. Rozszczepienie adenylobursztynianu przebiega niehydrolytycznie, przy czym łańcuch węglowy pochodzący z asparagianu uwalniany jest w postaci fumaranu. Wszystkie trzy enzymy katalizujące reakcje cyklu nukleotydów purynowych, a miano-



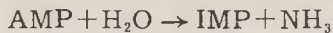
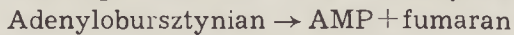
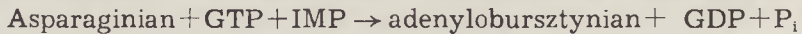
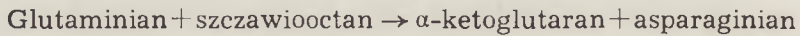
Ryc. 1. Cykl nukleotydów purynowych

Liczby przedstawiają nazwy enzymów: 1. Dezaminaza AMP, (EC. 3.5.4.6; AMP-aminohydrolaza). 2. Syntetaza adenylobursztynianowa [EC. 6.3.4.4; ligaza IMP: L-asparagian (GDP)]. 3. Liaza adenylobursztynianowa (EC. 4.3.2.2; AMP-liaza adenylobursztynianu).

wicie dezaminaza AMP (EC. 3.5.4.6), syntetaza adenylobursztynianowa (EC. 6.3.4.4) i liaza adenylobursztynianowa (EC. 4.3.2.2), występują w cytosolu komórki. Sumarycznie jeden „obrót” cyklu zapisać można następująco:



Zapis ten sugeruje, że przebieg cyklu nukleotydów purynowych wymaga obecności jedynie katalitycznych ilości AMP, IMP i adenylobursztynianu. Cykl ten może stanowić drogę dezaminacji asparaginianu, a także glutaminianu i innych aminokwasów, które mogą wchodzić w reakcje transaminacji ze szczawiooctanem. Dezaminacja aminokwasów np. glutaminianu na drodze cyklu nukleotydów purynowych wymaga następującej sekwencji reakcji:



Suma: $\text{Glutaminian} + \text{NAD}^+ + \text{GTP} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow$



Sumarycznie dezaminacja glutaminianu w toku cyklu nukleotydów purynowych przypomina oksydacyjną dezaminację glutaminianu katalizowaną przez dehydrogenazę glutaminianową z tym, że wskutek hydrolyzy wysokoenergetycznego wiązania fosforanowego w GTP, położenie stanu równowagi przesunięte jest w prawo i reakcja przebiega w tym kierunku ze spadkiem energii swobodnej -1 kcal (19). Natomiast reakcji oksydacyjnej dezaminacji glutaminianu katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową towarzyszy zmiana swobodnej energii 6,5 kcal w obecności NAD^+ , pH 7,0, co wskazuje, że termodynamicznie faworyzowana jest reduktywna aminacja α -ketoglutaranu, a nie oksydacyjna dezaminacja glutaminianu (24). Bliższe dane dotyczące porównania termodynamiki tych dwu procesów zawarte są w przeglądowej pracy Lowensteina (19).

Tabela 1 przedstawia aktywności enzymów katalizujących poszczególne reakcje cyklu nukleotydów purynowych w różnych tkankach szczeni. Jak wynika z danych tabeli 1 aktywność dezaminazy AMP przewyższa bardzo znacznie aktywności pozostałych enzymów. Szczególnie wyraźna przewaga aktywności dezaminazy AMP widoczna jest w przypadku mięśni szkieletowych. Wydaje się, że w różnych tkankach reakcją ograniczającą szybkość całego cyklu jest reakcja katalizowana bądź przez syntetazę adenylobursztynianową bądź przez liazę adenylobursztynianową. W mięśniach szkieletowych przy 0,5 mM stężeniu IMP aktywność syntetazy

Tabela 1

Aktywność enzymów cyklu nukleotydów purynowych w ekstraktach z różnych tkanek szczura

Źródło enzymu	Syntetaza adenylobursztynianowa	Liaza adenylobursztynianowa	Dezaminaza AMP
Mięśnie szkieletowe (29) 30°C, pH 7,0	0,46	0,38	157,0
Mózg (29) 30°C, pH 7,0	0,036	0,18	5,2
Nerki (28) 37°C, pH 7,2	1,27 ± 0,27*	1,38 ± 0,16*	44,0 ± 3,3*
Wątroba (26) 37°C, pH 7,0	0,33**		0,59

Liczby wyrażają ilość mikromoli substratu przekształcaną w ciągu minuty przez 1 tkanki, lub ilość nanomoli \times mg białka⁻¹ \times min⁻¹*

** Mierzone jako zdolność reaminacji IMP do AMP

adenylobursztynianowej przewyższa 3—6 krotnie maksymalną aktywność liazy adenylobursztynianowej (25).

Wprawdzie enzymy katalizujące reakcje cyklu nukleotydów purynowych są rozpowszechnione w tkankach zwierzęcych, to jednak w odniesieniu do większości tkanek nie ma danych doświadczalnych wskazujących, że cykl nukleotydów purynowych rzeczywiście w nich funkcjonuje. Możliwość cyklicznego przebiegu tych reakcji w doświadczeniach *in vitro* wykazano jak dotychczas w takich tkankach jak mięśnie szkieletowe (17, 18, 20), wątroba (26, 27), nerka (28) i mózg (29).

III. Właściwości enzymów katalizujących reakcje cyklu nukleotydów purynowych

Spośród trzech enzymów katalizujących reakcje składające się na cykl nukleotydów purynowych, najwcześniej poznanym i najlepiej zbadanym jest dezaminaza AMP. Właściwości tego enzymu, w tym również regulacja jego aktywności były przedmiotem odrębnego artykułu drukowanego niedawno w *Postęпах Biochemii* (23). Poniżej przedstawione zostaną właściwości dwu pozostałych enzymów, a mianowicie syntetazy i liazy adenylobursztynianowej, ze zwróceniem szczególnej uwagi na regulację ich aktywności.

III-1. Syntetaza adenylobursztynianowa

Syntetaza adenylobursztynianowa (EC. 6.3.4.4) katalizuje reakcję:
 IMP + asparaginian + GTP $\xrightarrow{\text{Mg}^{2+}}$ adenylobursztynian + GDP + P_i

Właściwości syntetazy adenylobursztynianowej z tkanek zwierzęcych zostały poznane stosunkowo niedawno. Krystaliczne preparaty tego enzymu otrzymano z mięśni szkieletowych królika (30) i szczura (31). Wysoko oczyszczone preparaty syntetazy adenylobursztynianowej otrzymano także z łożyska ludzkiego (32), mięśnia sercowego królika (33), i wątroby szczura (34). Najwyższa jej aktywność cechuje mięśnie szkieletowe. Przyjmując za 100% aktywność w mięśniach szkieletowych, aktywność w innych tkankach wynosi odpowiednio: w sercu, nerkach i wątrobie — około 40%, w mózgu i płucach — 10—20% (30). Enzym z mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego królika jest monomerem o masie cząsteczkowej 54 000 (30, 33), zaś krystaliczna syntetaza adenylobursztynianowa z mięśni szkieletowych szczura ma masę cząsteczkową 104 000 i zbudowana jest z dwu jednakowych podjednostek (31).

Enzymy z różnych źródeł przejawiają stosunkowo szerokie optimum pH w granicach 6,5—7,4 i do aktywności wymagają obecności jonów metali dwuwartościowych, przy czym najwyższą aktywność obserwowano w obecności magnezu (31, 32).

Syntetazę adenylobursztynianową cechuje bardzo wysoka specyficzność w stosunku do wszystkich substratów (30). Enzymy z różnych źródeł charakteryzują się różnymi stałymi Michaelisa w stosunku do IMP, asparagianu i GTP. W tabeli 2 zestawiono wartości stałych Michaelisa dla syntetazy adenylobursztynianowej z różnych źródeł. Znaczna różnorod-

Tabela 2

Wartości stałych Michaelisa (K_m) dla syntetazy adenylobursztynianowej z różnych źródeł

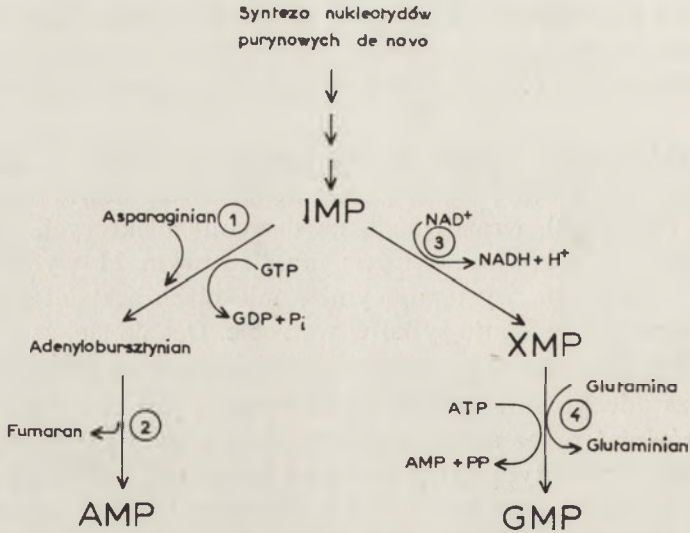
Źródło enzymu	Substrat (μM)		
	Asparagianin	IMP	GTP
Mięśnie szkieletowe			
królika (30)	300	200	10
królika (89)	290	107	12
szczura (34)	250	700	120
kurczęcia (89)	30	171	12
Mięsień sercowy królika (33)	310	110	13
Łożysko ludzkie (32)	950	37	31
Wątroba			
szczura (89)	360	30	15
szczura, izoenzym L (34)	1470	320	130
szczura, izoenzym M (34)	330	690	90
szczura, płodowa (89)	440	21	10
kurczęcia (89)	20	20	17
Mózg świni (89)	230	47	11
Rak Walkera (89)	381	30	16
Rak puchlinowy Ehrlicha (45)	50	30	100
Rak Nowikowa (89)	840	12	12
<i>E. coli</i> (38)	350	20	10

ność wartości K_m enzymów z różnych gatunków i różnych tkanek może być wyrazem różnorodności funkcji jaką spełnia reakcja katalizowana przez ten enzym w różnych tkankach i w różnych stanach metabolicznych.

W wątrobie szczura występują dwa izoenzymy syntetazy adenylbursztynianowej (34). Różnią się one immunologicznie, powinowactwem do substratów (Tabela 2), wrażliwością na działanie niektórych inhibitorów i wartościami punktów izoelektrycznych. Izoenzym M wydaje się być idenetyczny z enzymem występującym w mięśniach szkieletowych, natomiast izoenzym L występuje tylko w wątrobie. Ocenia się, że w wątrobie szczura 45% białka enzymatycznego stanowi forma M, a 55% forma L (34).

Syntetaza adenylbursztynianowa hamowana jest przez produkty reakcji, jak również przez szereg nukleotydów purynowych i pirymidynowych (31, 32). Nukleotydy purynowe są silniejszymi inhibitorami aniżeli nukleotydy pirymidynowe, natomiast nukleozydy i wolne zasady nie wywierają działania hamującego. Spośród nukleotydów efekt hamujący zmniejsza się w kolejności: nukleotydy monofosforanowe, dwufosforanowe, trójfosforanowe (32). Strukturalne analogi substratów lub produktów takie jak: bursztynian, argininobursztynian i kabamioilofosforan są także inhibitorami syntetazy adenylbursztynianowej (31, 32). Hamowanie przez bursztynian jest kompetycyjne w stosunku do asparagianu, natomiast niekompetycyjne w stosunku do IMP i GMP (31).

Reakcja katalizowana przez syntetazę adenylbursztynianową występuje w przemianach komórkowych w miejscu rozgałęzienia szlaków metabolicznych prowadzących do syntezy nukleotydów adeninowych i guaninowych (Ryc. 2). Nasuwa to przypuszczenie, że aktywność tego enzymu może podlegać ścisłej regulacji. Wyniki badań kinetycznych wysoce oczyszczonych preparatów syntetazy adenylbursztynianowej nie wskazują jednakże by enzym ten przejawiał właściwości enzymu allosterycznego. Wydaje się, że szybkość reakcji katalizowanej przez ten enzym kontrolowana jest głównie przez stężenia substratów, produktów i inhibitorów. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że oba szlaki metaboliczne przedstawione na rycinie 2, konkurują o wspólny substrat jakim jest IMP. W wielu tkankach, jak np. w łożysku, oba enzymy współzawodniczące o IMP, a mianowicie dehydrogenaza IMP i syntetaza adenylbursztynianowa, mają wartości K_m tego samego rzędu — co czyni te reakcje szczególnie podatne na regulacyjny wpływ zmian stężeń substratów. Przemawia za tym także fakt, że stałe inhibitorowe K_i adenylbursztynianu, AMP, XMP, GMP i GDP są tego samego rzędu wielkości co K_m dla IMP. Również obserwacja, że wartości K_m syntetazy adenylbursztynianowej z mięśni szkieletowych królika dla IMP, oraz K_i dla AMP są tego samego rzędu wielkości co ich stężenia w komórce wskazuje, że zmiany stężeń IMP i AMP mogą regulować szybkość syntezy adenylbursztynianu.



Ryc. 2. Biosynteza nukleotydów adeninowych i guaninowych z IMP

Liczby przedstawiają nazwy enzymów: 1. Syntetaza adenylobursztynianowa [EC. 6.3.4.4; liza IMP : L-asparaginian (GDP)]. 2. Liza adenylobursztynianowa (EC. 4.3.2.2; AMP-liza adenylobursztynianu). 3. Dehydrogenaza IMP (EC. 1.2.1.14; oksydoreduktaza IMP : NAD). 4. Syntetaza GMP [EC. 6.3.5.2; amido-ligaza ksantozyno-5-fosforan : L-glutamina (AMP)].

Synteza nukleotydów adeninowych, zapoczątkowana reakcją katalizowaną przez syntetazę adenylobursztynianową, kontrolowana jest w dwojaki sposób przez nukleotydy guaninowe i ksantynowe. GTP jest niezbędnym źródłem energii dla syntezy adenylobursztynianu, a ponadto aktywność syntetazy adenylobursztynianowej hamowana jest przez XMP, GMP i GDP, przy czym wartości K_i dla GMP i GDP są w przybliżeniu takie same lub nawet niższe aniżeli K_m dla GTP (31, 32).

Przekształcanie IMP bądź w adenylobursztynian bądź w XMP (Ryc. 2) podlega regulacji w sposób niezależny od regulacji biosyntezy puryn *de novo*. W hodowli ludzkich limfoblastów stwierdzono, że adenina — w stężeniu hamującym w 40% całkowitą biosyntezę puryn *de novo*, — hamowała syntezę nukleotydów adeninowych w 50—70% i równocześnie stymulowała w 20% syntezę nukleotydów guaninowych (33a). Dodana guanina wywierała efekt przeciwny. Odgrywają tu rolę nukleotydy powstające z adeniny i guaniny, o czym świadczy fakt, że gdy badano mutanty niezdolne do przemiany wolnych zasad w nukleotydy — wolne zasady nie wywierały tego efektu. Sugeruje to, że przemiany nukleotydów purynowych, a w szczególności reakcja katalizowana przez syntetazę adenylobursztynianową, mogą być regulowane odmiennie w tych komórkach, które uzyskują swoje nukleotydy purynowe wyłącznie z biosyntezy *de novo* i w tych, które mogą syntetyzować IMP z wolnej hipoksantyny. Tę ostatnią reakcję katalizuje fosforybozylotransferaza hipoksantynowa (EC. 2.4.2.8):

Hipoksantyna + 5-fosforybozylopirofosforan \rightarrow IMP + PP_i

W ten sposób produkt katabolizmu puryn — wolna hipoksantyna jest ponownie włączana w przemiany (ang. *salvage pathway*).

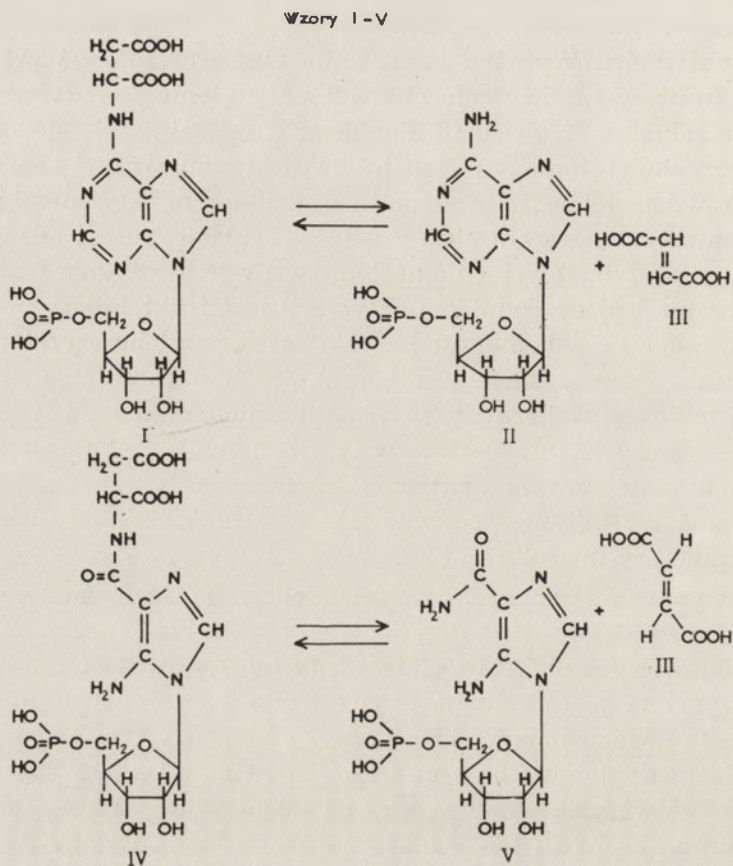
Stwierdzono niedawno, że syntetaza adenylobursztynianowa z mięśni szkieletowych szczura hamowana jest przez fruktozo-1,6-dwufosforan (35). Hamowanie to ma charakter niekompetycyjny w stosunku do wszystkich trzech substratów. Wyraźne hamowanie obserwowano już przy 10 μ M stężeniu fruktozo-1,6-dwufosforanu, a 2 mM stężenie powodowało nieomal całkowite zahamowanie reakcji. Ponieważ w mięśniu szkieletowym szczura w spoczynku stężenie fruktozo-1,6-dwufosforanu wynosi 40—60 μ M jest wielce prawdopodobne, że może on być regulatorem aktywności syntetazy adenylobursztynianowej *in vivo*. Przebieg regulacji syntezy adenylobursztynianu można sobie wyobrazić następująco: wzrost stężenia fruktozo-1,6-dwufosforanu, będący wynikiem aktywacji fosfofruktokinazy przez AMP, prowadzi poprzez zahamowanie syntetazy adenylobursztynianowej do zmniejszenia syntezy AMP i w konsekwencji do obniżenia aktywności fosfofruktokinazy. Wskazuje to na współzależność glikolizy i cyklu nukleotydów purynowych. Interesujące w tym kontekście jest spostrzeżenie, że w mięśniu szkieletowym syntetaza adenylobursztynianowa wydaje się być wiązana z F-aktyną, podobnie jak fosfofruktokinaza i niektóre inne enzymy glikolizy mięśniowej (36).

Porównanie kinetycznych właściwości dwu izoenzymów syntetazy adenylobursztynianowej występujących w wątrobie (Tabela 2) oraz stałych inhibitorowych dla AMP, GMP i fruktozo-1,6-dwufosforanu sugeruje, że izoenzymy te spełniają odmienne funkcje w przemianach (34). Izoenzym M — prawdopodobnie identyczny z izoenzymem występującym w mięśniach szkieletowych — ma większe powinowactwo do asparaginianu i cechuje się większą wrażliwością na hamowanie przez fruktozo-1,6-dwufosforan. Izoenzym ten wydaje się być predestynowany do regulacji glikolizy i amoniogenezy mięśniowej. Natomiast izoenzym L, charakterystyczny dla wątroby, cechuje się większym powinowactwem do IMP i jest bardziej wrażliwy na hamowanie przez AMP i GMP — co sugeruje, że jego funkcja fizjologiczna polega na udziale w biosyntezie nukleotydów purynowych. Za udziałem izoenzymu L w syntezie nukleotydów przemawia również to, że podczas regeneracji wątroby udział tego izoenzymu w całkowitej aktywności syntetazy adenylobursztynianowej wzrasta z 55% do 80% (37).

Badanie kinetyki syntetazy adenylobursztynianowej z łożyska ludzkiego (32) wskazuje, że reakcja przez nią katalizowana, podobnie jak reakcja katalizowana przez enzym z *E.coli* (38) przebiega według całkowicie losowego mechanizmu sekwencyjnego.

III-2. Liaza adenylobursztynianowa

Liaza adenylobursztynianowa (EC. 4.3.2.2) katalizuje w ciągu biosyntezy nukleotydów purynowych dwie odrębne reakcje przedstawione poniżej wzorami:



Pierwsza z reakcji polega na rozszczepieniu kwasu adenylobursztynowego (I) do AMP (II) i kwasu fumarowego (III), a druga na rozszczepieniu rybonukleotydu 4-N-sukcynylokarboksamido-5-aminoimidazolowego (IV) do rybonukleotydu 4-karboksy-5-aminoimidazolowego (V) i kwasu fumarowego (III). Reakcje te mają przebieg podobny i prowadzą do wbudowania azotu z kwasu asparaginowego w grupę aminową nukleotydów adeninowych i w pozycję 1 pierścienia purynowego.

Liazę adenylobursztynianową znaleziono w drożdżach (39), bakteriach (40) i roślinach (41), a także w takich tkankach zwierzęcych jak wątroba (42), mięśnie szkieletowe (13), eryocyty (43, 44) i komórki raka Ehrlicha (45, 46). Enzym z tkanek zwierzęcych ulega łatwo inaktywacji podczas izolowania, co było istotną przeszkodą w otrzymaniu wysoce oczyszczono-

nych preparatów. Dopiero niedawno udało się uzyskać preparat liazy adenylobursztynianowej z erytrocytów ludzkich oczyszczony 10 000 razy i stabilny podczas przechowywania przez 6 miesięcy w temperaturze 2°C w buforze zawierającym glicerol (44). Właściwości enzymów z drożdży i *Neurospora crassa* zostały opisane przez S. R a t n e r (47).

Najwyższą aktywność liazy adenylobursztynianowej obserwowano w mięśniach szkieletowych. Przyjmując aktywność w mięśniach szkieletowych za 100% — aktywność w mięśniu sercowym, wątrobie i mózgu wynosi 20—40%, a w erytrocytach 6% (44). Specyficzność enzymu w stosunku do adenylobursztynianu i rybonukleotydu 4-N-sukcynylokarboksyamido-5-aminoimidazolowego jest dość znaczna. Prócz wyżej wymienionych substratów rozkłada on także — jakkolwiek wolniej — 2-dezoksyadenylobursztynian i β-D-arabinozyloadenylobursztynian (48), natomiast nie rozszczepia sukcyloadeniny i sukcyloadenozyny (44). Reakcja katalizowana przez liazę adenylobursztynianową jest odwracalna; stała równowagi dla enzymu z drożdży w temp. 35°C, w pH 7,0 wynosi (39):

$$K = \frac{[\text{Fumaran}][\text{AMP}]}{[\text{Adenylobursztynian}]} = 8 \times 10^{-3} \text{ mola/l}$$

Optimum pH obu reakcji katalizowanych przez tę liazę wynosi 7,6—7,9 w buforze N-Tris (hydroksymetylo)metyloglicynowym i w buforze Tris/HCl (44). W tabeli 3 zestawiono wartości K_m obu substratów i K_i niektórych inhibitorów tego enzymu. Jak wynika z tych danych powinowactwo enzymu do adenylobursztynianu i rybonukleotydu 4-N-sukcyny-

Tabela 3

Stałe kinetyczne liazy adenylobursztynianowej z erytrocytów człowieka (44)

Substancja	$K_m^* \times 10^{-5} \text{ M}$	$K_i^* \times 10^{-5} \text{ M}$
Adenylobursztynian	0,23	—
Rybonukleotydy 4-N-sukcynylokarboksyamido-5-aminoimidazolowy	0,35	—
Rybonukleotydy 4-karboksy-5-aminoimidazolowy	—	1,0 kompet.
5-AMP	—	0,6 kompet.
Fumaran	—	16,0 niekompet.
Sukcyloadenina	—	2,7 kompet.
HPO_4^{2-}	—	48,0 kompet.
Rybozo-5-fosforan	—	300,0 kompet.
Asparaginian	—	200,0 kompet.
Cytrynian	—	1000,0 kompet.
Ryboza	—	nie hamuje

* Wartość pozorna.

Pomiary przeprowadzono w 0,05 M buforze N-Tris (hydroksymetylo)metyloglicynowym o pH 7,8 w temperaturze 37°C.

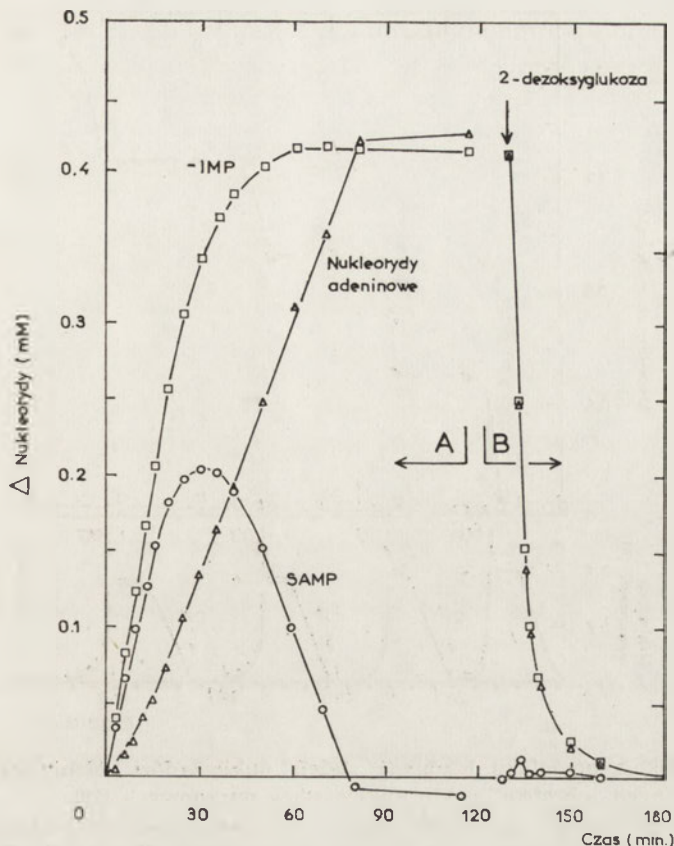
lokarboksyamido-5-aminoimidazolowego jest podobne. AMP hamuje silnie enzym w sposób kompetycyjny. Drugi produkt reakcji, fumaran, jest znacznie słabszym inhibitorem, przy czym inhibicja przez ten związek ma charakter niekompetycyjny.

Aktualnie dostępne dane nie wskazują by enzym ten posiadał właściwości regulacyjne.

IV. Dowody doświadczalne cyklicznej przemiany nukleotydów purynowych

Już dawne wyniki doświadczeń *in vivo* z zastosowaniem związków znakowanych ^{15}N sugerowały, że w mięśniach następuje cyklicznie dezaminacja AMP i reaminacja IMP (10—12). Jednak dopiero niedawno Tornheim i Lowenstein przeprowadzili doświadczenia w których można było ten proces prześledzić *in vitro*. Najbardziej przekonujące dane o przebiegu cyklu nukleotydów purynowych w mięśniach szkieletowych pochodzą z doświadczeń, w których obserwowano przemiany nukleotydów przy udziale wyciągów bezkomórkowych z mięśni szkieletowych (17, 18); z doświadczeń nad perfuzją mięśni (20), a także z badań nad zawartością nukleotydów i innych metabolitów w mięśniach szkieletowych *in situ*, w spoczynku i po drażnieniu impulsami elektrycznymi (20, 50).

Aby wykazać cykliczny przebieg procesów dezaminacji i reaminacji w układzie bezkomórkowym, należało ekstrakt mięśniowy pozbawić endogennych substratów i zapewnić możliwość regeneracji GTP, by przeciwdziałać zahamowaniu syntetazy adenylbursztynianowej przez wzrost stężenia GDP (18). Dzięki dodaniu heksokinazy do mieszaniny inkubacyjnej, która zawierała też endogenną aktywność kinazy adenylanowej, zapobiegano przekształceniu całego AMP w ATP. Przebieg tego rodzaju doświadczenia przedstawiono na rycinie 3. Część A ryciny 3 przedstawia proces reaminacji IMP, który ustaje po wyczerpaniu się zasobów fosfokreatyny. Druga część cyklu polegająca na dezaminacji wytworzonego AMP przedstawiona jest w części B ryciny 3. Wprowadzenie 2-dezoksyglukozy zamieniało ATP w AMP i prowadziło do gwałtownego spadku całkowitego stężenia nukleotydów adeninowych i ekwiwalentnego wzrostu stężenia IMP. Tej fazie cyklu towarzyszyło wytwarzanie amoniaku. Naprzemienne dodawanie do mieszaniny inkubacyjnej równoważnych ilości fosfokreatyny i 2-dezoksyglukozy prowadziło do kolejnych „obrotów” tego cyklu. Taka sytuacja przedstawiona jest na rycinie 4. Jak to widać na rycinie 4 wytwarzanie amoniaku zachodziło jedynie w fazie dezaminacji i niezbędna była do tego obecność zarówno IMP, jak i asparagianu; przy czym cztery kolejne „obroty” cyklu wytworzyły 3,5 mola amoniaku na mol IMP znajdującego się w wyjściowej mieszaninie inkuba-



Ryc. 3. Przebieg *in vitro* cyklu nukleotydów purynowych przy udziale enzymów z mięśni szkieletowych szczura (18).

A. Przekształcenie IMP w adenylobursztynian i w AMP.

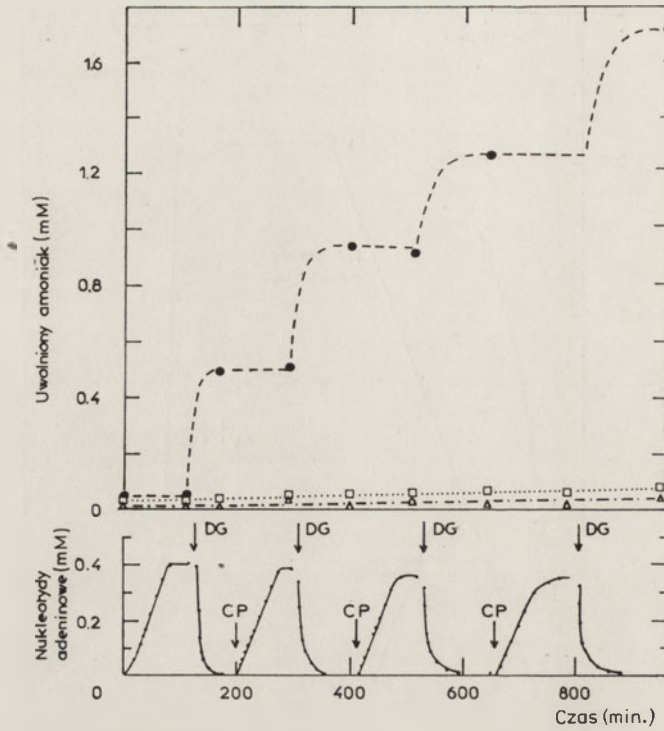
B. Dezaminacja AMP.

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 0,52 mM IMP; 0,3 mM GTP; 4 mM asparagianin; 27 mM bufor imidazol-HCl pH 6,7; 8,3 mM $MgCl_2$; 1,87 mM fosfokreatynę; 1,2 j/ml heksokinazy drożdżowej oraz ekstrakt mięśniowy w ilości odpowiadającej 1 mg białka na mililitr. Reakcję rozpoczynało dodanie białka z którym wprowadzano do mieszaniny inkubacyjnej: ortofosforan 2,5 mM; KCl 47 mM; EDTA 0,83 mM; ditiotritol 17 μM . Inkubację prowadzono w 31°C. Dezaminację AMP rozpoczynało dodanie 2-dezoksyglukozy o stężeniu końcowym 1,67 mM.

Przebieg reakcji monitorowano spektrofotometrycznie.

cyjnej. Wskazuje to, że katalityczne ilości nukleotydów adeninowych, adenylobursztynianu i IMP wystarczą dla prawidłowego przebiegu amoniogenezy z asparagianinu.

W zjawiskach dających się obserwować *in vitro* w doświadczeniach przedstawionych na rycinach 3 i 4 dopatrzeć się można pewnych analogii ze stanami fizjologicznymi spoczynku i znużenia mięśni szkieletowych. Pierwsza faza cyklu polegająca na reaminacji IMP do AMP ustaje po wykorzystaniu zasobów fosfokreatyny. Nukleotydy adeninowe zostają wówczas niejako „zablokowane” w formie ATP, co odpowiada sytuacji w mięśniu szkieletowym pozostającym w spoczynku. Rozkładowi ATP



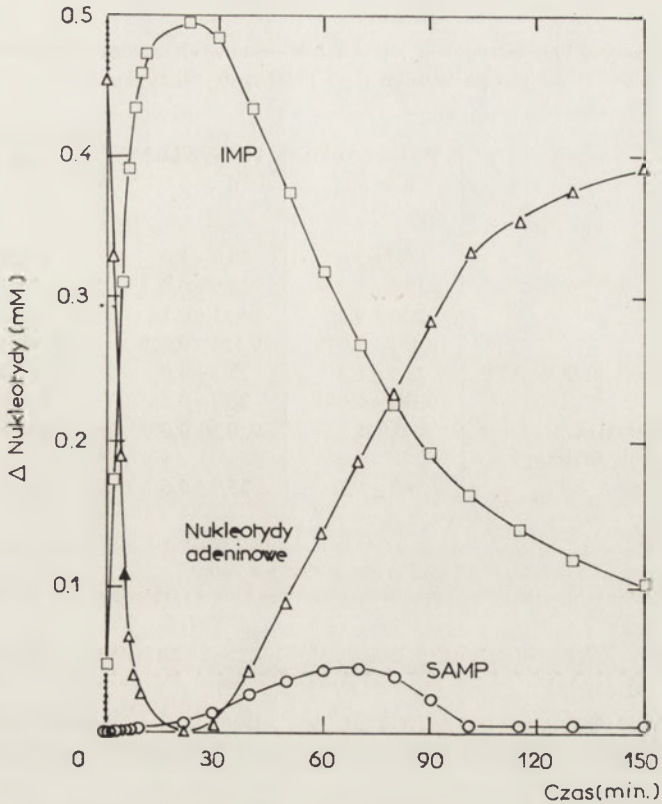
Ryc. 4. Produkcja amoniaku i zmiany stężeń nukleotydów adeninowych podczas czterech kolejnych „obrotów” cyklu nukleotydów purynowych (18).

Warunki doświadczenia takie same jakie opisano w legendzie do ryciny 3; reakcję rozpoczynało dodanie IMP o stężeniu końcowym 0,52 mM. Strzałki wskazują momenty dodawania 2-dezoksyglukozy (DG) i fosfokreatyny (CP). ● — kompletna mieszanina inkubacyjna, □ — mieszanina nie zawierająca IMP, △ — mieszanina nie zawierająca asparagianu.

spowodowanemu wprowadzeniem 2-dezoksyglukozy towarzyszy przemiana nukleotydów adeninowych w IMP — odpowiada to skurczowi tężcowemu, czyli stanowi mięśnia charakteryzującemu się skrajnym wyczerpaniem zasobów energetycznych.

Rycina 5 przedstawia wynik doświadczenia, które różni się tym od eksperymentu przedstawionego na rycinie 3, że wyjściowa mieszanina inkubacyjna nie zawierała fosfokreatyny; zawierała natomiast ATP zamiast IMP. W doświadczeniu tym dezaminację inicjowano dodaniem glukozy zamiast 2-dezoksyglukozy. Jak widać na rycinie 5 po początkowym gwałtownym spadku zawartości nukleotydów adeninowych i równoczesnym wzroście stężenia IMP — następuje faza reaminacji co manifestuje się spadkiem stężenia IMP, pojawieniem się adenylobursztynianu i wzrostem stężenia nukleotydów adeninowych. Taki przebieg doświadczenia wskazuje, że energia niezbędna dla reaminacji IMP pochodzi w tym przypadku z przemian glukozy.

Przedstawione powyżej wyniki doświadczeń z użyciem bezkomórkowych ekstraktów z mięśni szkieletowych znalazły potwierdzenie w bada-



Ryc. 5. Przebieg cyklu nukleotydów purynowych *in vitro*, przy udziale enzymów z mięśni szkieletowych szczura, w obecności glukozy jako źródła energii (18).

Mieszanka inkubacyjna zawierała 0,5 mM ATP natomiast nie zawierała fosfokreatyny i IMP. Ilość dodanego ekstraktu mięśniowego odpowiadała 1,4 mg białka na mililitr; stężenie heksokinazy wynosiło 1,3 j/ml. Reakcję rozpoczęła dodanie glukozy o stężeniu 1 mM. Pozostałe warunki doświadczenia takie same jak opisano w legendzie do ryc. 3.

niach opartych na perfuzji preparatu mięśni szkieletowych szczura (20). Podczas perfuzji mięśni szkieletowych stwierdzono, że istnieje ścisła współzależność pomiędzy wytwarzaniem amoniaku, IMP i kwasu mlekowego (20). Dane przedstawione w tabelach 4 i 5 dają wgląd w przemiany zachodzące w mięśniach pod wpływem drażnienia prądem elektrycznym, jak również podczas powrotu do stanu spoczynkowego.

Jak to przedstawia tabela 4 — stymulacja mięśni szkieletowych impulsami elektrycznymi *in situ* powoduje spadek całkowitej zawartości nukleotydów adeninowych, wzrost stężenia IMP — przy czym suma nukleotydy adeninowe plus IMP pozostaje stała. Pracy mięśniowej towarzyszy również pojawienie się adenylobursztynianu, który w mięśniach pozostających w spoczynku obecny jest jedynie w śladowych ilościach.

Tabela 5 przedstawia zmiany zawartości amoniaku, IMP i niektórych aminokwasów w mięśniach perfundowanych, oraz zmiany w uwalnianiu aminokwasów do płynu perfuzyjnego pod wpływem stymulacji prądem

Tabela 4

Zawartość fosfokreatyny i nukleotydów w mięśniach szkieletowych szczura w spoczynku, bezpośrednio po wysiłku i po krótkim wypoczynku (50)*

	W spoczynku n = 5	Po wysiłku** n = 5	Po wypoczynku 2,5 min. n = 4
Fosfokreatyna	84,0 ± 3,6	28,7 ± 3,0	70,4 ± 4,2
ATP	25,0 ± 1,2	18,9 ± 0,8	20,7 ± 1,0
ADP	3,12 ± 0,21	3,31 ± 0,15	2,67 ± 0,12
AMP	0,467 ± 0,046	0,556 ± 0,029	0,585 ± 0,023
Suma: AMP + ADP + ATP	28,5 ± 1,3	22,7 ± 0,8	24,0 ± 1,1
IMP	0,167 ± 0,014	2,97 ± 0,46	2,15 ± 0,37
Adenylobursztynian	0,001	0,017 ± 0,003	0,021 ± 0,004
Suma: AMP + ADP + + ATP + IMP	28,7 ± 1,3	25,7 ± 0,6	26,2 ± 0,74

* Liczby wyrażają $\mu\text{mole} \times \text{g suchej masy tkanki}^{-1}$ i są wartościami średnimi \pm średni błąd średniej arytmetycznej. Liczba zwierząt użytych do doświadczeń w każdej grupie podana jest jako n.

** Mięśnie drażniono *in situ* przez 15 min. impulsami elektrycznymi 10 ms z częstotliwością 5 impulsów na sekundę

elektrycznym. Zwraca uwagę znaczny wzrost zarówno zawartości jak i wydalania amoniaku, oraz towarzyszący temu wzrost zawartości IMP i spadek zawartości asparaginianu w mięśniach poddanych perfuzji. Podobne zmiany stwierdzono także w mięśniach człowieka poddanych uprzednio intensywnej pracy. Obserwowano 15% spadek całkowitej puli nukleotydów adeninowych i równoważny przyrost stężenia IMP (51).

Wszystkie przytoczone powyżej dane doświadczalne wskazują wyraźnie, że pracy mięśniowej towarzyszy intensywny przepływ metabolitów przez cykl nukleotydów purynowych.

Tabela 5

Wpływ wysiłku na zawartość i uwalnianie niektórych metabolitów przez mięśnie szkieletowe szczura poddane perfuzji (50)

	Zawartość w mięśniach* $\mu\text{mole} \times \text{g suchej masy}^{-1}$		Uwalnianie do płynu perfuzyjnego* na nomole $\times \text{g suchej masy}^{-1}$	
	W spoczynku	Po wysiłku**	W spoczynku	Po wysiłku**
Asparaginian	1,27 ± 0,13	0,76 ± 0,08		
Glutaminian	6,60 ± 0,14	4,12 ± 0,23		
Glutamina	15,8 ± 1,7	12,5 ± 1,4	54,9 ± 6,7	25,1 ± 4,9
Alanina	8,42 ± 1,35	9,67 ± 0,61	28,6 ± 3,1	13,6 ± 3,3
Amoniak	1,6 ± 0,01	4,95 ± 0,85	12,3 ± 2,7	97,0 ± 14,5
IMP	0,085 ± 0,033	4,73 ± 0,61		

* Liczby są średnią arytmetyczną \pm średni błąd średniej arytmetycznej z 5—10 doświadczeń.

** Perfundowane mięśnie drażniono poprzez nerw kulszowy impulsami elektrycznymi 10 V, 10 ms przez 15—30 min. z częstotliwością 1—6 impulsów na minutę.

V. Znaczenie metaboliczne cyklu nukleotydów purynowych

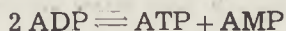
Cykl nukleotydów purynowych wydaje się spełniać następujące funkcje metaboliczne:

- regulacja całkowitego stężenia nukleotydów adeninowych oraz względnych stężeń AMP, ADP i ATP;
- uwalnianie amoniaku z aminokwasów;
- regulacja aktywności fosfofruktokinazy i dzięki temu całego procesu glikolizy.

Znaczenie tego cyklu w przemianach komórkowych różnych tkanek jest zapewne niejednakowe. I chociaż rola fizjologiczna tego cyklu w różnych tkankach jest wciąż kontrowersyjna — to jego bezpośredni związek z amoniogenezą i glikolizą mięśniową wydaje się być niewątpliwy.

V-1. Znaczenie cyklu nukleotydów purynowych w regulacji stężeń AMP, ADP i ATP

Wzajemny stosunek stężeń AMP, ADP i ATP określany jest przez stan równowagi w reakcji katalizowanej przez kinazę adenylanową:



Wiadomo, że w mięśniach szkieletowych cykl nukleotydów purynowych przyczynia się do utrzymania wysokiego stosunku [ATP]:[ADP] (52, 53). Następuje to dzięki temu, że dezaminacja AMP do IMP obniża stężenie AMP i przyczynia się do zwiększonej produkcji ATP z ADP w reakcji katalizowanej przez kinazę adenylanową. Podobny mechanizm, chroniący na krótki czas przed nadmiernym spadkiem nukleotydów adeninowych wydaje się funkcjonować także w mięśniu sercowym. Stwierdzono bowiem, że dezaminaza AMP z mięśnia sercowego królika jest aktywowana znacznie silniej przez ADP aniżeli przez ATP (54). Te właściwości regulacyjne enzymu powodują, że dezaminacja AMP w mięśniu sercowym przebiega wolno do czasu nagromadzenia się ADP. Także wyniki doświadczeń nad zachowaniem się rekonstruowanego układu glikolizy mięśniowej potwierdzają ochronną funkcję dezaminazy AMP w stosunku do puli nukleotydów adeninowych (55).

Dezaminacja AMP wydaje się odgrywać w wielu tkankach rolę w buforowaniu zmian ładunku energetycznego adenylanów wyrażającego się stosunkiem $[\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}] / [\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]$. To działanie stabilizujące ładunek energetyczny odbywa się kosztem obniżenia całkowitego stężenia nukleotydów adeninowych. Wykazano bowiem doświadczalnie dla wielu tkanek, że obniżeniu ładunku energetycznego towarzyszy spadek całkowitego stężenia nukleotydów adeninowych.

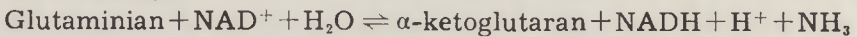
Aktywność dezaminazy AMP z mięśni szkieletowych i wątroby szczura maleje w miarę wzrostu ładunku energetycznego i w zakresie wartości fizjologicznych 0,7—0,9 zależność ta ma charakter liniowy (56, 57). Wraz-

liwość dezaminazy AMP na wahania wartości ładunku energetycznego jest także największa w tym fizjologicznym zakresie.

Wzrost szybkości dezaminacji AMP przy spadku wartości ładunku energetycznego zależy od bezwzględnej wielkości puli nukleotydów adeninowych (57). Stanowić to może mechanizm zabezpieczający komórkę przed całkowitą utratą nukleotydów adeninowych. Hipoteza taka znalazła potwierdzenie w doświadczeniach w których obserwowano gwałtowny spadek całkowitego stężenia nukleotydów adeninowych w wątrobie po obciążeniu fruktozą (58, 59). Obciążenie fruktozą obniża stężenie fosforanu nieorganicznego w wątrobie, który jest silnym inhibitorem dezaminazy AMP. W dalszej konsekwencji prowadzi to do zwiększonej dezaminacji AMP i spadku stężenia nukleotydów adeninowych (60—62). Jednakże obserwowany w tych warunkach maksymalny spadek całkowitego stężenia nukleotydów adeninowych nie przekracza granicy 1—2 mM — co może świadczyć o istnieniu mechanizmu zabezpieczającego komórkę przed dalszą utratą nukleotydów adeninowych (63, 64).

V-2. Cykl nukleotydów purynowych jako droga katabolizmu aminokwasów

W większości podręczników spotkać się można z poglądem, że centralną rolę w katabolizmie aminokwasów odgrywa reakcja oksydacyjnej dezaminacji glutaminianu katalizowana przez dehydrogenazę glutaminianową (EC. 1.4.1.3):



W myśl tego poglądu, wywodzącego się z badań Braunsteina (65), różne aminokwasy przekazują swoją grupę aminową w wyniku transaminacji na α -ketoglutaran, co prowadzi do wytworzenia glutaminianu. Glutaminian ulega następnie oksydacyjnej dezaminacji z wytworzeniem wolnego amoniaku.

W ostatnich latach zaczęto jednak poważnie poddawać w wątpliwość, czy reakcja katalizowana przez dehydrogenazę glutaminianową w warunkach *in vivo* przebiega w kierunku dezaminacji glutaminianu. Wysłunięto przypuszczenie, że katabolizm aminokwasów odbywać się może z udziałem cyklu nukleotydów purynowych, w toku którego następuje dezami-



Ryc. 6. Schemat powstawania amoniaku z aminokwasów za pośrednictwem cyklu nukleotydów purynowych.

nacja asparagininu (19, 26, 66). Tę drogę wytwarzania amoniaku jako produktu katabolizmu aminokwasów ilustruje rycina 6. W ujęciu przedstawionym na rycina 6 dezaminacji ulega asparaginin, a nie glutaminian. Glutaminian powstający w wyniku transaminacji różnych aminokwasów z α -ketoglutaranem jest donatorem grupy aminowej w reakcji katalizowanej przez aminotransferazę asparagininową.

Cały szereg obserwacji wskazuje, że amoniogeneza mięśniowa przebiega przy udziale cyklu nukleotydów purynowych. Mięśnie szkieletowe charakteryzują się wyjątkowo niską aktywnością dehydrogenazy glutaminianowej i wyjątkowo wysoką aktywnością dezaminazy AMP (Tabela 6). Wiadomo również, że mitochondria izolowane z mięśni szkieletowych szczura nie uwalniają amoniaku podczas inkubacji z glutaminianem; mają natomiast zdolność hydrolizowania glutaminy do amoniaku i kwasu glutaminowego (67).

Tabela 6

Porównanie aktywności dezaminazy AMP i dehydrogenazy glutaminianowej w różnych tkankach szczura* (19)

Tkanka	Aktywność*** dezaminazy AMP	Aktywność** dehydrogenazy glutaminianowej
Wątroba	1,1—2,0	248
Kora nerki	12,6	130
Mózg	14,7	32
Serce	1,6—4,4	11
Płuca	5,2	11
Śledziona	12,0	9,9
Jądra	5,5	4,2
Przepona	—	2,3
Mięśnie szkieletowe	127,0	1,3

* Aktywności enzymów zestawione w tabeli wyrażone są jako $\mu\text{mole} \times \text{g tkanki}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

** Aktywność dehydrogenazy glutaminianowej mierzono w kierunku reduktywnej aminacji α -ketoglutaranu w pH 7,4.

*** Aktywność dezaminazy AMP mierzono w pH 7,2.

Mięśnie szkieletowe są tkanką w której odbywają się bardzo intensywne przemiany aminokwasów. W spoczynku mięśnie szkieletowe uwalniają do krwi znaczne ilości alaniny i glutaminy (68, 69). Jak to widać z danych zawartych w tabeli 5 pracy mięśniowej towarzyszy zwiększona amoniogeneza i równocześnie zmniejszenie uwalniania alaniny i glutaminy.

Wątroba jest drugą oprócz mięśni szkieletowych tkanką intensywnie zaangażowaną w katabolizm aminokwasów. Amoniak wytworzony w wątrobie z przemian aminokwasów jest u zwierząt ureotelicznych zużywany do biosyntezy mocznika. Do niedawna mocno ugruntowany wydawał się

pogląd, że głównym źródłem amoniaku w wątrobie jest oksydacyjna dezaminacja glutaminianu. W ostatnich latach nagromadziło się jednakże cały szereg obserwacji świadczących o tym, że amoniak powstający w wątrobie nie pochodzi z reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową:

- równowaga w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową przesunięta jest znacznie w kierunku reduktywnej aminacji α -ketoglutaranu (24);
- podczas inkubacji izolowanych mitochondriów wątrobowych z glutaminianem 90% glutaminianu ulega transaminacji do asparagianu, a najwyżej 10% ulega dezaminacji z uwolnieniem amoniaku (70);
- w warunkach, gdy mitochondria wątrobowe syntetyzują cytrulinę z ornityny, CO_2 i amoniaku — zastąpienie amoniaku glutaminianem prowadzi do gwałtownego spadku syntezy cytruliny (71);
- leucyna, która jest aktywatorem dehydrogenazy glutaminianowej hamuje syntezę mocznika w izolowanych hepatocytach w obecności alaniny jako źródła azotu (66, 72).

Alternatywnym układem enzymatycznym pozwalającym na dezaminację aminokwasów w wątrobie jest cykl nukleotydów purynowych. W pracowni kierowanej przez Chappella stwierdzono, że w wątrobie szybkość wytwarzania amoniaku z asparagianu jest porównywalna z szybkością syntezy mocznika z alaniny (26, 27). Jakkolwiek aktywność dezaminazy AMP jest w wątrobie stosunkowo niska, to jednak w obecności 1 mM ATP może maksymalnie wynosić $6 \mu\text{moli} \times \text{min}^{-1} \times \text{g tkanki}^{-1}$, podczas gdy maksymalna szybkość dezaminacji glutaminianu przez izolowane mitochondria wątroby nie przekracza $0,4 \mu\text{moli} \times \text{min}^{-1} \times \text{g tkanki}^{-1}$ (26).

Wyniki innych doświadczeń nasuwają jednakże wątpliwość, czy cykl nukleotydów purynowych jest główną drogą katabolizmu asparagianu w wątrobie. Badając w izolowanych hepatocytach wątroby szczura przemianę L-asparaginy do glukozy i mleczanu stwierdzono, że zablokowanie transaminacji przez 2 mM kwas aminooksoctowy znacznie obniża wytwarzanie glukozy i amoniaku z L-asparaginy (73). Z drugiej strony, zahamowanie w hepatocytach syntetazy adenylobursztynianowej przez dodanie kwasu N-formylohydroksyaminooctowego (Hadacidin) nie wpływało znacząco na szybkość ureogenezy z L-alaniny, L-asparaginy i NH_4Cl jako substratów (73).

Krebs i grono jego współpracowników uważają, że katabolizm aminokwasów w wątrobie przebiega głównie z udziałem dehydrogenazy glutaminianowej. Zdaniem tych autorów stężenia substratów i produktów reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową są w wątrobie zbliżone do istniejących w stanie chemicznej równowagi (74—79). Reakcja katalizowana przez dehydrogenazę glutaminianową pozostaje w równowadze z reakcjami katalizowanymi przez aminotransferazę alaninową

i aminotransferazę asparaginianową. Zasadniczymi czynnikami determinującymi kierunek przebiegu tych reakcji są wahania stężenia jonu amonowego i stan redoksywny nukleotydów pirydynowych (77, 80).

Dehydrogenaza glutaminianowa przejawia bardzo złożone właściwości regulacyjne. Złożoność ta sugeruje, że enzym ten może spełniać wiele różnorodnych funkcji zależnie od stanu metabolicznego komórki, lub też, że funkcje tego enzymu w różnych tkankach są odmienne (81).

O ile rola dehydrogenazy glutaminianowej w katabolizmie aminokwasów w wątrobie jest wciąż przedmiotem dyskusji — to wydaje się być zupełnie pewnym, że enzym ten spełnia zasadniczą rolę w wiązaniu amoniaku w wypadku wzrostu jego stężenia. Podanie chlorku amonu szczurom *in vivo* powodowało szybki wzrost stężenia alaniny i asparagianu w wątrobie, a towarzyszył temu spadek stężenia α -ketoglutaranu (74, 82, 83). Podanie szczurom L-cykloseryny (inhibitora aminotransferazy asparaginianowej) przed podaniem chlorku amonu zapobiegało wzrostowi stężenia alaniny, ale przyrost stężenia asparagianu był wówczas jeszcze większy (74).

W nerce amoniak wydalany do moczu pochodzi w znacznej części, jak się wydaje, z cyklu nukleotydów purynowych (28). Przemawia za tym obserwacja, że w warunkach zwiększonej amoniogenezy spowodowanej podaniem szczurom NH_4Cl lub ograniczeniem potasu w diecie, następuje wzrost aktywności syntetazy adenylobursztynianowej i liazy adenylobursztynianowej w nerkach (28). Długotrwałe zakwaszanie organizmu szczura powoduje także wzrost aktywności dezaminazy AMP w nerkach (90).

Także w mózgu w powstawaniu amoniaku z przemian aminokwasów wydaje się pośredniczyć cykl nukleotydów purynowych (29). Porównanie maksymalnych aktywności syntetazy adenylobursztynianowej i liazy adenylobursztynianowej z aktywnością dehydrogenazy glutaminianowej w mózgu szczura wskazuje, że aktywności enzymów cyklu nukleotydów purynowych są wystarczająco wysokie dla wytworzenia całego amoniaku jaki powstaje w mózgu szczura. Stwierdzono również, że ilość produkowanego w mózgu amoniaku przewyższy maksymalną zdolność jego wytwarzania w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową (29).

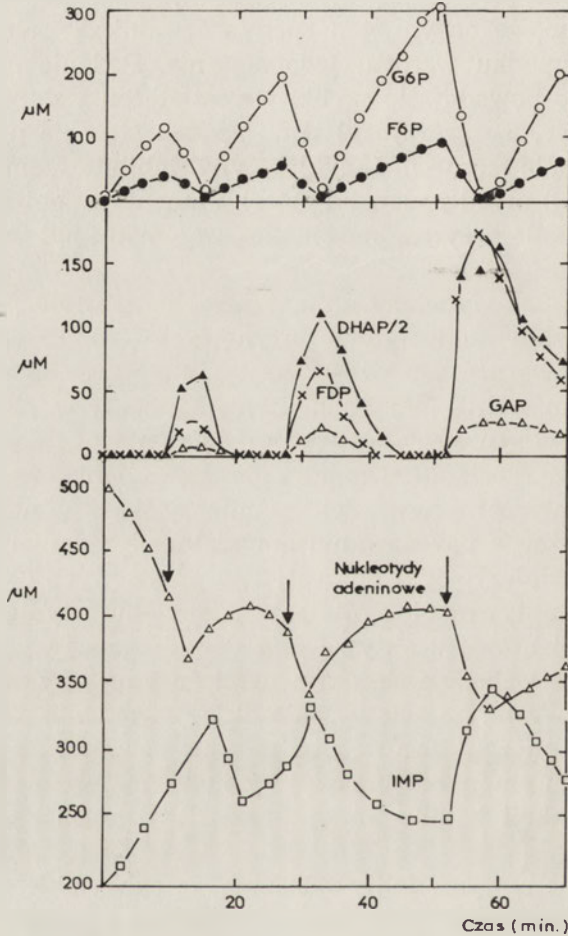
Przedstawione powyżej fakty wskazują, że cykl nukleotydów purynowych jest w całości odpowiedzialny za produkcję amoniaku w mięśniach szkieletowych. Najprawdopodobniej jest także znaczącym źródłem amoniaku wytwarzanego w innych tkankach, takich jak wątroba, nerki i mózg.

V-3. Cykl nukleotydów purynowych a regulacja glikolizy mięśniowej

Występowanie przeciwstawnych oscylacyjnych zmian stężeń fruktozo-6-fosforanu i fruktozo-1,6-dwufosforanu zaobserwowano po raz pierwszy badając proces glikolizy u drożdży (84). Podobne zjawisko obserwowano

także badając glikozę w ekstrakcie z mięśnia sercowego wołu. Wykazano, że za takie oscylacje odpowiedzialne są właściwości regulacyjne fosfofruktokinazy — enzymu katalizującego reakcję ograniczającą prędkość ciągu glikolitycznego (85).

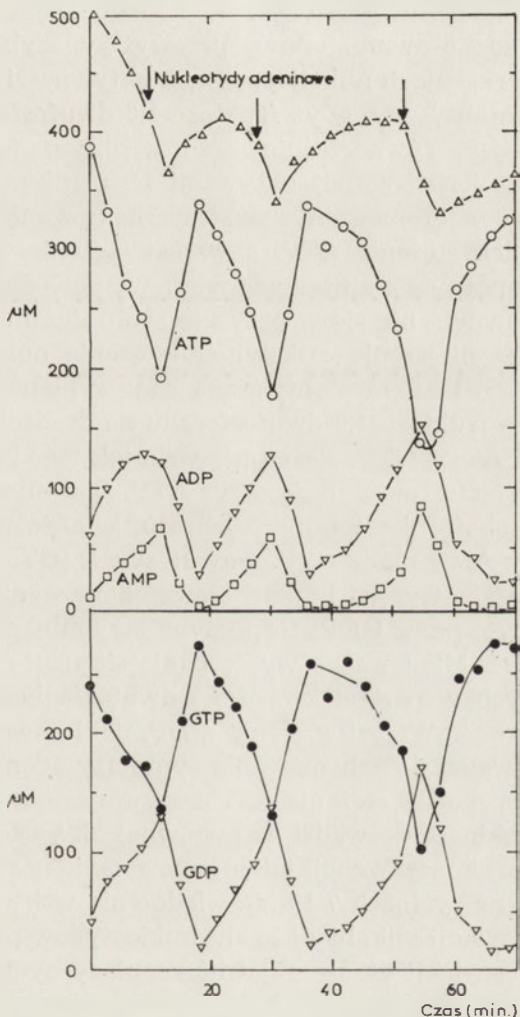
Tornheim i Lowenstein (25, 52) badając *in vitro* cykl nukleotydów purynowych w ekstraktach z mięśni szkieletowych szczura, zaobserwowali oscylacyjne zmiany stężeń AMP, adenylobursztynianu i IMP. Oscylacje stężeń metabolitów cyklu nukleotydów purynowych były zsyn-



Ryc. 7. Oscylacje całkowitego stężenia nukleotydów adeninowych, IMP oraz glukozy-6-fosforanu, fruktozo-6-fosforanu, fruktozo-1,6-dwufosforanu, fosfoglicerynowego i aldehydu 3-fosfoglicerynowego w przebiegu cyklu nukleotydów purynowych w ekstrakcie z mięśni szkieletowych szczura (52).

Mieszanina inkubacyjna zawierała: 0,5 mM ATP; 0,3 mM GTP; 4 mM asparagian; 0,03 j/ml heksokinazy drożdżowej; 1 μ M NAD^+ ; 7,5 mM ortofosforan; 27 mM bufor imidazol-HCl pH 6,6; 8,3 mM MgCl_2 . Reakcję rozpoczynało dodanie bezpośrednio po sobie ekstraktu mięśniowego w ilości 1,3 mg białka na mililitr i glukozy o stężeniu 10 mM. Wraz z ekstraktem mięśniowym wprowadzono dodatkowo do mieszaniny inkubacyjnej: KCl 47 mM; EDTA 0,83 mM; ditiotreitoll 17 μ M i ortofosforan 2,5 mM. Temperatura inkubacji 30°C.

chronizowane z wahaniami stężeń NADH—co nasunęło przypuszczenie, że pozostają one w związku z glikolizą mięśniową. Oscylację stężeń nukleotydów adeninowych, IMP oraz intermediatów glikolizy, w przebiegu cyklu nukleotydów purynowych, przedstawia rycina 7. Jak to widać na rycinie 7, spadkowi stężenia nukleotydów adeninowych towarzyszył spadek stężenia glukozy-6-fosforanu i fruktozy-6-fosforanu. Równocześnie widoczny był przyrost fruktozy-1,6-dwufosforanu, aldehydu 3-fosfoglicerynowego i fosfodwuhydroksyacetonu. Amplituda tych oscylacji wzrastała w miarę upływu czasu. Rycina 8 przedstawia towarzyszące oscylacjom glikolitycznym wahania stężeń ATP, ADP, AMP oraz GTP i GDP. Jak widać, w momencie gdy całkowite



Ryc. 8. Oscylacje stężeń AMP, ADP, ATP oraz GDP i GTP w przebiegu cyklu nukleotydów purynowych w ekstrakcie z mięśni szkieletowych szczura (52).

Warunki doświadczenia takie same jakie opisano w legendzie do rycin 7.

stężenie nukleotydów adeninowych jest najniższe, najmniejsze są także stężenia ATP i GTP, a najwyższe stężenia ADP, AMP i GDP.

Generację oscylacji w doświadczeniach przedstawionych na rycinach 7 i 8 autorzy tłumaczą następująco. W chwili rozpoczynania reakcji jedynym nukleotydem adeninowym obecnym w mieszaninie reakcyjnej jest ATP, który hamuje aktywność fosfofruktokinazy. Po dodaniu glukozy następuje jej fosforylacja pod wpływem heksokinazy, co powoduje spadek stężenia ATP i zmniejszenie zahamowania aktywności fosfofruktokinazy. Równocześnie dzięki reakcji katalizowanej przez kinazę adenylanową wzrasta stężenia AMP — aktywatora fosfofruktokinazy. W miarę nagromadzania się fruktozo-6-fosforanu i aktywacji fosfofruktokinazy, zaczyna powstawać fruktozo-1,6-dwufosforan. W momencie, gdy szybkość wytwarzania fruktozo-1,6-dwufosforanu, przewyższy szybkość jego zużycia w dalszych reakcjach glikolizy, wzrost aktywności fosfofruktokinazy staje się autokatalityczny, gdyż fruktozo-1,6-dwufosforan będący produktem reakcji, jest równocześnie bardzo silnym jej aktywatorem. W wyniku tej autokatalitycznej aktywacji fosfofruktokinazy następuje gwałtowne zużycie nagromadzonych estrów heksozomonofosforanowych i gwałtowny spadek stężenia ATP, a wzrost stężenia ADP. W wyniku reakcji katalizowanej przez kinazę adenylanową powoduje to wzrost stężenia AMP co uzewnętrznia się w przyspieszeniu dezaminacji i prowadzi do gwałtownego zmniejszenia całkowitego stężenia nukleotydów adeninowych. Na rycinie 7 i 8 te momenty zaznaczone są pionowymi strzałkami. Dalszy metabolizm fruktozo-1,6-dwufosforanu na drodze glikolizy prowadzi do regeneracji ATP i GTP. Następuje wskutek tego ponowne zahamowanie aktywności fosfofruktokinazy przez ATP. Dezaminacja AMP ustaje również wskutek obniżenia stężenia substratu, a także wskutek zahamowania dezaminazy AMP przez GTP. Gdy stosunek $[GTP]/[GDP]$ osiągnie wartość wystarczająco wysoką by zniwelować hamowanie syntetazy adenylbursztynianowej przez GDP, rozpoczyna się aminacja IMP do AMP. Konwersja IMP w AMP trwa do wyczerpania się nagromadzonych zasobów energetycznych w postaci kwasu 1,3-dwufosfoglicerynowego i fosfoenolopirogronowego. Wzrost stężenia GDP, jaki towarzyszy aminacji IMP do AMP prowadzi do zahamowania syntetazy adenylbursztynianowej. Równocześnie spadek stężenia ATP używanego w reakcji katalizowanej przez heksokinazę prowadzi do ponownej aktywacji fosfofruktokinazy — co w dalszej konsekwencji inicjuje powstanie następnej oscylacji.

Przedstawione na rycinach 7 i 8 doświadczenia wskazują wyraźnie na współzależność oscylacji glikolizy i cyklu nukleotydów purynowych. Występowanie tych oscylacji da się objaśnić regulacyjnymi właściwościami fosfofruktokinazy i dezaminazy AMP. Interesująca jest obserwacja, że aktywacja fosfofruktokinazy przez fruktozo-1,6-dwufosforan zależy w ogromnej mierze od stężenia AMP (86, 87). I tak, przy $1 \mu\text{M}$ stężeniu AMP, fruktozo-1,6-dwufosforan w stężeniu $32 \mu\text{M}$ powoduje jedynie zni-

komą aktywację fosfofruktokinazy. Wzrost stężenia AMP do $20\ \mu\text{M}$ i $50\ \mu\text{M}$ pociąga za sobą, przy tym samym stężeniu fruktozo-1,6-dwufosforanu, odpowiednio 20-krotny i 40-krotny wzrost aktywności tego enzymu (87). Nie jest wykluczone, że w mięśniach w warunkach zwiększonego zapotrzebowania na energię, do aktywacji fosfofruktokinazy przyczynia się także wzrost stężenia jonów NH_4^+ , będący wynikiem dezaminacji AMP (86).

Opisany powyżej model regulacji oparty jest na badaniu glikolizy i cyklu nukleotydów purynowych w stosunkowo nieskomplikowanym układzie doświadczalnym, jaki stanowi bezkomórkowy ekstrakt z mięśni szkieletowych szczura pozbawiony endogennych metabolitów. Dotychczas nie wiadomo czy takie oscylacje zachodzą w mięśniach szkieletowych *in vivo* — obserwowano je natomiast w pojedynczej komórce drożdży (88).

Opisany przez Lowensteina cykl nukleotydów purynowych jest jednym z najpóźniej odkrytych cykli metabolicznych o uniwersalnym — jak się wydaje — występowaniu w komórkach. Stanowi on równocześnie piękny przykład wielorakiej współzależności regulacyjnej przemian związków o różnorodnej budowie chemicznej.

Zaakceptowano 8.12.1978

PIŚMIENNICTWO

1. Atkinson D. E., (1968), w *Metabolic Roles of Citrate*, red. Goodwin T. W., str. 23—40; Academic Press, London, New York.
2. Atkinson D. E., (1966), *Ann. Rev. Biochem.* **35**, 85—124.
3. Atkinson D. E., (1977), *Cellular Energy Metabolism and Its Regulation*, str. 85—107; Academic Press, New York, San Francisco, London.
4. Schmidt G., (1928), *Z. Physiol. Chem.* **179**, 243—282.
5. Parnas J. K., (1929), *Biochem. Z.* **206**, 16—38.
6. Parnas J. K., Mozołowski W., Lewiński W., (1927), *Biochem. Z.* **188**, 15—23.
7. Parnas J. K., (1929), *Am. J. Physiol.* **90**, 467—474.
8. Mozołowski W., (1929), *Biochem. Z.* **206**, 150—157.
9. Ostern P., (1934), *Przegląd Fizjologii Ruchu* **6**, 1—51.
10. Kalckar H. M., Rittenberg D., (1947), *J. Biol. Chem.* **170**, 455—459.
11. Newton A. A., Perry S. V., (1960), *Biochem. J.* **74**, 127—136.
12. Newton A. A., Perry S. V., (1957), *Nature* **179**, 49—50.
13. Davey L. C., (1959), *Nature* **183**, 995—996.
14. Yefimochkina E. F., (1960), *Biokhimia* **25**, 607—616.
15. Yefimochkina E. F., Braunstein A. E., (1959), *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 350—352.
16. Davey L. C., (1961), *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 296—304.
17. Lowenstein J. M., Tornheim K., (1971), *Science* **171**, 397—400.
18. Tornheim K., Lowenstein J. M., (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 162—169.
19. Lowenstein J. M., (1972), *Physiol. Rev.* **52**, 382—414.
20. Goodman M. N., Lowenstein J. M., (1977), *J. Biol. Chem.* **252**, 5054—5060.
21. Umiastowski J., (1964), *Post. Biochem.* **10**, 445—461.

22. Purzycka J., (1964), *Post. Biochem.* **10**, 359—367.
23. Stankiewicz A., (1978), *Post. Biochem.* **24**, 243—264.
24. Strecker H. J., (1953), *Arch. Biochem. Biophys.* **46**, 128—140.
25. Tornheim K., Lowenstein J. M., (1973), *J. Biol. Chem.* **248**, 2670—2677.
26. Moss K. M., McGivan J. D., (1975), *Biochem. J.* **150**, 275—283.
27. Moss K. M., (1977), *FEBS Letters* **75**, 141—144.
28. Bogusky R. T., Lowenstein L. M., Lowenstein J. M., (1976), *J. Clin. Investig.* **58**, 326—335.
29. Schultz V., Lowenstein J. M., (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, 485—492.
30. Muirhead K. M., Bishop S. H., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 459—464.
31. Ogawa H., Shiraki H., Matsuda Y., Kakiuchi K., Nakagawa H., (1977), *J. Biochem.* **81**, 859—869.
32. Van Der Weyden M. B., Kelley W. N., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 7282—7289.
33. Fisher H. E., Muirhead K. M., Bishop S. H., (1974), *Fed. Proc.* **33**, 1345.
- 33a. Hershfield M. S., Seegmiller J. E., (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, 7348—7354.
34. Matsuda Y., Ogawa H., Fukutome S., Shiraki H., Nakagawa H., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 766—771.
35. Ogawa H., Shiraki H., Nakagawa H., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**, 524—528.
36. Ogawa H., Shiraki H., Matsuda Y., Nakagawa H., (1978), *Eur. J. Biochem.* **85**, 331—337.
37. Matsuda Y., Shiraki H., Ogawa H., Nakagawa H., (1978), *Biochim. Biophys. Acta* **541**, 135—138.
38. Rudolph F. B., From H. J., (1969), *J. Biol. Chem.* **244**, 3832—3839.
39. Carter C. E., Cohen L. H., (1956), *J. Biol. Chem.* **222**, 17—30.
40. Liebermann I., (1956), *J. Biol. Chem.* **223**, 327—339.
41. Hatch M. D., (1966), *Biochem. J.* **98**, 198—203.
42. Miller R. W., Lukens L. N., Buchanan J. M., (1959), *J. Biol. Chem.* **234**, 1806—1811.
43. Lowy B. A., Dorfman B., (1970), *J. Biol. Chem.* **245**, 3043—3046.
44. Barnes L. B., Bishop S. H., (1975), *Int. J. Biochem.* **6**, 497—503.
45. Atkinson M. R., Morton R. K., Murray A. W., (1964), *Biochem. J.* **92**, 398—404.
46. Brox L. W., (1973), *Can. J. Biochem.* **51**, 1072—1076.
47. Ratner S., (1972), w *The Enzymes*, red. Boyer P. D., 3 wyd., t. 7, str. 167—197; Academic Press, New York.
48. Spector T., (1977), *Biochim. Biophys. Acta* **481**, 741—745.
49. Bridger W. A., Cohen L. H., (1968), *J. Biol. Chem.* **243**, 644—650.
50. Lowenstein J. M., Goodman M. N., (1978), *Fed. Proc.* **37**, 2308—2312.
51. Sahlin K., Palmkog G., Hultman E., (1978), *Pflügers Arch.* **374**, 193—198.
52. Tornheim K., Lowenstein J. M., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 3241—3247.
53. Ronca-Testoni S., Raggi A., Ronca G., (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **198**, 101—112.
54. Chung L., Bridger W. A., (1976), *FEBS Letters* **64**, 338—340.
55. Scopes R. T., (1974), *Biochem. J.* **138**, 119—123.
56. Coffee C. J., Solano C., (1977), *J. Biol. Chem.* **252**, 1606—1612.
57. Chapman A. G., Atkinson D. E., (1973), *J. Biol. Chem.* **248**, 8309—8312.
58. Raivio K. O., Kekomäki M. P., Mäenpää P. H., (1969), *Biochem. Pharmacol.* **18**, 2615—2624.
59. Mäenpää P. H., Raivio K. O., Kekomäki M. P., (1968), *Science* **161**, 1253—1254.

60. Bode J. C., Zelder O., Rumpelt H. J., Wittkamp U., (1973), *Eur. J. Clin. Investig.* **3**, 436—441.
61. Van Der Berghe G., Bronfman M., Vanneste R., Hers H. G., (1977), *Biochem. J.* **162**, 601—609.
62. Van Der Berghe G., Van Pottelsberghe C., Hers H. G., (1977), *Biochem. J.* **162**, 611—616.
63. Yoshino M., Miyajima E., Tsushima K., (1976), *FEBS Letters* **72**, 143—146.
64. Woods H. F., Eggleston L. V., Krebs H. A., (1970), *Biochem. J.* **119**, 501—510.
65. Braunstein A. E., (1957), *Adv. Enzymol.* **19**, 335—389.
66. McGivan J. D., Chappell J. B., (1975), *FEBS Letters* **52**, 1—7.
67. Świerczyński J., Makarewicz W., (1978), *Experientia* **34**, 165—166.
68. Felig P., (1973), *Metabolism* **22**, 179—207.
69. Ruderman N. B., Berger M., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 5500—5506.
70. De Haan E. J., Tager J. M., Slater E. C., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **131**, 1—13.
71. Charles R., Tager J. M., Slater E. C., (1967), *Biochim. Biophys. Acta* **131**, 29—41.
72. Mendes-Mourao J., McGivan J. D., Chappell J. B., (1975), *Biochem. J.* **146**, 457—464.
73. Rognstad R., (1977), *Biochim. Biophys. Acta* **496**, 249—254.
74. Brosnan J. T., (1976), w *The Urea Cycle*, red. Grisolia S., Baguena R., Mayor F., str. 443—458; John Wiley and Sons Inc., New York.
75. Krebs H. A., Vinay P., (1975), *Med. Clin. North Am.* **59**, 595—603.
76. Krebs H. A., Hems R., Lund P., (1973), w *Adv. Enz. Regul.*, red. Weber G., t. 11, str. 361—377; Pergamon Press, Oxford, New York.
77. Williamson D. H., Lund P., Krebs H. A., (1967), *Biochem. J.* **103**, 514—527.
78. Hems D. A., Brosnan J. T., (1971), *Biochem. J.* **123**, 391—397.
79. Brosnan J. T., Krebs H. A., Williamson D. H., (1970), *Biochem. J.* **117**, 91—96.
80. Lund P., Brosnan J. T., Eggleston L. V., (1970), w *Essays in Cell Metabolism*, red. Bartley W., Kornberg H. L., Quayle R. T., str. 167—188; Wiley Interscience, London.
81. Frieden C., (1976), w *The Urea Cycle*, red. Grisolia S., Baguena R., Mayor F., str. 59—72; John Wiley and Sons Inc., New York.
82. Brosnan J. T., Williamson D. H., (1974), *Biochem. J.* **138**, 453—462.
83. Nordmann R., Petit M. A., Nordmann J., (1972), w *Ammonia Metabolism*, red. Szam I., str. 69—75; F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York.
84. Ghosh A., Chance B., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16**, 174—181.
85. Frenkel R., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 151—156.
86. Tornheim K., Lowenstein J. M., (1975), *J. Biol. Chem.* **250**, 6304—6314.
87. Tornheim K., Lowenstein J. M., (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, 7322—7328.
88. Chance B., Pye K., Higgens J., (1967), *IEEE Spectrum* **4**, Suppl. 8, 79—86; cytowane za: Tornheim K., Lowenstein J. M., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 3241—3247.
89. Clark S. M., Berry S. A., Ewing R., Rudolph F. B., (1977), *Comp. Biochem. Physiol.* **58 B**, 63—65.
90. Żydowo M., Purzycka J., Zelewski L., (1962), *Acta Biochim. Polon.* **9**, 117—123.

4. Applications should be made in triplicate, comprising:
 - A) Topic of research and description of the experiments the applicant intends to carry out in the receiving laboratory and the reasons why these experiments should be performed in the receiving laboratory (maximum 2 pages).
 - B) A short curriculum vitae of the applicant with a list of publications.
 - C) A letter of acceptance from the legal head of the receiving Institute and also signed by the leader of the group which will receive the applicant (should be written on a special form of acceptance furnished by the FEBS Fellowships Officer).
 - D) A letter supporting the application from a experienced scientist who knows the work of the applicant to be send directly to the FEBS Fellowships Officer.
 - E) A letter from the FEBS Constituent Society confirming that the applicant is a member.
 - F) An estimate of the cost of travel (2nd Class Rail or Tourist Air) to and from the Receiving Institute.
 - G) The application should be written in English.
5. Applications for fellowships are assessed throughout the year. There is no deadline for an application but as a rule it should be made about two months before the proposed starting date. Retrospective applications cannot be considered.
6. The fellowship should start within six months of the decision to grant it.
7. The applicant must send a short report about the work performed; this report should be countersigned by the director of the receiving laboratory.
8. Every publication of work executed while in receipt of a FEBS fellowship must acknowledge the help given by FEBS and 3 reprints must be deposited with the Fellowships Officer.
9. Applications for fellowships to work in a laboratory in the same country in which the applicant is at present working or normally works are not considered.
10. The fellowships will not be awarded for attendance at courses, symposia, meetings or congresses.
11. Applications should be sent to Professor G. Dirheimer, FEBS Fellowships Officer, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg-Cedex, France.

ANNA PRZYKORSKA *)

Specyficzność roślinnych enzymów degradujących DNA

Specificity of Plant Enzymes Degrading DNA

Spis treści

Wstęp

I. Ogólna charakterystyka nukleaz typu I

I-1. Substraty

I-2. Specyficzność wobec zasad

I-3. Sposób działania

I-4. Optima pH, stężenie i rodzaj wymaganych jonów, aktywatory i inhibitory

I-5. Właściwości fizyczne cząsteczki enzymu

II. Jednoniciowe fragmenty w natywnym DNA

III. Specyficzność nukleaz typu I wobec fragmentów jednoniciowych w dwuniciowym DNA

III-1. Specyficzność wobec regionów bogatych w AT

III-2. Działanie na natywne, koliste DNA o strukturze superhelikalnej

III-3. Działanie na dwuniciowy, liniowy DNA

Contents

Introduction

I. General characteristics of the type I nucleases

I-1. Substrates

I-2. Base specificity

I-3. Mode of action

I-4. pH optima, ions required, activators and inhibitors

I-5. Physical properties of enzyme molecule

II. Single-stranded fragments in native DNA

III. Specificity of the type I nucleases to single-stranded fragments in double-stranded DNA

III-1. Specificity to AT rich regions

III-2. Effect on native, circular DNA with supercoiled structure

III-3. Mode of action on double-stranded linear DNA

Enzymy nukleolityczne stosuje się w rozwiązywaniu wielu problemów współczesnej biologii molekularnej. Do takich badań używa się między innymi nukleazy o dużym stopniu specyficzności wobec określonych

*) Mgr, Instytut Biochemii i Biofizyki, PAN, Zakład Biochemii Porównawczej, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

sekwencji czy struktury kwasów nukleinowych. Oprócz enzymów restrykcyjnych przydatne są również nukleazy specyficzne wobec odcinków jednoniciowych, które wykazują jednocześnie ograniczoną aktywność w stosunku do natywnego DNA. W tej ostatniej grupie enzymów do tej pory najlepiej scharakteryzowane zostały nukleaza S₁ z *Aspergillus oryzae* (1, 2, 3, 4, 5), nukleaza z *Neurospora crassa* (6, 7), nukleaza I z fasoli złocistej (8, 9), nukleaza I z kielków pszenicy (10, 11, 12) i nukleaza ze *Staphylococcus aureus* (13). Pomimo, że enzymy te wykazują wyraźną preferencję wobec jednoniciowego DNA, ostatnio zainteresowano się również ich działaniem na natywne, dwuniciowe DNA. Okazało się bowiem, że natywne, dwuniciowe DNA może być również substratem nukleaz specyficznych wobec odcinków jednoniciowych. Atakują one w natywnym DNA odcinki o całkowicie lub częściowo rozluźnionej strukturze drugorzędowej. Obszarami DNA o osłabionych oddziaływaniach pomiędzy dwoma łańcuchami są na przykład obszary bogate w pary AT (8, 12, 14) lub obszary o strukturze superhelikalnej powodującej rozluźnienie struktury drugorzędowej DNA (15). Wynikiem działania na natywne superhelikalne DNA nukleaz specyficznych wobec jednoniciowych kwasów nukleinowych jest nacięcie w pojedynczej nici w jednym (7) lub kilku miejscach (5), co prowadzi do relaksacji superhelikalnie skręconego DNA. Nasuwa to przypuszczenie, że enzymy te mogą brać udział w takich procesach wewnątrzkomórkowych, w których potrzebne są nacięcia i relaksacja DNA, a więc na przykład w replikacji, transkrypcji, rekombinacji i reperacji DNA. Należy przy tym podkreślić, że w natywnym DNA podlegającym replikacji, transkrypcji, rekombinacji lub reperacji obecne są zawsze odcinki jednoniciowe, które mogą być hydrolizowane przez właściwe nukleazy wybiórczo hydrolizujące fragmenty jednoniciowe.

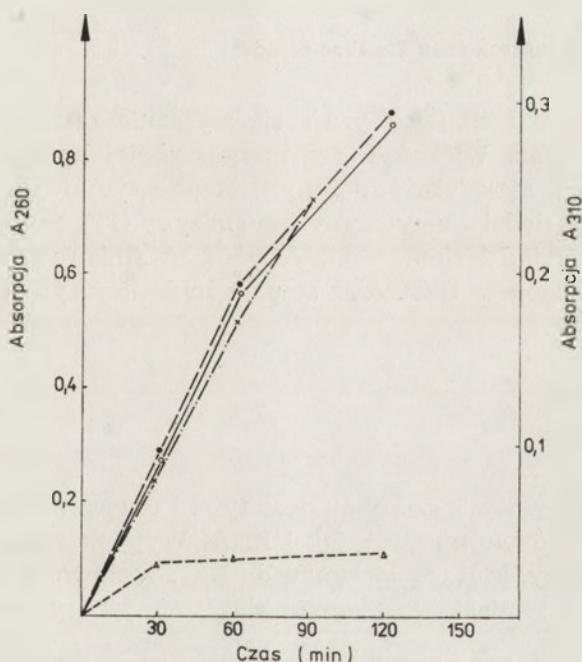
Spośród enzymów specyficznych wobec fragmentów jednoniciowych stosunkowo niedawno zostały opisane i dość dobrze scharakteryzowane enzymy roślin wyższych, zaliczane według klasyfikacji Wilsona (16) do grupy tzw. nukleaz typu I. W artykule opisano te spośród nukleaz typu I, które wykazują dużą preferencję wobec fragmentów jednoniciowych, a jednocześnie mają ograniczoną aktywność w stosunku do natywnego DNA. Jak do tej pory najlepiej poznano właściwości trzech takich enzymów: nukleazy I z fasoli złocistej (8, 9), z kielków pszenicy (10, 11, 12) i z nukleoplazmy jąder zarodków żyta (17).

I. Ogólna charakterystyka roślinnych nukleaz typu I

I-1. Substraty

Enzymy zaliczane do grupy nukleaz typu I charakteryzujące się brakiem specyficzności wobec cukrowej reszty substratu w równym stopniu hydrolizują RNA, jak i zdenaturowany termicznie DNA (Ryc. 1). Nukleazy

typu I wykazują również aktywność 3'-nukleotyduazy hydrolizując wiązanie fosfoestrowe 3'-monofosforanów. Wszystkie trzy aktywności: rybonukleazowa, dezoksyrybonukleazowa i aktywność 3'-nukleotyduazy mają tę samą specyficzność wobec zasad i są w takim samym stopniu podatne na czynniki hamujące i aktywujące. Na przykład aktywności nukleazy I z kielków pszenicy (10) mają zbliżone optima pH, są zależne od jonów Zn^{2+} , temperatury, EDTA i związków sulfhydrylowych. Wszystkie trzy aktywności enzymatyczne pozostają nierozdzielone podczas różnorodnych procedur oczyszczania jak chromatografia na wymienniczych jonowych, filtracja na żelach Sephadex i elektroforeza w żelu poliakrylamidowym. Pozwala to przyjąć, że wszystkie trzy aktywności są związane z tą samą częścią białka.



Ryc. 1. Przebieg hydrolizy RNA —●—, zdenaturowanego termicznie DNA —○—, natywnego DNA ——△— i 3'-adenozynomonofosforanu —×— przez nukleazę I z jąder zarodków żyta (zmodyfikowane wg 17).

Szybkość enzymatycznej hydrolizy DNA zależy głównie od jego struktury drugorzędowej. Większość enzymów zaliczanych do grupy nukleaz typu I dużo szybciej hydrolizuje zdenaturowany, jednoniciowy DNA niż natywny DNA (Ryc. 1). I tak na przykład nukleaza I z fasoli złocistej hydrolizuje zdenaturowany termicznie DNA faga T4 około 30 000 razy szybciej niż DNA natywny (8). W przypadku DNA z grasicy cielęcej i *Escherichia coli* obserwowano mniejsze różnice w szybkości hydrolizy form jedno- i dwuniciowych. Spowodowane jest to prawdopodobnie tym,

że w porównaniu z DNA faga T4, preparaty natywnego DNA z grasicy i *Escherichia coli* są w większym stopniu zanieczyszczone formami jednoniciowymi. Specyficzność nukleazy I z fasoli złocistej wobec fragmentów jednoniciowych jest tak wysoka, że w mieszaninie natywnego i zdenaturowanego DNA enzym może wybiórczo hydrolizować pojedyncze łańcuchy zdenaturowanego DNA. Co więcej, nawet przy 50-ciokrotnym nadmiarze nukleazy nie udało się stwierdzić hydrolizy natywnych form DNA (8). Tak wysoką preferencję nukleaz wobec struktur jednoniciowych obserwuje się rzadko. Poza nukleazami typu I jedynie egzonukleaza z *Escherichia coli* wykazuje podobne właściwości. Hydrolizuje ona około 40 000 razy szybciej zdenaturowany DNA niż DNA natywny (18, 19).

I-2. Specyficzność nukleaz typu I wobec zasad

Nukleazy typu I charakteryzują się wyraźnie zaznaczoną specyficznością wobec zasad. Większość z nich najszybciej hydrolizuje wiązanie 3'-fosfoestrowe w sąsiedztwie adeniny, następnie tyminy (urydyny), znacznie wolniej w sąsiedztwie cytozyny i guanozyny (11). Stwierdzono to badając ilościowy skład fosfomononukleotydów uwalnianych w czasie degradacji zdenaturowanego DNA oraz stopień hydrolizy rybohomopolimerów i 3'-nukleotydów.

I-3. Sposób działania

Większość enzymów z grupy nukleaz typu I to endonukleazy działające w ten sposób zarówno na DNA jak i RNA. Wyjątek stanowi nukleaza I z kielków pszenicy, która w stosunku do RNA zachowuje się jak typowa egzonukleaza, natomiast w stosunku do DNA jak typowa endonukleaza (11).

Końcowymi produktami uwalnianymi przez nukleazy typu I są 5'-fosfomono- i oligonukleotydy z wolną grupą OH w pozycji 3'.

I-4. Optima pH, stężenie i rodzaj wymaganych jonów, aktywatory i inhibitory

Nukleazy typu I wykazują maksymalną aktywność w środowisku kwaśnym w zakresie wartości pH od 5,0 do 6,5. Aktywność większości tych enzymów jest hamowana przez EDTA. Wszystkie enzymy wymagają dwuwartościowych kationów do utrzymania maksymalnej aktywności i stabilności. Enzymy z fasoli złocistej (20) i z kielków pszenicy (21) wymagają obecności jonów Zn^{2+} . W przypadku enzymu z pszenicy obecność

jonów Zn^{2+} w stężeniu co najmniej $10^{-4} M$ jest absolutnie konieczna do utrzymania aktywności w pH 4,5. Jony Zn^{2+} mają prawdopodobnie znaczenie tylko w stabilizacji trzecio- lub czwartorzędowej struktury białka enzymatycznego. Taką stabilizującą rolę jonów Zn^{2+} udowodniono badając wiele innych enzymów, takich jak alkaliczna fosfataza z *Escherichia coli* (22, 23), dehydrogenaza alkoholowa z wątroby konia (24) i α -amylaza z *Bacillus subtilis* (25). Jony Zn^{2+} hamują aktywność RNA-azową (ale nie DNA-azową) nukleazy z owsa (26). Jony Mg^{2+} przywracają nukleazie z ziemniaków aktywność utraconą pod wpływem EDTA (27). W przypadku nukleazy z pszenicy jony Mg^{2+} i Ca^{2+} stymulują jedynie aktywność RNA-azową. Być może dwuwartościowe kationy wpływają na konfigurację substratu i dlatego odmiennie działają na każdy z trzech typów aktywności omawianych nukleaz (16).

Dla utrzymania stabilności nukleaz I w pH 4,5 w większości przypadków konieczna jest obecność związków sulfhydrylowych takich jak merkaptoetanol, cysteina i ditiotreitrol (10). Te same związki w pH 8,0 działają inaktywująco.

I-5. Właściwości fizyczne cząsteczki enzymu

Ciężar cząsteczkowy nukleaz typu I waha się w granicach 30 000—45 000 D. Ciężar cząsteczkowy nukleazy z fasoli złocistej, która została dobrze oczyszczona (28, 29) i scharakteryzowana pod względem fizycznym wynosi 39 000 (29). Cząsteczka tego enzymu zawiera jedną grupę sulfhydrylową i trzy mostki dwusiarczkowe. Zawartość aminokwasów aromatycznych jest dość wysoka i wynosi 12,6 mol%. Około 70% cząsteczek enzymu złożone jest z dwóch łańcuchów polipeptydowych o ciężarach 25 000 i 15 000 daltonów połączonych mostkami dwusiarczkowymi. Około 30% cząsteczek ma pojedynczy łańcuch polipeptydowy, który odpowiada sumie dwóch krótszych łańcuchów. Jednocześnie około 30% cząsteczek białkowych enzymu związane jest z węglowodanami. Rola tych węglowodanów polega być może na zabezpieczeniu łańcucha polipeptydowego przed działaniem proteaz rozcinających go na dwa mniejsze fragmenty. Niezależnie jednak od tego czy łańcuch polipeptydowy jest przecięty czy nie zachowuje on pełną aktywność nukleazową w stosunku do DNA, RNA i 3'-adenozynomonosfosforanu (28).

Rola metaboliczna nukleaz typu I jest mało znana, jednak — jak już wspomniano wyżej — należy się spodziewać, że enzymy te mogą być zaangażowane w te procesy wewnątrzkomórkowe, w których wykorzystywana jest obecność jednoniciowych fragmentów w natywnym DNA. Następna część artykułu poświęcono krótkiemu omówieniu tych procesów.

II. Jednoniciowe fragmenty w natywnym DNA

Badania ostatnich lat dostarczają coraz więcej dowodów na obecność jednoniciowych fragmentów w dwuniciowym DNA. Wykazano między innymi, że replikacyjne formy chromosomów kołowych, w których DNA skręcone jest w superheliks, zawierają fragmenty jednoniciowe (30, 31).

Obserwując powinowactwo superhelikalnego DNA faga PM2 i wirusa SV40 do polimeraz RNA zależnych od DNA, również stwierdzono obecność jednoniciowych fragmentów. Wiadomym jest, że polimerazy te wymagają jako matrycy DNA z fragmentami jednoniciowymi (32, 33).

Przeprowadzając hydrolizę DNA za pomocą wysoce specyficznej dla jednoniciowego DNA egzonukleazy z *Escherichia coli* Okazaki i wsp. (34) oraz Oishi (35) wykazali, że nowosyntetyzowany DNA bakteryjny zawiera jednoniciowe fragmenty, które stanowią około 0,05—0,1% całego DNA.

Szereg danych wskazuje również na obecność jednoniciowych fragmentów w replikującym się DNA fagów i wirusów zwierzęcych. Fragmenty takie występują najczęściej po jednej lub po obu stronach pętli replikacyjnej (36, 37, 38) lub widełek replikacyjnych (38). Jednoniciowe fragmenty DNA w postaci „wąsów” w pozycji trans przy przeciwległych widełkach replikacyjnych znaleziono też w DNA faga T4 (39).

Również w replikującym się DNA komórek zwierzęcych wykazano obecność jednoniciowych fragmentów. Fragmenty te widać na zdjęciach DNA wyodrębnionego z dzielących się jąder *Drosophila*, wykonanych w mikroskopie elektronowym (40). Niektóre sfotografowane cząsteczki DNA posiadają pętle, uważane przez autorów za pętle replikacyjne, w których występują fragmenty jednoniciowe. Oprócz tych pętli pojedyncze nici DNA widoczne są również jako fragmenty „sterczące” w miejscach rozgałęzień replikujących się cząsteczek.

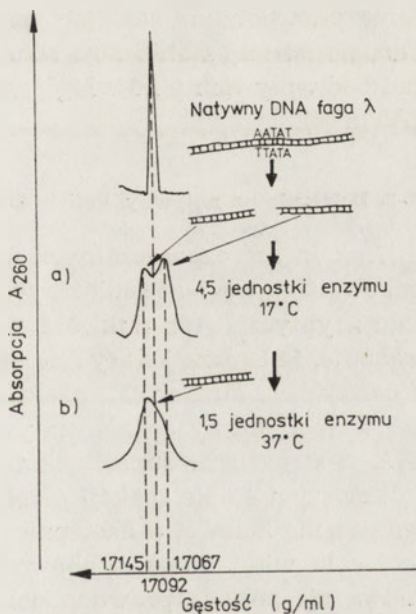
Do prawidłowego przebiegu rekombinacji również konieczne jest okresowe wytworzenie fragmentów jednoniciowych. Obecność takich fragmentów stwierdzono między innymi w bakteryjnych kompleksach rekombinacyjnych DNA dawcy i biorcy (41) oraz w DNA bakterii zdolnych do ulegania transformacji obcym DNA i do rekombinacji z nim (42, 43, 44). Jednoniciowe fragmenty występują również na obu końcach dwuniciowych cząsteczek DNA dojrzałych fagów jako tak zwane „lepkie końce”. Odcinki takie zostały najlepiej poznane w DNA faga λ (45). Występują one również w innych fagach z tej grupy oraz fagach 299, P2, 186.

III. Specyficzność nukleaz typu I wobec jednoniciowych fragmentów w dwuniciowym DNA

III-1. Specyficzność wobec regionów bogatych w AT

W temperaturach niższych od temperatury topnienia DNA obszary bogate w AT są w większym stopniu podatne na częściową denaturację

niż obszary bogate w GC (tzw. strukturalne oddychanie) (13, 14). W efekcie rejony bogate w AT w natywnym dwuniciowym DNA mają rozluźnioną strukturę drugorzędową. Stopień tego rozluźnienia zależy od długości obszaru bogatego w AT, temperatury i siły jonowej. Dobierając odpowiednio warunki można więc w takim obszarze zwiększać lub zmniejszać stopień rozluźnienia struktury drugorzędowej. Wysoka preferencja nukleazy typu I do jednoniciowych fragmentów nasuwa przypuszczenie, że enzymy te mogą w natywnym DNA wybiórczo hydrolizować obszary bogate w AT. Celem sprawdzenia tej hipotezy poddano DNA faga λ działaniu nukleazy I z kielków pszenicy (12) i z fasoli złocistej (8). DNA faga λ ma w pobliżu środka cząsteczki obszar bogaty w AT. Ponieważ „ramiona” cząsteczki DNA po obu stronach tego obszaru różnią się procentowym udziałem AT i GC, można je rozdzielić i zidentyfikować metodą wirowania w gradiencie gęstości chlorku cezu (8). Podczas inkubacji takiego DNA z nukleazą z fasoli złocistej w temperaturze 17°C Johnson i wsp. (8) obserwowali wybiórczą hydrolizę obszaru bogatego w parę zasad AT i pojawienie się dwóch fragmentów DNA faga λ (Ryc. 2a). Analizując skład zasad tych



Ryc. 2. Wirowanie w gradiencie gęstości chlorku cezu produktów degradacji DNA faga λ przez nukleazę I z fasoli złocistej (zmodyfikowane wg 8).

fragmentów autorzy stwierdzili, że odpowiadają one prawej i lewej połowie cząsteczki DNA faga λ . Gdy analogiczną reakcję przeprowadzono w temperaturze 37°C obserwowano również powstawanie dwóch połówek DNA faga λ , jednak reakcja przebiegała dalej i enzym preferencyjnie hydrolizował tę połowę, która była bogatsza w AT (Ryc. 2b). Dalszym dowodem potwierdzającym hipotezę o specyficzności nukleazy typu I w stosunku do obszarów bogatych w AT jest fakt, że enzymy te hydro-

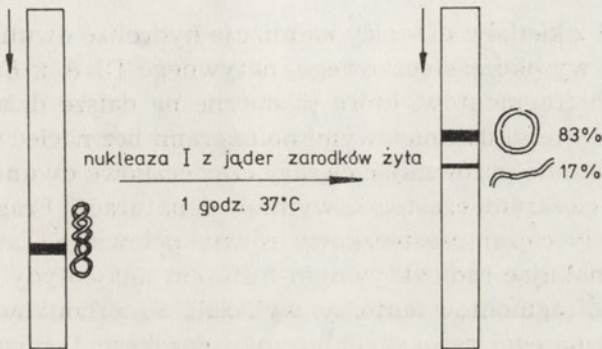
lizują zarówno natywne jak i termicznie zdenaturowane polimery d(AT). Johnson i wsp. (8) wykazali, że nukleaza z fasoli zlocistej tylko dwukrotnie wolniej hydrolizuje natywny aniżeli zdenaturowany termicznie, biosyntetyczny polimer d(AT)_n niezawierający par GC. Gdy substratem jest d(AT)_n z kraba, gdzie około 30% stanowią pary GC preferencja wobec zdenaturowanej termicznie formy wynosi 65 razy, a w przypadku DNA faga T₄, gdzie par GC jest jeszcze więcej (około 34%) enzym aż 30 000 razy szybciej hydrolizuje formę jednoniciową. W tych warunkach nie stwierdzono hydrolizy poli dG·poli dC nawet przy 10-krotnym nadmiarze enzymu. Szybka hydroliza natywnego poli d(AT) jest prawdopodobnie również odzwierciedleniem specyficzności nukleazy wobec struktur jednoniciowych, gdyż stopień hydrolizy poli d(AT) wzrasta gwałtownie w warunkach sprzyjających częściowej denaturacji, a więc w niskiej sile jonowej i w niskim pH. W przypadku biosyntetycznego d(AT)_n wysoka wartość współczynnika temperaturowego reakcji (Q₁₀) w zakresie temperatur 27—37°C również wskazuje, że enzym rozpoznaje rozluźnienie drugorzędowej struktury polimeru występujące bezpośrednio przed jego stopnieniem (T_m = 46°C) (8). Zmiany w konformacji poprzedzające topnienie udowodniono stosując pomiary wiskozymetryczne (46).

Z drugiej strony stabilizacja struktury drugorzędowej polimeru, na przykład pod wpływem jonów Mg²⁺, wpływa na obniżenie szybkości hydrolizy d(AT)_n (8).

III-2. Działanie na natywny, kolisty DNA o strukturze superhelikalnej

Brak kwasorozpuszczalnych nukleotydów wśród produktów hydrolizy znakowanego węglem radioaktywnym DNA plazmidu Col E1 i DNA plazmidu kryptycznego z nukleazą z nukleoplazmy jąder zarodków żyta (17) wskazuje, że badane kwasy nukleinowe nie są hydrolizowane przez enzym. W dalszych badaniach (17) okazało się jednak, że nukleaza ta może atakować w specyficzny sposób natywny, kolisty DNA. Na przykład kolisty DNA o strukturze superhelikalnej plazmidu Col E1 lub faga PM2 w pierwszym etapie reakcji przekształcany jest przez enzym w zrelaksowaną formę kołową, a następnie w formę liniową o długości odpowiadającej całkowitej długości chromosomu (Ryc. 3). Powstająca cząsteczka liniowa nie posiada prawdopodobnie lepkich końców, lub są one bardzo krótkie, gdyż denaturują bez uprzedniego ogrzewania. Pierwszy etap reakcji jest stosunkowo szybki. Po godzinnej inkubacji DNA plazmidu Col E1 z enzymem wśród produktów reakcji brak jest już formy superspiralnej, a 83% DNA występuje w postaci zrelaksowanej formy kołowej. Formy liniowej jest tylko około 17%. Przedłużenie czasu inkubacji nie powoduje pojawiania się dalszych produktów degradacji. Obserwuje się jedynie powstawanie formy liniowej kosztem formy kolistej. Ten etap reakcji przebiega jednak powoli tak, że po 6,5 godzinach inkubacji forma

kolista stanowi około 69% produktów, a forma liniowa około 31%. Powstawanie cząsteczki liniowej z formy kolistej oraz brak wyraźnych lepkich końców świadczą, że po nacięciu jednej nici, nukleaza z nukleoplazmy jąder zarodków żyta atakuje w komplementarnym łańcuchu miejsce leżące naprzeciw lub w pobliżu tego nacięcia (17). Długość cząsteczki liniowej odpowiadająca pełnej długości formy kolistej świadczy, że w pierwszym etapie reakcji superhelikalna cząsteczka DNA nacięta była tylko w jednym miejscu. Podobne wyniki otrzymali już wcześniej inni autorzy badając specyficzną wobec struktur jednoniciowych nukleazę z *Neurospora crassa* (15, 47) i endonukleazę S_1 (48, 49). Nie wiadomo jednak, czy



Ryc. 3. Elektroforetyczny obraz produktów degradacji superhelikalnego, kolistego [^{14}C] DNA plazmidu Col E1 przez nukleazę I z jąder zarodków żyta (zmodyfikowane wg 17).

obszar w superhelikalnym DNA podatny na działanie nukleazy I z jąder zarodków żyta znajduje się w ściśle określonym miejscu cząsteczki. Bartok i wsp. (47) wykazali na przykład, że w przypadku endonukleazy z *Neurospora crassa* rozmieszczenie nacięć w populacji kolistych DNA fagów $\Phi\text{X}174$ i PM2 jest przypadkowe. Gdy jednak substratem enzymu były replikacyjne formy wirusów zwierzęcych na przykład polyoma, odnajdowano tylko dwa lub trzy rejony podatne na atak enzymu (48). Z drugiej zaś strony Lovett i wsp. (50) udowodnili, że pojedyncze nacięcia superhelikalnego DNA plazmidu Col E1 przez restryktazę Eco RI występuje zawsze w tym samym miejscu odległym od miejsca startu replikacji DNA o $18,3 \pm 0,9\%$. W przypadku nukleaz roślinnych pozostaje w dalszym ciągu do wyjaśnienia czy rejon rozpoznawany przez te enzymy znajduje się w przypadkowym, czy określonym miejscu cząsteczki DNA.

Działanie nukleaz typu I na superhelikalny DNA jest prawdopodobnie również przejawem specyficzności tych enzymów wobec fragmentów jednoniciowych. Jak już wspomniano, w superhelikalnej, kołowej formie DNA znajduje się pewien procent niesparowanych zasad. Beerman i Lebowitz (31) przypuszczają, że osłabienie oddziaływań pomiędzy dwiema niemi jest wynikiem superhelikalnych skrętów podwójnej spirali,

ponieważ nie znaleziono niesparowanych zasad w kołowym DNA, który został pozbawiony trzeciorzędowej struktury superheliksu.

Wang (15) wykazał, że podatność kolistego DNA na przecinanie przez enzymy specyficzne wobec jednoniciowych fragmentów wzrasta wraz ze wzrostem liczby zwojów superheliksu. W pewnym zakresie zależność ta jest prostoliniowa tak, że na podstawie podatności DNA na przecinanie przez nukleazę można określić stopień jego skręcenia w strukturę trzeciorzędową. Na przykład nukleaza z fasoli złocistej około 75 razy szybciej nacina ściśle skręcony w superheliks DNA faga PM2 o gęstości superhelikalnej równej 0,06, niż ten sam DNA ale nie posiadający struktury trzeciorzędowej.

Nukleaza I z kielków pszenicy katalizuje hydrolizę dwuniciowego DNA wirusowego i wysokocząsteczkowego, natywnego DNA z *Escherichia coli* do mniejszych fragmentów, które są odporne na dalsze działanie enzymu (12). Fragmenty te są dwuniciowymi polimerami bez nacięć w pojedynczej nici, co stwierdzono porównując ciężary cząsteczkowe dwuniciowych fragmentów z ich ciężarami cząsteczkowymi po denaturacji. Fragmenty zdenaturowane miały ciężar cząsteczkowy równy połowie ciężaru natywnych polimerów. Znakując radioaktywnym fosforem nukleotydy na 5'-końcach powstających fragmentów autorzy wykazali, że produkowane polimery zakończone są na ogół dezoksyguanozyną i dezoksycytozyną. Wyznaczono również ciężar cząsteczkowy powstających fragmentów, stwierdzając, że są one jednakowej wielkości. Obserwacja ta pozwala na wniosek, że podatne na działanie enzymu miejsca w natywnym DNA rozmieszczone są w równych odstępach. Kroecker i wsp. (12) sugerują, że tak wysoki stopień specyficzności nukleaz typu I wobec określonych struktur w cząsteczce DNA przypomina analogiczne właściwości enzymów restrykcyjnych.

III-3. Działanie na dwuniciowy, liniowy DNA

Dwuniciowe, liniowe cząsteczki są bardzo złym substratem nukleaz specyficznych wobec fragmentów jednoniciowych. W trakcie inkubacji z enzymem dwuniciowego, liniowego DNA obserwuje się jednak zwykle powstawanie pewnej ilości kwaso-rozpuszczalnych nukleotydów. Badając wielkość produktów degradacji natywnego DNA z grasicy cielęcej przez nukleazę z fasoli złocistej Kroecker i wsp. (9) stwierdzili, że mono- i oligonukleotydy pojawiają się od razu bez uprzedniego powstawania produktów o pośredniej długości. Świadczy to o degradacji liniowego DNA „od końców”. Autorzy wykazali, że produkty działania nukleaz typu I na liniowe, dwuniciowe DNA są również wynikiem endonukleolitycznego przecinania przez enzymy specyficzne wobec jednoniciowych fragmentów niesparowanych lub częściowo zdenaturowanych końców w natywnym

DNA. W warunkach stabilizujących strukturę drugorzędową DNA nukleaza z fasoli złocistej katalizuje hydrolizę natywnego DNA faga T7 do kilkudziesięciu liniowych fragmentów, które w tych warunkach są odporne na dalsze działanie enzymu. Zmiana warunków reakcji na sprzyjające rozluźnieniu podwójnego heliksu powoduje całkowitą degradację dwuniciowych fragmentów do jedno-, dwu- i trójnukleotydów. Ghangas i wsp. (51) wykazali również, że nukleaza z fasoli złocistej hydrolizuje „lepkie końce” faga λ , które są właśnie jednoniciowymi fragmentami na końcach dwuniciowej cząsteczki DNA.

Uwagi końcowe

Zebrane i omówione w niniejszym artykule dane wskazują, że właściwości enzymów z roślin wyższych rozkładających DNA odbiegają od właściwości analogicznych enzymów drobnoustrojów i zwierząt. Z materiału roślinnego udało się wyizolować, jak do tej pory, jedynie jeden typ enzymów degradujących DNA. Enzymy te charakteryzują się brakiem specyficzności wobec cukrowej reszty substratu, a wykazują dość wysoką specyficzność wobec określonych struktur przestrzennych DNA. Dokładne poznanie mechanizmu regulacji aktywności oraz sposobu działania nukleaz typu I na DNA jest interesujące z uwagi na możliwość badań nad regulacją ekspresji genów w komórkach roślin wyższych. Enzymy te mogą również służyć do badania drugo- i trzeciorzędowej struktury różnych DNA. Niektóre z nukleaz typu I znalazły już zastosowanie w tego rodzaju badaniach (15).

Zaakceptowano 23.12.1978

PIŚMIENNICTWO

1. Ando T., (1966), *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 158—168.
2. Sutton W. D., (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **240**, 522—531.
3. Vogt V. M., (1973), *Eur. J. Biochem.* **33**, 192—200.
4. Rushizky G. W., Shaternikov V. A., Mozejko J. H., Sober H. A., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4221—4226.
5. Godson G. N., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **308**, 59—67.
6. Linn S., Lehman I. R., (1965), *J. Biol. Chem.* **240**, 1287—1293.
7. Kato A. C., Bartok K., Fraser M. J., Denhardt D. T., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **308**, 68—78.
8. Johnson P. H., Laskowski M., Sr., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 891—898.
9. Kroeker W. D., Kowalski D., Laskowski M., Sr., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4463—4467.
10. Hanson D. M., Fairley J. L., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 2440—2449.
11. Kroeker W. D., Hanson D. M., Fairley J. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3767—3772.

12. Kroeker W. D., Fairley J. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3773—3778.
13. Wingert L., von Hippel P. H., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **157**, 114—126.
14. Von Hippel P. H., Felsenfeld G., (1964), *Biochemistry*, **3**, 27—39.
15. Wang J. C., (1974), *J. Mol. Biol.*, **87**, 797—816.
16. Wilson C. M., (1975), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 187—207.
17. Przykorska A., Szarkowski J. W., (w przygotowaniu do druku).
18. Lehman I. R., Nussbaum A. L., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 2628—2636.
19. Lehman I. R., (1963), *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **2**, 83—123.
20. Loring H. S., McLennan J. E., Walters I. L., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 2876—2880.
21. Sodek L., Wright S. T. C., Wilson C. M., (1970), *Plant Cell. Physiol.*, **11**, 167—171.
22. Reynolds J. A., Schlesinger M. J., (1968), *Fed. Proc.*, **27**, 775.
23. Schlesinger M. J., Barrett K., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 4284—4292.
24. Daum D. E., Harrison J. H., Li T. K., Bethune J. L., Vallee B. L., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 1434—1440.
25. Stein E. A., Fisher E. H., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 287—296.
26. Wyen N. V., Erdei S., Farkas G. L., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **232**, 472—483.
27. Bjork W., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **95**, 652—662.
28. Ardelt W., Laskowski M., Sr. (1971), *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **44**, 1205—1211.
29. Kowalski D., Kroeker W. D., Laskowski M., Sr., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4457—4463.
30. Dean W. W., Lebowitz J., (1971), *Nature New Biology*, **231**, 5—8.
31. Beerman T. A., Lebowitz J., (1973), *J. Mol. Biol.*, **79**, 451—470.
32. Mandel J. L., Chambon P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 367—378.
33. Hossenlopp P., Oudet P., Chambon P., (1974), *Eur. J. Biochem.* **41**, 397—411.
34. Okazaki R., Okazaki T., Sakabe K., Sugimoto K., Sugino A., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 598—605.
35. Oishi M., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **60**, 329—336.
36. Schnös M., Inman R. B., (1970), *J. Mol. Biol.*, **51**, 61—73.
37. Inman R. B., Schnös M., (1971); *J. Biol.*, **56**, 319—325.
38. Wolfson J., Dressler D., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **69**, 2682—2686.
39. Delius H., Howe C., Kozinski A., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 3049—3053.
40. Kriegstein H. J., Hogness D. S., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 135—139.
41. Buitenwerf J., (1976), Abstracts of Communications, 3rd European Meeting of Bacterial Transformation and Transfection September 1976, Granada, Spain.
42. Harris W. J., Barr G. C., (1971), *Mol Gen. Genetics*, **113**, 313—330.
43. LeClerc J. E., Setlow J. K., (1975), *J. Bacteriol.*, **122**, 1091—1102.
44. Yasbin R. E., Wilson G. A., Young F. E., (1975), *J. Bacteriol.*, **121**, 296—304.
45. Watson J., (1975), *Biologia Molekularna Genu*, PWN, Warszawa.
46. Inman R. B., Baldwin R. L., (1962), *J. Mol. Biol.*, **5**, 172—184.
47. Bartok K., Denhardt D. T., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 530—535.
48. Germond J. E., Vogt V. M., Hirt B., (1974), *Eur. J. Biochem.* **43**, 591—600.

49. Wiegand R. C., Godson G. N., Radding C. M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8848—8855.
50. Lovett M. A., Guiney D. G., Heliński D. R., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3854—3857.
55. Ghangas G. S., Wu R., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4601—4606.

KOMUNIKATY

Redakcja Kwartalnika Postępy Biochemii przypomina o konieczności uzyskania pisemnej zgody autorów i wydawnictw na przedruk dokumentacji z prac źródłowych (patrz Wskazówki dla Autorów).

KURS FEBS NR 64

W dniach 5—10 listopada 1979 roku w Zakładzie Biologii Nowotworów Instytutu Onkologii, Oddział w Gliwicach odbędzie się kurs p.t. „Modern Methods of DNA Sequencing”. Kurs organizowany jest pod patronatem Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych oraz Komitetu Biochemii i Biofizyki PAN.

Koledzy zainteresowani Kursem proszeni są o skontaktowanie się przed 15 września 1979 roku z: Dr M. Chorąży, Dr S. Szala, Instytut Onkologii, 44-100 Gliwice

JAN KOPCEWICZ*)

Fitochrom jako receptor światła w procesach fotomorfogenezy roślin

Phytochrome as a Photoreceptor in Plant Photomorphogenesis

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Charakterystyka fitochromu**
 - II-1. Właściwości fizyko-chemiczne**
 - II-2. Występowanie i wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie**
 - II-3. Konwersje**
 - II-3-1. Fotokonwersje**
 - II-3-2. Konwersje w ciemności**
 - II-4. Fizjologiczna rola fitochromu**
- III. Mechanizm działania fitochromu**
 - III-1. Fitochrom a właściwości błon**
 - III-2. Fitochrom a enzymy**
 - III-3. Fitochrom a substancje wzrostowe**
- IV. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. Phytochrome characterization**
 - II-1. Physico-chemical properties**
 - II-2. Distribution and subcellular localization**
 - II-3. Conversions**
 - II-3.1. Photoconversions**
 - II-3.2. Dark conversions**
 - II-4. Physiological role of phytochrome**
- III. Mechanism of action of phytochrome**
 - III-1. Phytochrome and properties of membranes**
 - III-2. Phytochrome and enzymes**
 - III-3. Phytochrome and growth substances**
- IV. Concluding remarks**

* Doc. dr hab., Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet M. Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń.

Termin „fotomorfogeneza” określa niezależny od fotosyntezy wpływ światła na wzrost, rozwój i różnicowanie się roślin (1). Badania nad fotomorfogenezą zapoczątkowane zostały około 50 lat temu opisaniem przez Garnera i Allarda (2, 3) zjawiska fotoperiodyzmu, to jest odpowiedzi rośliny na stosunek okresów światła i ciemności w cyklu dobowym. Jednym z najważniejszych osiągnięć w badaniach fotomorfogenezy roślin było odkrycie fotoodwracalnej regulacji wzrostu i rozwoju roślin przez światło czerwone i zakres dalekiej czerwieni oraz wyodrębnienie receptora światła w fitochromie.

Historia odkrycia fitochromu związana jest z nazwiskami Borthwicka, Hendricksa, Siegelmana, Parkera i Butlera z Instytutu Rolnictwa w Beltsville (Maryland, U.S.A.), którzy w latach 1948—1959 przeprowadzili wiele fizjologicznych i biofizycznych doświadczeń nad wpływem światła na wzrost i rozwój roślin (4). Istotnym postępowaniem w tych badaniach było odkrycie, że efekty morfogenetyczne powodowane przez światło czerwone są hamowane przez daleką czerwień. Fotoodwracalność stwierdzono w wielu procesach fizjologicznych, między innymi: kiełkowaniu nasion (5), detiolacji siewek (6, 7), kontroli zakwitania roślin dnia krótkiego i długiego (8—10), rozwoju chloroplastów (11, 12) i biosyntezie flawonoidów (13, 14). Badanie zależności między długością fali światła monochromatycznego a intensywnością tych procesów (widma czynnościowe) wykazały, że najaktywniej działa światło czerwone, słabiej niebieskie, zaś naświetlenie daleką czerwiecią odwraca efekty światła czerwonego.

Jako układ modelowy do badań nad fitochromem użyto kiełkowania nasion sałaty (5, 15—17). Widmo czynnościowe tego procesu wskazuje, że nasiona sałaty nabywają zdolność do kiełkowania pod wpływem światła czerwonego (maksimum stymulacji w pobliżu 660 nm) i tracą tę zdolność pod wpływem promieniowania z zakresu dalekiej czerwieni (maksimum hamowania przy około 730 nm). Wykazano również, że przy wielokrotnym stosowaniu przemiennie światła czerwonego i dalekiej czerwieni efekt fizjologiczny zależy od rodzaju światła ostatnio stosowanego (5). Stwierdzono ponadto, że zarówno widma czynnościowe jak i ilości energii niezbędnej do wywołania efektu fizjologicznego są podobne dla kiełkowania nasion, regulacji kwitnienia oraz innych procesów fotomorfogenetycznych (9, 15).

Założono więc, że receptor światła fitochrom istnieje w dwóch fotoodwracalnych formach: o maksimum absorpcji w zakresie 660 nm (w języku angielskim: *Phytochrome Red* — P_R), oraz o maksimum absorpcji w zakresie 730 nm (*Phytochrome Far-Red* — P_{FR}). Absorpcja określonych fal świetlnych przez jedną z form fitochromu powoduje jej konwersję w formę drugą:



Fizjologicznie aktywną formą fitochromu jest fitochrom P_{FR} .

Założenie okazało się prawdziwe i obecność fitochromu w tkankach roślinnych zademonstrowano po raz pierwszy w 1959 roku (18), badając etiolowane siewki kukurydzy za pomocą specjalnie skonstruowanego spektrofotometru różnicowego, przystosowanego do mierzenia małych zmian gęstości optycznej bezpośrednio w tkance roślinnej. W latach następnych tę metodę oznaczania fitochromu udoskonalono stosując dwuwiązkowy fotometr różnicowy (19); mierzący różnicę absorpcji etiolowanej tkanki roślinnej między 660 a 730 nm ($\Delta A = A_{660} - A_{730}$). Ogólną zawartość fitochromu (P_{tot}) oblicza się z różnicy wielkości ΔA po naświetleniu tkanki światłem czerwonym (ΔA_{660}) i daleką czerwienią (ΔA_{730}). Zależność tę można wyrazić jako różnicę $\Delta A_{730} - \Delta A_{660}$. Zawartość fitochromu w formie P_R i P_{FR} można również oznaczyć oddzielnie przez pomiar ΔA pomiędzy 660 a 800, ewentualnie 730 a 800 nm. Największą trudność w spektrofotometrycznym oznaczaniu fitochromu w tkance roślinnej stanowi obecność chlorofilu, który posiada podobne do fitochromu widmo absorpcji. Dlatego też badania są prowadzone przede wszystkim w etiolowanych siewkach. Pomiar w zakresie fal 730—800 nm nie powoduje ponadto przechodzenia protochlorofilu w chlorofil w tkankach roślinnych, przez co fotokonwersja fitochromu jest łatwa do wykazania (19).

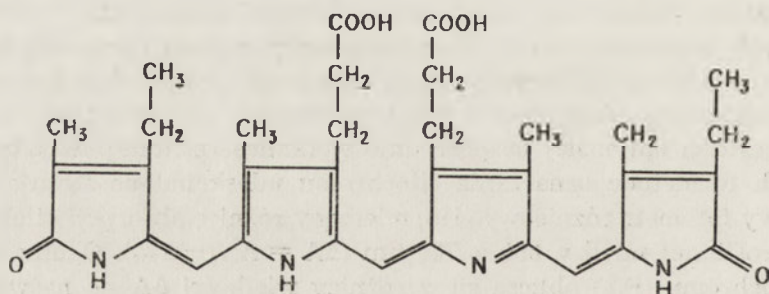
W 1959 roku przeprowadzono również pierwsze próby izolacji fitochromu z tkanek roślinnych (18). W latach późniejszych udoskonalono metody ekstrakcji i oczyszczania fitochromu (20), dla zbadania struktury i właściwości fizyko-chemicznych barwnika.

II. Charakterystyka fitochromu

II-1. Właściwości fizyko-chemiczne

Fitochrom jest chromoproteidem. Stosunkowo dobrze poznana jest jego część chromoforowa. Chromofor fitochromu jest otwartym łańcuchem tetrapiolowym (Ryc. 1), prawdopodobnie bilitrienem (18, 21), zbliżonym do fikocyjanobiliny stanowiącej grupę chromoforową fikobilin (22).

Znacznie mniej wiadomo o części białkowej fitochromu. Przez pewien czas utrzymywał się pogląd, że ciężar cząsteczkowy fitochromu jest bliski 60 000 (23). Okazało się jednak, że cząsteczka taka jest już produktem proteolizy większej jednostki o ciężarze cząsteczkowym około 120 000 (24—26). Rice i Briggs (27) donieśli o obecności w tkankach siewek ryżu fitochromu o jeszcze większych ciężarach cząsteczkowych zbliżonych do 240 000 a nawet 375 000. Analizowano również skład aminokwasowy jednostki białkowej fitochromu wyodrębnionego z różnych roślin. Wyniki tych analiz nie są zgodne (28), co spowodowane jest zapewne różnym stopniem oczyszczenia oraz degradacji cząsteczek natywnego chromoproteidu. Otrzymane wyniki wskazują, że cząsteczka fitochromu



Ryc. 1. Chromofor fitochromu P_{RF} (59).

zawiera wiele kwaśnych i zasadowych aminokwasów i około 10 reszt cytozyny oraz po kilka reszt treoniny i seryny na jednostkę białka o ciężarze 60 000. Warunkuje to wysoką reaktywność części białkowej fitochromu.

Przedmiotem dyskusji pozostaje nadal kwestia liczby grup chromoforowych na jednostkę białka fitochromu. Na ogół przyjmuje się jednak występowanie jednej cząsteczki chromoforu na jednostkę białka o ciężarze cząsteczkowym 60 000 (29).

W literaturze rozważana jest możliwość występowania w roślinach różnych populacji fitochromu (30). Brak jest jednak na to dowodów. Zastosowanie metod immunochemicznych celem wykazania różnic pomiędzy poszczególnymi formami fitochromu przyniosło wyniki negatywne (28).

II-2. Występowanie i wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie

Obecność fitochromu stwierdzono w roślinach wszystkich głównych grup taksonomicznych za wyjątkiem grzybów (31). W roślinach wyższych fitochrom występuje w: korzeniach, łodygach, liściach, ogonkach liściowych, liścieniach, koleoptylach, hypokotylach, epikotylach, pąkach wegetatywnych i kwiatowych oraz kwiatkach i owocach (32). Stwierdzono również, że najwyższe ilości fitochromu występują w aktywnie rosnących i różnicujących się częściach roślin (31). W etiolowanych siewkach jęczmienia i kukurydzy zwiększenie się ilości fitochromu następuje w okresie intensywnego wzrostu wydłużeniowego (34).

Wiele badań poświęcono wewnątrzkomórkowemu rozmieszczeniu fitochromu. Napromieniowanie komórek liniowo spolaryzowanym światłem czerwonym i daleką czerwienią pozwala na stwierdzenie, że cząsteczki fitochromu są ukierunkowane dichroicznie z zewnętrznej części cytoplazmy (35). Podczas przemiany fitochromu P_R w fitochrom P_{FR} oś maksymalnej absorpcji cząsteczek fitochromu obraca się około 90°, wywołując prostopadłą do powierzchni komórki orientację cząsteczek fitochromu

P_{FR} (36). Wyniki badań nad udziałem fitochromu w regulacji ruchów chloroplastów w komórkach glonu *Mougeotia* wykazały, że ułożenie równoległe do powierzchni komórki charakteryzuje fitochrom P_R , a prostopadłe fitochrom P_{FR} (37).

Wielu badaczy uważa, że fitochrom przyłącza się w komórce do pewnych struktur komórkowych. Sugerowano wiązanie się fitochromu z błonami protoplazmatycznymi (38, 39), błoną jądrową (40—42), mitochondriami (42) oraz plastydami (42). Wyniki badań immunocytochemicznych wskazują jednak, że wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie fitochromu P_R i fitochromu P_{FR} jest różne. Okazało się bowiem, że fitochrom P_R znajduje się w cytoplazmie (43, 44), nie wykazując powinowactwa do określonych struktur komórkowych. Forma ta jest więc łatwo rozpuszczalna (45—47). Naświetlenie siewek owsa i ryżu światłem czerwonym powoduje zmianę wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia fitochromu (42, 48, 49). Obserwowano szybkie przemieszczanie się powstającego fitochromu P_{FR} (po około 2 minutach w $+3^{\circ}\text{C}$) do pewnych jeszcze bliżej niezidentyfikowanych struktur w komórce. Przypuszczać można, że w regionach tych znajdują się specyficzne receptory fitochromu (50). Naświetlenie komórki daleką czerwienią powoli przywraca pierwotne rozmieszczenie fitochromu P_R w cytoplazmie (po około 2 godz. w temp. $+24^{\circ}\text{C}$).

Ze względu na lipoproteinową budowę błon komórkowych prowadzono badania nad zdolnością łączenia się fitochromu z białkami i lipidami. Wyniki wskazują na możliwość powstania takich połączeń z obu grupami substancji (51).

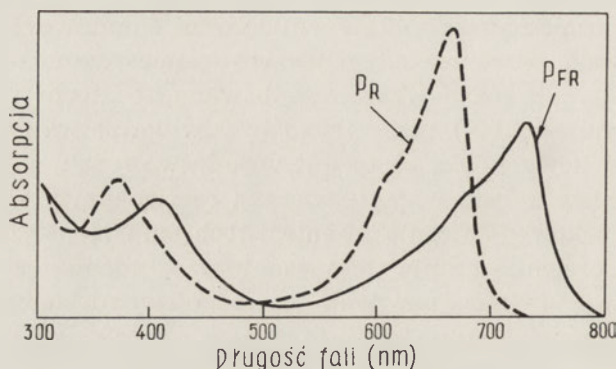
II-3. Konwersje

II-3.1. Fotokonwersje

Typowe fotokonwersje fitochromu są reakcjami niskoenergetycznymi. Do przeprowadzenia całkowitej fotokonwersji wystarcza krótkie, rzędu kilku sekund lub minut, działanie światła. Całkowita ilość energii światła czerwonego niezbędna do przeprowadzenia konwersji i wywołania odpowiedzi fotomorfogenetycznej rośliny zawiera się pomiędzy 1—1000 Jm^2 (52). Większość energii padającej na roślinę jest rozproszona i zaabsorbowana przez inne systemy barwnikowe, przede wszystkim chlorofil i protochlorofil. Fitochrom pobiera więc bardzo małe ilości energii i jest wykluczone aby jego mechanizm działania był związany z procesami przemiany energii jak ma to miejsce w przypadku chlorofilu.

Widma absorpcyjne fitochromu P_R i fitochromu P_{FR} pokrywają się w pewnym zakresie (Ryc. 2). Powoduje to, że w warunkach określonego promieniowania powstaje stan równowagi stacjonarnej, charakteryzujący się odpowiednim stosunkiem stężeń obu form fitochromu. Przy napromieniowaniu rośliny światłem o długości fali 660 nm około 80% całego

fitochromu występuje w postaci fitochromu P_{FR} , zaś przy napromienianiu światłem dalekiej czerwieni (około 730 nm) tylko 3% całości fitochromu znajduje się w postaci fitochromu P_{FR} (53). Stan fotostacjonarny ustala się bardzo szybko i kilkuminutowe napromienianie dawkami o średniej gęstości kwantowej wystarcza do jego powstania (53).

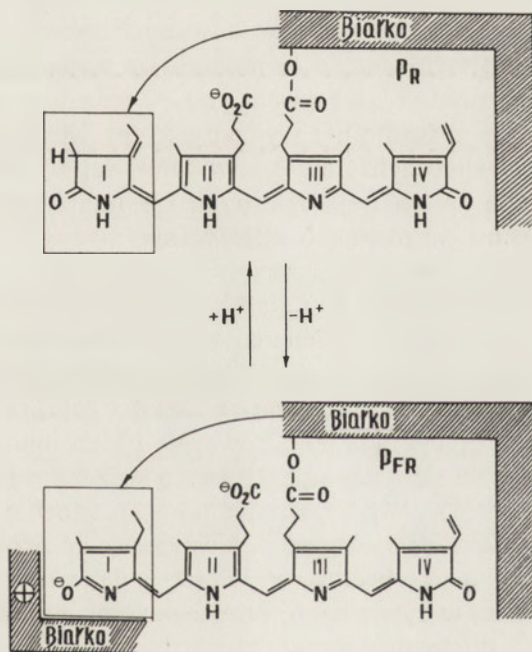


Ryc. 2. Widma absorpcji fitochromu P_R i fitochromu P_{FR} (32).

Badania fotokonwersji fitochromu prowadzono w doświadczeniach *in vivo* oraz *in vitro*. Badania kinetyki fotokonwersji *in vivo* zwróciły uwagę na możliwość występowania w roślinach różnych populacji fitochromu (30). Istnieją sugestie występowania w komórkach roślinnych małej frakcji fitochromu P_{FR} , niemierzalnej spektrofotometrycznie ale aktywnej fizjologicznie (30, 54, 55). I tak wykazano w tkankach kabaczka obecność szybko i wolno ulegającej konwersji populacji fitochromu (55). Można przypuszczać jednak, że jest to artefakt spowodowany trudnością w penetracji światła poprzez tkankę roślinną w trakcie pomiaru *in vivo*. Częsteczki fitochromu od strony źródła światła ulegają szybszej konwersji aniżeli położone głębiej (19). Brak jest więc bezpośrednich dowodów istnienia różnych populacji fitochromu. Jednakże niektóre doświadczenia pośrednio sugerują taką możliwość. Zaobserwowano mianowicie, że kontrolowana przez fitochrom zmiana wrażliwości fototropicznej koleoptyli kukurydzy, może być spowodowana przez dwukrotnie mniejsze natężenie czerwonego światła, aniżeli jest to konieczne dla wywołania fotokonwersji fitochromu (56). Wykazano również, że indukowany przez światło czerwone wzrost wycinków etiolowanych epikotyli grochu, można odwrócić światłem dalekiej czerwieni, na długo przed mierzalnym rozkładem fitochromu P_{FR} (57). Stwierdzono ponadto brak zależności pomiędzy wzrostem poziomu fitochromu P_{FR} a indukcją syntezy amoniakolizy-L-fenylalaniny w siewkach gorczycy i rzodkiewki (58). Wyniki tych doświadczeń sugerują, że istnieje jakaś nieduża, ale fizjologicznie aktywna frakcja fito-

chromu P_{FR} , nie mierzona ze względu na niską czułość stosowanych spektrofotometrów.

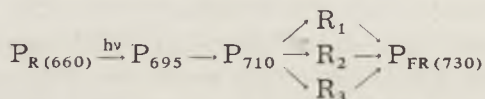
Mechanizm fotokonwersji fitochromu badano w doświadczeniach *in vitro*, na wyizolowanych i oczyszczonych preparatach barwnika (20, 21, 59). Jak wspomniano uprzednio, chromofor fitochromu jest tetrapiroblem zawierającym w swej cząsteczce cały szereg wiązań podwójnych. Stwierdzono, że podczas fotokonwersji fitochromu P_R w fitochrom P_{FR} ilość sprzężonych wiązań podwójnych wzrasta z 7 do 10. Cząsteczka fitochromu P_R zawiera dwa centra asymetryczne, które ulegają zanikowi po przekształceniu w formę absorbującą światło dalekiej czerwieni (20). Fotokonwersja fitochromu następuje tylko wówczas kiedy chromofor związany jest z białkiem, lecz nieznanne są dotąd molekularne mechanizmy ich oddziaływania. Chromofor łączy się z białkiem kowalencyjnie za pomocą grupy etylidenowej (20). Szereg badaczy wiąże przemiany fotochemiczne ze zmianą konformacji białka. Można jednak przyjąć, że fotokonwersja fitochromu wynika ze zmian w strukturze zarówno chromoforu jak i części białkowej (Ryc. 3).



Ryc. 3. Zmiany strukturalne podczas fotokonwersji fitochromu (21).

Fotokonwersje fitochromu są procesami wieloetapowymi i obejmują kilka substancji pośrednich, różniących się od siebie zarówno konfiguracją orbit elektronowych, jak i rozmieszczeniem atomów wodoru (20). Badania za pomocą spektroskopii błyskowej wykazały, że fitochrom P_R traci prawie bezpośrednio po naświetleniu światłem czerwonym maksimum

absorpcji przy 660 nm. Zanim jednak dojdzie do powstania związku o maksimum absorpcji przy 730 nm, pojawiają się substancje o maksimach absorpcji w pośrednich długościach fal (60):



Podobnie również podczas fotokonwersji fitochromu P_{FR} w fitochrom P_R naświetlenie daleką czerwień prowadzi do kilkuetapowej konwersji:



Występowanie substancji o maksimach absorpcji w pośrednich długościach fal udowodniono w doświadczeniach prowadzonych *in vitro*, można przypuszczać jednak, że podobna sytuacja występuje również *in vivo* (60).

II-3.2. Konwersje w ciemności

Oprócz konwersji fitochromu powodowanych przez światło, znane są również konwersje fitochromu w ciemności. Do najbardziej znanych należą: rewersje fitochromu P_{FR} do fitochromu P_R oraz destrukcja fitochromu P_{FR} — czyli przejście w formę nie wykazującą fotoodwracalności (28).

Koncepcja rewersji fitochromu P_{FR} w ciemności do fitochromu P_R powstała na podstawie badań fizjologicznych i pomiarów ilości poszczególnych form fitochromu w roślinach etiolowanych (61—63). Zauważono, że w napromieniowanych światłem czerwonym i następnie wstawionych do ciemności roślinach ilość fitochromu P_{FR} obniża się, zaś zawartość fitochromu P_R rośnie. Proces taki zachodzi w tkankach wielu roślin dwuliściennych. W tkankach grochu, słonecznika i innych roślin dwuliściennych obok rewersji występować może również i destrukcja, rewersja jest jednak procesem dominującym (34, 61). Rewersja fitochromu P_{FR} w ciemności hamowana jest przez niską temperaturę, co wskazuje na enzymatyczne podłoże tego procesu (63). Występowanie rewersji fitochromu P_{FR} w ciemności ma duże znaczenie fizjologiczne. Uważa się, że proces ten jest jednym z przejawów roli fitochromu jako części składowej zegara biologicznego mierzącego czas w zjawiskach fotoperiodyzmu roślin (64).

Destrukcja P_{FR} do formy nie wykazującej fotoodwracalności, a więc nie do fitochromu P_R , jest dominującym procesem w roślinach jednoliściennych (62). Destrukcję fitochromu P_{FR} obserwowano jednak również w niektórych roślinach dwuliściennych (65). Mechanizm rozkładu jest nieznan. Wiadomo tylko, że szybkość rozkładu w ciemności jest hamowana przez niską temperaturę oraz inhibitory metaboliczne jak azydek czy cyjanek (34, 66). Nie znamy fizjologicznego znaczenia ciemniowego rozkładu fitochromu P_{FR} w ciemności, są jednak dane wskazujące na ilość

ciowe zależności między szybkością rozkładu fitochromu P_{FR} a przebiegiem określonych procesów fizjologicznych (67, 68).

Przez szereg lat przyjmowano pogląd, że tylko fitochrom P_{FR} ulega konwersjom, zaś fitochrom P_R jest w ciemności trwały. W ostatnich latach wykryto jednak w kiełkujących nasionach odwrotną rewersję w ciemności, czyli niefotochemiczną przemianę fitochromu P_R w fitochrom P_{FR} . Wykazano obecność fitochromu P_{FR} w pęczniejących w ciemności nasionach sałaty, ogórka i szarłat (69—72). Jeśli pęczniejące nasiona napromieniowano światłem dalekiej czerwieni, przeprowadzając fotokonwersję fitochromu P_{FR} w fitochrom P_R , po około 20 minutach obserwowano ponowne pojawienie się fitochromu P_{FR} . Ponieważ ogólna ilość fitochromu była stała, wnioskowano, że zachodzącym procesem jest rewersja fitochromu P_R w ciemności do fitochromu P_{FR} . Na ile proces ten posiada charakter ogólny i jakie jest jego fizjologiczne znaczenie odpowiedzi winny udzielić dalsze badania.

II-4. Fizjologiczna rola fitochromu

Fitochrom jest głównym receptorem bodźca świetlnego w procesach fotomorfogenezy. Dużo badań poświęcono roli fitochromu w regulacji kiełkowania nasion, stwierdzając, że kontroluje on kiełkowanie zarówno nasion wrażliwych (fotoblastyczne) jak i niewrażliwych (niefotoblastyczne) na światło (73). Typowa fotoodwracalność kiełkowania pod wpływem działania światła czerwonego i dalekiej czerwieni występuje w nasionach pozytywnie fotoblastycznych. W nasionach kiełkujących w ciemności (negatywnie fotoblastyczne i nefotoblastyczne), naświetlanie daleką czerwień hamuje kiełkowanie zaś światło czerwone niweluje efekt dalekiej czerwieni (65, 73—75). Świadczy to, że nasiona kiełkujące w ciemności mają zdolność niezależnej od światła rewersji fitochromu P_R w fitochrom P_{FR} . Napromieniowanie takich nasion daleką czerwień powoduje fotokonwersję fitochromu P_{FR} do fitochromu P_R , co prowadzi do zahamowania kiełkowania.

Fakt, że mogące kiełkować w ciemności nasiona zawierają fitochrom w formie P_{FR} , jest w wyraźnej sprzeczności z sytuacją w etiolowanych siewkach, gdzie fitochrom występuje wyłącznie w formie P_R (76). Ilość barwnika zwiększa się w okresie intensywnego wzrostu siewek (77—79). Światło hamuje wzrost międzywęźli oraz stymuluje zwiększenie powierzchni liści i biosyntezę chlorofilu. Fotokonwersja fitochromu P_R do fitochromu P_{FR} prowadzi więc do zahamowania wzrostu wydłużeniowego pędu oraz stymulacji procesów wzrostowo-rozwojowych liści. Nie znamy przyczyn różnych efektów fotomorfogenetycznych fitochromu P_{FR} w różnych organach rośliny. Przypuszczać można tylko, że jest to spowodowane obecnością różnych populacji fitochromu. Jak podawano jednak uprzed-

nio, nie ma konkretnych danych, które by wskazywały, że łądoga i liście zawierają różne populacje fitochromu P_{FR} .

Wiele badań poświęcono roli fitochromu w zjawiskach fotoperiodyzmu. Wykazano, że czynnikiem determinującym zakwitanie roślin fotoperiodycznie zróżnicowanych jest stan fotostacjonarny fitochromu (80). Konsekwencją obecności w roślinie odpowiedniej ilości fitochromu P_{FR} jest uruchomienie syntezy hormonów, powodujących zmianę kierunku różnicowania wierzchołków wzrostu z wegetatywnego na generatywny.

III. Mechanizm działania fitochromu

III-1. Fitochrom a właściwości błon

Jak podano uprzednio, wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie fitochromu P_R i fitochromu P_{FR} jest różne. Fitochrom P_{FR} bezpośrednio po powstaniu przemieszcza się w komórce, przyłączając się do bliżej niezidentyfikowanych, hipotetycznych, receptorów komórkowych. Wywołuje to cały szereg zmian w strukturze i właściwościach błon komórkowych. Do najczęściej stwierdzanych należą zmiany w: transporcie jonów (51, 81), przepuszczalności wody i substancji drobnocząsteczkowych (82, 83), potencjałach elektrycznych błon (84, 85) oraz aktywnościach związanych z błonami enzymów (51). Konwersje fitochromu kontrolują również ruchy chloroplastów (86—88) i ruchy fotonastyczne liści *Mimosa* (89) oraz *Albizzia* (81, 90). Zmiany w strukturze i właściwościach błon zachodzą już po upływie kilku sekund, względnie minut, od momentu powstania aktywnej formy fitochromu. Zastosowanie inhibitorów syntezy kwasów nukleinowych i białek (28, 90) nie hamuje tych procesów.

Wydaje się więc, że mechanizm działania fitochromu związany jest z strukturą i właściwościami błon komórkowych. Fitochrom P_{FR} przyłączając się do określonych receptorów w błonach komórkowych powoduje zmianę ich struktury. Wpływać on może również na aktywność niektórych enzymów kontrolujących transport jonów i cząsteczek w obrębie komórki (51) oraz związanych z błonami enzymów katalizujących metabolizm związków rozpuszczalnych (51, 91). Fitochrom P_{FR} regulować może także zawartość związanych z błonami substancji hormonalnych (92). Indukowane więc przez fitochrom zmiany w błonach komórkowych prowadzić mogą do zmian metabolizmu komórki. Okresowe zwiększanie przepuszczalności błon komórkowych regulować może również transport substancji odżywczych oraz hormonalnych.

W ostatnich latach zwrócono uwagę na udział acetylocholinę w reakcjach kontrolowanych przez fitochrom na poziomie błon komórkowych. Wykazano, że światło czerwone powoduje zarówno zwiększenie produkcji jak i wydzielania acetylocholinę przez korzenie fasoli. Daleka czerwień

efekty te niweluje (93). Traktowanie roślin acetylocholiną hamuje wytwarzanie drugorzędowych korzeni oraz zwiększa szybkość transportu jonów wodorowych w tkankach fasoli — powoduje więc identyczny efekt morfogenetyczny jak światło czerwone (93). Jaffe (93) postawił hipotezę, że acetylocholina bierze udział w reakcjach kontrolowanych przez system fitochromowy. Podobnie jak w organizmach zwierzęcych stymuluje ona transport jonów, powoduje zmiany potencjału elektrycznego błon oraz przepuszczalności struktur cytoplazmatycznych. Hipotezę tę potwierdzono w kilku przypadkach (94—97), istnieją jednak również doniesienia przeciwne (98—101). Wyniki badań nad enzymami regulującymi syntezę i rozkład acetylocholinę wskazują, że esteraza cholinowa występuje w ścianach komórkowych korzeni fasoli i jej aktywność nie podlega fotokontroli przez światło czerwone i daleką czerwień (91, 102). Mniej wiadomo na temat rozmieszczenia acetylotransferazy cholinowej. W trakcie frakcjonowania komórek enzym ten występuje razem ze strukturami retikulum endoplazmatycznego (91) oraz fitochromem (103). Rola acetylocholinę w procesach fotomorfogenezy jest więc niejasna i wymaga dalszych badań.

III-2. Fitochrom a enzymy

Jedną z pierwszych hipotez tłumaczących mechanizm działania fitochromu była propozycja jego odkrywców (64), według której fitochrom P_{FR} miałby być aktywną, zaś fitochrom P_R nieaktywną formą enzymu. Na podstawie badań nad syntezą antocjanów zaproponowano, że fitochrom P_{FR} katalizuje aktywację octanu do acetylokoenzymu A (13). Później okazało się jednak, że regulacja syntezy acetylokoenzymu A nie jest specyficznym dla fitochromu procesem, ponieważ również i inne przemiany w procesie biosyntezy antocjanów są regulowane przez fitochrom. Pomiedzy powstaniem aktywnej formy fitochromu a syntezą antocjanów istnieje ponadto faza utajenia długości około 3 godzin (1). Dane te nie sugerują więc bezpośredniego udziału fitochromu jako enzymu katalizującego jeden specyficzny etap metabolizmu.

Okazało się jednak, że fitochrom kontroluje metabolizm nukleotydów oraz aktywność wielu systemów enzymatycznych. Stwierdzono, że napromieniowanie roślin czerwiecią prowadzi do podwyższenia zawartości w ich tkankach fosforanu nukleotydu nikotynoamidoadeninowego (104). Wykazano jednocześnie, że częściowo oczyszczone preparaty fitochromu z tkanek etiolowanego grochu wykazują aktywność kinazy dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego. Światło czerwone stymulowało tę aktywność, przy czym obserwowano zmniejszanie stałej Michaelisa (K_m) tego enzymu w stosunku do dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego. Stymulację tę znosiło działanie dalekiej czerwieni. Jednakże udało się

rozdzielić fitochrom od aktywności kinazy dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego (105). Światło czerwone powoduje również wzrost ilości adenosynotrójfosforanu w tkankach niektórych roślin (101, 106—109). Wyniki te, aczkolwiek bardzo interesujące, są trudne do powtórzenia i spotkały się z dużym sceptycyzmem.

W doświadczeniach nad wpływem fitochromu na aktywność enzymów dużo uwagi poświęcono indukcji aktywności amoniakolizazy-L-fenylalaniny, enzymu katalizującego tworzenie się kwasu transcynamonowego z fenylalaniny. Czynnikiem indukującym jest światło czerwone, zaś daleka czerwień efekt ten niweluje (110, 111). Również badania kinetyczne nad zachowaniem się fitochromu P_{FR} w warunkach równowagi dynamicznej (ciągłe napromieniowanie daleką czerwienią utrzymujące niski ale stały poziom P_{FR} w tkankach) świadczą, że aktywność amoniakolizazy-L-fenylalaniny podlega kontroli fitochromowej. Początkowa faza utajenia trwa 1,5 godziny od rozpoczęcia naświetlania, po czym występuje wyraźny i szybki wzrost aktywności enzymu (111, 112). Tempo wzrostu aktywności jest stałe w ciągu wielu godzin, po czym wykazuje tendencję malejącą. W związku z tym, że wzrost aktywności enzymu udało się, przynajmniej częściowo, zahamować za pomocą puromycyny, cykloheksimidu oraz aktynomycyny D (110, 111) można wnioskować, że wzrost aktywności był wynikiem syntezy de novo białka enzymatycznego. Wpływ światła na syntezę de novo enzymów stwierdzono również w przypadku oksydazy kwasu askorbinowego (113, 114), rybonukleazy (115) oraz reductazy azotanowej (110, 116—118).

Inny kierunek regulacji aktywności enzymów przez fitochrom stwierdzono w przypadku lipoksygenazy. W liściach gorczyicy aktywność lipoksygenazy sukcesywnie się zwiększa w ciemności (119). Jeśli nasiona znajdowały się w warunkach ciągłego napromieniowania daleką czerwienią (niski ale stały poziom P_{FR} w tkankach), poczynając od 33 godziny pęcznienia nasion obserwowano gwałtowne zahamowanie aktywności enzymu, trwające około 15 godzin. Poczynając od 48 godziny zauważano ponowne zwiększenie aktywności lipoksygenazy. Jest możliwe, że fitochrom P_{FR} w okresie między 33 a 48 godziną, powoduje represję syntezy lipoksygenazy na poziomie transkrypcji (120). Wydaje się jednak, że nie można również wykluczyć allosterycznych mechanizmów hamowania aktywności enzymu.

Omówione wyżej dane posłużyły M o h r o w i (73, 74) do zaproponowania teorii o zróżnicowanej aktywacji i represji genów przez fitochrom. Mohr uważa, że pomiędzy stanem genów w poszczególnych komórkach istnieją różnice i że geny podzielić można na 4 grupy czynnościowe: aktywne, nieaktywne, potencjalnie aktywne i ulegające represji. Geny potencjalnie aktywne i ulegające represji są pod kontrolą systemu fitochromowego. Indukcja poprzez fitochrom P_{FR} tych genów prowadzi do ujawnienia się fotoefektów dodatnich (np. kiełkowanie nasion fotobla-

stycznych, wytworzenie kwiatów, synteza antocjanów), ewentualnie fotofektów ujemnych (np. hamowania wzrostu łodygi, hamowanie syntezy lipoksygenazy). Teoria Mohra zakłada więc, że mechanizm działania fitochromu polega na bezpośrednim wpływie fitochromu P_{FR} na aktywność genów. W ostatnich latach została ona uzupełniona przez uznanie możliwości występowania szeregu pierwotnych reakcji jako konsekwencji łączenia się cząsteczki fitochromu P_{FR} ze specyficznymi receptorami komórkowymi (1, 122). Współzależności między fitochromem a genami polegają więc prawdopodobnie na oddziaływaniu pośrednim.

III-3. Fitochrom a substancje wzrostowe

Wzrost i rozwój roślin regulowany jest na drodze hormonalnej. Substancje wzrostowe jak auksyny, gibereliny, cytokininy, inhibitory i etylen wspólnie kontrolują przebieg procesów morfogenezy. Ponieważ traktowanie roślin substancjami wzrostowymi niejednokrotnie zastępuje wpływ światła (92), istnieje możliwość, że fitochrom współdziała z systemem hormonalnym w regulacji procesów fotomorfogenezy.

Wielokrotnie wykazano udział czerwieni i dalekiej czerwieni w regulacji biosyntezy, degradacji oraz uwalnianiu hormonów z form związanych (92). Stwierdzono również, że światło czerwone wpływa na transport hormonów (92) oraz wrażliwość tkanek roślinnych na działanie substancji wzrostowych (92, 123). Trudno jest zdecydować jednak czy stwierdzany wpływ światła na zawartość substancji hormonalnych w tkankach roślinnych, jest częścią składową procesów kontrolowanych przez fitochrom w procesach fotomorfogenezy. Pewne doświadczenia potwierdzają taką możliwość. Traktowanie na przykład roślin giberelinami może zastąpić wpływ światła w kiełkowaniu nasion fotoblastycznych (124), wzroście liści (125, 126), czy odwijaniu się liści roślin zbożowych (127). Światło czerwone powoduje w tych roślinach podwyższenie się zawartości naturalnych giberelin, zaś daleka czerwień hamuje procesy fizjologiczne i obniża poziom giberelin (92). Podobnie sytuacja wygląda w przypadku działania światła na wzrost łodygi. Światło czerwone hamuje wzrost wydłużeniowy, prowadząc jednocześnie do obniżenia się zawartości auksyn w komórkach łodygi (92, 128). Traktowanie roślin auksyną nie odwraca jednak hamującego wpływu światła (128), który można odwrócić działaniem giberelin (129—131).

Cały szereg badaczy uważa jednak, że działanie fitochromu i hormonów w procesach fotomorfogenezy jest przynajmniej częściowo niezależne. I tak gibereliny i cytokininy są w stanie zastąpić wpływ światła czerwonego w kiełkowaniu nasion fotoblastycznych (124). Substancje te nie są w stanie jednak odwrócić hamującego wpływu dalekiej czerwieni na kiełkowanie (132). Traktowanie nasion małymi dawkami hormonów oraz

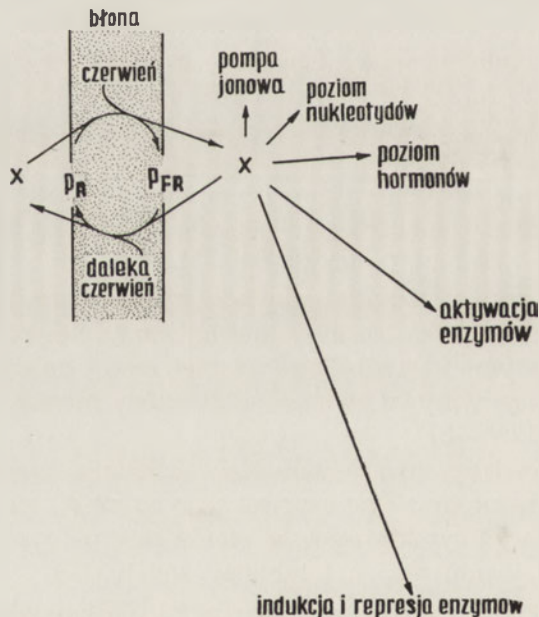
światłem o niskim natężeniu jest bardziej efektywne niż osobne działanie tych czynników (133—135) Synergizm zjawisk sugeruje, że działanie fitochromu i substancji wzrostowych zachodzi, przynajmniej częściowo, różnymi drogami. Znany jest również fakt stymulacji syntezy α -amylazy w liściach gorczycy przez światło czerwone, podczas gdy hormony są całkowicie nieaktywne (136).

Wydaje się więc, że aczkolwiek współdziałanie fitochromu z hormonami w regulacji procesów fotomorfogenezy jest więcej niż pewne, to jednak kontrola przez fitochrom tych procesów nie ogranicza się tylko do regulacji zawartości i transportu substancji hormonalnych.

IV. Uwagi końcowe

W chwili obecnej dość dużo już wiadomo odnośnie budowy fitochromu oraz jego właściwości. Nie można jednak jeszcze całkowicie wyjaśnić roli fitochromu w poszczególnych procesach rozwojowych oraz mechanizmu jego działania. Udoskonalenia wymagają metody ekstrakcji, oczyszczania i ilościowego określania fitochromu. Lepsze zrozumienie mechanizmu działania fitochromu wiąże się jednocześnie z ogólnym postępowaniem w badaniach procesów różnicowania na poziomie molekularnym.

Nie ma obecnie wątpliwości, że fitochrom jest głównym receptorem światła w procesach fotomorfogenezy roślin. Wydaje się również, że w wewnątrzkomórkowej działalności fitochromu wyróżnić można dwa zasad-



Ryc. 4. Hipotetyczny schemat dróg działania fitochromu.

nicze etapy: pierwszy — związany z reakcjami pierwotnymi, zachodzący bardzo szybko, jako wynik konwersji fitochromu, oraz drugi — późniejszy, związany z aktywacją względnie represją poszczególnych genów komórkowych. Dostępne dane wskazują także na występowanie w komórkach jakiegoś nieznanego „wtórnego przekaźnika” fitochromu (X), którym w myśl hipotezy Jaffe (93) mogłaby być acetylocholina (Ryc. 4).

Dopiero jednak dalsze badania wykażą na ile poszczególne obserwowane zmiany metaboliczne związane są z kontrolą procesów fotomorfogenezy przez fitochrom. Szczególnej uwagi wymagają współzależności między fitochromem a systemem hormonalnym, gdyż obie grupy substancji wspólnie kontrolują całokształt zjawisk morfogenezy roślin.

Zaakceptowano 22.12.1978

PIŚMIENICTWO

1. Mohr H. (1972), w Lectures on Photomorphogenesis, red. Appl G., str. 1—235, Springer-Verlag., Berlin, Heidelberg, New York.
2. Garner W. W., Allard H. A., (1920), *J. Agr. Res.*, **18**, 553—606.
3. Garner W. W., Allard H. A., (1923), *J. Agr. Res.*, **23**, 871—920.
4. Borthwick H. A., (1972), w Phytochrome, red. Mitrakos K., Shropshire W. Jr., str. 3—27, Academic Press, London, New York.
5. Borthwick H. A., Hendricks S. B., Parker M. W., Toole E. H., Toole V. K., (1952), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **38**, 662—666.
6. Borthwick H. A., Hendricks S. B., Parker M. W., (1951), *Botan. Gaz.*, **113**, 95—105.
7. Parker M. W., Hendricks S. B., Borthwick H. A., Went F. W., (1949), *Am. J. Bot.*, **36**, 194—204.
8. Parker M. W., Hendricks S. B., Borthwick H. A., Scully N. J., (1945), *Science*, **102**, 152—155.
9. Parker M. W., Hendricks S. B., Borthwick H. A., Scully N. J., (1946), *Botan. Gaz.*, **108**, 1—26.
10. Borthwick H. A., Hendricks S. B., Parker M. W., (1952), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **38**, 929—934.
11. Withrow R. B., Klein W. H., Elstad V. B., (1957), *Plant. Physiol.*, **32**, 453—462.
12. Virgin H. I., (1958), *Physiol. Plant.*, **11**, 347—362.
13. Siegelman H. W., Hendricks S. B., (1957), *Plant Physiol.*, **32**, 393—398.
14. Siegelman H. W., Hendricks S. B., (1958), *Plant Physiol.*, **33**, 409—413.
15. Borthwick H. A., Hendriks S. B., Toole E. K., Toole V. K., (1954), *Botan. Gaz.*, **115**, 205—225.
16. Flint L. H., McAlister E. D., (1935), *Smithsonian Misc. Collect.*, **94**, 1—11.
17. Flint L. H., McAlister E. D., (1937), *Smithsonian Misc. Collect.*, **96**, 1—9.
18. Butler W. L., Norris K. H., Siegelman H. W., Hendricks S. B., (1959), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **45**, 1703—1708.
19. Spruit C. J. P., (1972), w Phytochrome, red. Mitrakos K., Shropshire W. Jr., str. 77—104, Academic Press, London, New York.
20. Kroes H. H., (1970), Meded. Landbouwhogeschool, Wagerungen, 70—18, 1—94.

21. Rüdiger W., (1972), w *Phytochrome*, red. Mitrakos K., Shropshire W. Jr. str. 129—141, Academic Press, London, New York.
22. Borthwick H. A., Hendricks S. B., (1960), *Science*, **132**, 1223—1228.
23. Mumford F. E., Jenner E. L., (1966), *Biochemistry*, **5**, 3657—3662.
24. Briggs W. R., Zollinger W. D., Platz B. B., (1968), *Plant. Physiol.*, **43**, 1239—1243.
25. Walker T. S., Bailey J. L., (1970), *Biochem. J.*, **120**, 613—622.
26. Correll D. L., Steers E. Jr., Towe K. M., Shropshire W. Jr., (1968), *Biochem. Biophys. Acta*, **168**, 46—57.
27. Rice H. V., Briggs W. R., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 927—938.
28. Briggs W. R., Rice H. V., (1972), *Ann Rev. Plant Physiol.*, **23**, 294—323.
29. Siegelman H. W., Firer E. M., (1964), *Biochemistry*, **3**, 418—423.
30. Purves W. K., Briggs W. R., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 1259—1263.
31. Borthwick H. A., (1972), w *Phytochrome*, red. Mitrakos K., Shropshire W. Jr., str. 27—47, Academic Press, London, New York.
32. Smith H., (1975), *Phytochrome and Photomorphogenesis*, McGraw-Hill Book Comp., London, New York.
33. Briggs W. R., Siegelman H. W., (1965), *Plant. Physiol.*, **40**, 934—941.
34. Butler W. L., Lane H. C., (1965), *Plant Physiol.*, **40**, 13—17.
35. Haupt W., (1970), *Physiol. Vég.*, **8**, 551—563.
36. Haupt W., Mörtel G., Winkelkempfer I., (1969), *Planta*, **88**, 183—186.
37. Haupt W., (1971), *Adr. Sci.*, **27**, 341—346.
38. Haupt W., (1972), w *Phytochrome*, red. Mitrakos K., Shropshire W. Jr., str. 553—569, Academic Press, London, New York.
39. Marme D., Schäfer E., (1972), *Z. Pflanzenphysiol.*, **67**, 192—194.
40. Pratt L. H., Coleman R. A., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A* **68**, 2431—2435.
41. Galston A. W., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A* **61**, 454—460.
42. Pratt L. H., Coleman R. A., MacKenzie J. M. Jr., (1976), w *Light and Plant Development*, red. Smith H., str. 75—94, Butterworth, London.
43. Coleman R. A., Pratt L. H., (1974), *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1039—1047.
44. Coleman R. A., Pratt L. H., (1974), *Planta* **121**, 119—131.
45. Hopkins D. W., Butler W. L., (1970), *Plant Physiol.*, **45**, 567—570.
46. Pratt L. H., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 203—209.
47. Rice H. V., Briggs W. R., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 939—945.
48. MacKenzie J. M. Jr., Coleman R. A., Briggs W. R., Pratt L. H., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A* **73**, 799—803.
49. Pratt L. H., Marmé D., (1976), *Plant Physiol.*, **58**, 686—692.
50. Pratt L. H., (1978), *Plant Physiol.*, **9**, 1—4.
51. Marmé D., (1977), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 173—198.
52. Furuya M., (1968), w *Progress in Phytochemistry*, red. Reinhold L., Liwshitz Y., t. 1, str. 347—405, London.
53. Pratt L. H., Briggs W. R., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 467—474.
54. Everett M. S., Briggs W. R., Purves W. K., (1970), *Plant Physiol.*, **45**, 805—806.
55. Boisard J., Marmé D., Schäfer E., (1971), *Planta*, **99**, 302—310.
56. Briggs W. R., Chon H. P., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 1159—1166.
57. Hillman W. S., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 907—908.
58. Bellini E., Hillman W. S., (1971), *Plant Physiol.*, **47**, 668—671.
59. Siegelman H. W., Chapman D. J., Cole W. J., (1968), w *Porphyrins*

- and Related Compounds, red. Goodwin T. W., str. 107—120, Academic Press, London, New York.
60. Linschitz H., Kasche V., Butler W. L., Siegelman H. W., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 3395—3403.
 61. Butler W. L., Lane H. C., Siegelman H. W., (1963), *Plant Physiol.*, **38**, 514—519.
 62. Hopkins W. G., Hillman W. S., (1965), *Amer. J. Bot.*, **52**, 427—432.
 63. Frankland B., (1972), w *Phytochrome*, red. Mitrakos K., Shropshire W. Jr., str. 196—221, Academic Press, London, New York.
 64. Hendricks S. B., (1959), w *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals*, red. Withrow R. B., str. 423—438, A.A.A.S., Washington.
 65. Kendrick R. E., Frankland B., (1968), *Planta* **82**, 317—320.
 66. Furuya M., Hillman W. S., (1964), *Planta*, **63**, 31—42.
 67. Smith H., Attridge T. H., (1970), *Phytochem.*, **9**, 487—495.
 68. Dooskin R. H., Mancinelli A. L., (1968), *Bull. Torrey Bot. Club.*, **95**, 474—487.
 69. Boisard J., (1969), *Physiol. Veg.*, **7**, 119—133.
 70. Boisard J., Spruit C. J. P., Rollin P., (1968), *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen*, **68—17**, 1—5.
 71. Spruit C. J. P., Mancinelli A. L., (1969), *Planta*, **88**, 303—310.
 72. Kendrick R. E., Spruit C. J. P., Frankland B., (1969), *Planta*, **88**, 293—302.
 73. Rollin P., (1972), w *Phytochrome*, red. Mitrakos K., Shropshire W. Jr., str. 229—249, Academic Press, London, New York.
 74. Mancinelli A. L., Borthwick H. A., Hendricks S. B., (1966), *Botan. Gaz.*, **127**, 1—5.
 75. Yaniv Z., Mancinelli A. L., Smith P., (1967), *Plant Physiol.*, **42**, 1479—1482.
 76. Clarkson D. T., Hillman W. S., (1967), *Planta*, **75**, 286—290.
 77. Kendrick R. E., Frankland B., (1969), *Planta*, **86**, 21—32.
 78. Correll D. L., Shropshire W. Jr., (1968), *Planta*, **79**, 275—283.
 79. McArthur, Briggs W. R., (1970), *Planta*, **91**, 146—154.
 80. Vince D., (1972), w *Phytochrome*, red. Mitrakos K., Shropshire W. Jr., str. 258—291, Academic Press., London, New York.
 81. Satter R. L., Galston A. W., (1971), *Science*, **174**, 518—520.
 82. Carceller M. S., Sanchez R. A., (1972), *Experientia*, **28**, 364—365.
 83. Weisenseel M., Smeibidl E., (1973), *Z. Pflanzenphysiol.*, **70**, 420—431.
 84. Newmann I. A., Briggs W. R., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 687—693.
 85. Jaffe M. J., (1968), *Science*, **162**, 1016—1017.
 86. Haupt W., Übel H., (1975), *Z. Pflanzenphysiol.*, **75**, 165—171.
 87. Haupt W., Bertz N., (1976), *Planta*, **128**, 1—3.
 88. Wagner G., Haupt W., Laux A., (1972), *Science*, **176**, 808—809.
 89. Fondeville J. C., Borthwick H. A., Hendricks S. B., (1966), *Planta*, **69**, 357—364.
 90. Jaffe M. J., Galston A. W., (1967), *Planta*, **77**, 135—141.
 91. Jaffe M. J., (1976), w *Light and Plant Development*, red. Smith H., str. 333—44, Butterworth, London.
 92. Black M., Vlitos A. J., (1972), w *Phytochrome*, red. Mitrakos K., Shropshire W. J., str. 518—550, Academic Press, London, New York.
 93. Jaffe M. J., (1970), *Plant Physiol.*, **46**, 768—777.
 94. Hartmann E., (1971), *Planta*, **101**, 159—165.
 95. Kandeler R., (1972), *Z. Pflanzenphysiol.*, **67**, 86—92.
 96. Saunders J. A., McClure J. W., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 407—408.

97. Kopcewicz J., Cymerski M., Poraziński Z., (1977), *Bull. Acad., Polon. Sci. ser. Biol.*, **25**, 111—117.
98. Kasemir H., Mohr H., (1972), *Plant Physiol.*, **49**, 453—454.
99. Satter R. L., Applewhite P. B., Galston A. W., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 523—524.
100. Tanada T., (1972), *Plant Physiol.*, **49**, 860—861.
101. White J. M., Pike C. S., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 76—79.
102. Fluck R. A., Jaffe M. J., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 752—758.
103. Williamson F. A., Morré D. J., Jaffe M. J., (1975), *Plant Physiol.*, **56**, 738—743.
104. Tezuka T., Yamamoto Y., (1969), *Bot. Mag.*, **82**, 130—133.
105. Yamamoto Y., Tezuka T., (1972), w *Phytochrome*, red. Mitrakos K., Shropshire W. Jr., str. 407—429, Academic Press, London, New York.
106. Yunghaus H., Jaffe M. J., (1972), *Plant Physiol.*, **49**, 1—7.
107. Sandmeier M., Ivart J., (1972), *Photochem. Photobiol.*, **16**, 51—59.
108. Bürcky K., Kauss H., (1974), *Z. Pflanzenphysiol.*, **73**, 184—186.
109. Kirshner R. L., White J. M., Pike C. S., (1975), *Physiol. Plant.*, **34**, 373—377.
110. Schopfer P., (1977), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 223—252.
111. Mohr H., (1969), w *Physiology of Plant Growth and Development*, red. Wilkins M. B., str. 508—556, McGraw-Hill, New York.
112. Durst F., Mohr H., (1966), *Naturwiss.*, **53**, 531—532.
113. Acton G. J., Drumm H., Mohr H., (1974), *Planta*, **121**, 39—50.
114. Attridge T. H., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **362**, 258—265.
115. Acton G. J., Schopfer P., (1974), *Biochem. J.*, **142**, 449—455.
116. Aslam M., Oaks A., (1976), *Plant Physiol.*, **57**, 572—576.
117. Jones R. W., Sheard R. W., (1975), *Plant Physiol.*, **55**, 954—959.
118. Johnson C. B., (1976), *Planta*, **128**, 127—131.
119. Oelze-Karow H., Mohr H., (1970), *Z. Naturforsch.*, **25**, 1282—1286.
120. Oelze-Karow H., Schopfer P., Mohr H., (1970), *Proc Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **65**, 51—57.
121. Mohr H., (1966), *Photochem. Photobiol.*, **5**, 469—483.
122. Mohr H., Bienger I., Lange H., (1971), *Nature*, **230**, 56—58.
123. Musgrave A., Kays S. E., Kende H., (1969), *Planta*, **89**, 165—177.
124. Kahn A., (1960), *Plant Physiol.*, **35**, 333—339.
125. Humphries E. C., Wheeler A. W., (1960), *J. Exp. Bot.*, **11**, 81—85.
126. Scott R. A., Liverman J. L., (1957), *Science*, **126**, 122—124.
127. Beevers L., Loveys B., Pearson J. A., Wareing P. F., (1970), *Planta*, **90**, 286—294.
128. Fletcher R. A., Zalik S., (1964), *Plant Physiol.*, **39**, 328—333.
129. Lockhart J. A., (1956), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **42**, 841—848.
130. Lockhart J. A., (1958), *Physiol. Plant.*, **11**, 478—486.
131. Lockhart J. A., (1961), *Am. J. Bot.*, **48**, 516—525.
132. Negbi M., Black M., Bewley J. D., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 35—40.
133. Leff J., (1964), *Plant Physiol.*, **39**, 299—303.
134. Bewley J. D., Black M., Negbi M., (1967), *Nature*, **215**, 648—649.
135. Bewley J. D., Negbi M., Black M., (1968), *Planta*, **78**, 351—357.
136. Drumm H., Elchinger I., Moller J., Peter K., Mohr H., (1971), *Planta*, **99**, 265—274.

KRZYSZTOF WOROWSKI*), WIESŁAWA ROSZKOWSKA**)

Ziemniaczane inhibitory proteaz

Potato Inhibitors of Proteases

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Izolowanie, struktura chemiczna i właściwości inhibitorów ziemniaczanych
 - II-1. Inhibitory trypsyny i chymotrypsyny
 - II-2. Inhibitory kalikrein
 - II-3. Inhibitory karboksypeptydaz
 - II-4. Inhibitory proteaz komórkowych
- III. Specyficzność i mechanizm działania
- IV. Znaczenie biologiczne
- V. Inhibitory ziemniaczane a metabolizm białkowy u zwierząt

Contents

- I. Introduction
- II. Isolation, chemical structure and properties of potato inhibitors
 - II-1. Trypsin and chymotrypsin inhibitors
 - II-2. Kallikrein inhibitors
 - II-3. Carboxypeptidase inhibitors
 - II-4. Cellular protease inhibitors
- III. Specificity and mechanism of action
- IV. Biological role
- V. Potato inhibitors and protein metabolism in animals

I. Wprowadzenie

Antyproteolityczne właściwości ekstraktu z bulw ziemniaka wykrył w roku 1951 Werle i wsp. (1).

Pierwsze preparaty inhibitorów ziemniaczanych otrzymali Sohnie i Ambe (2), Mansfeld i wsp. (3), Kinugasa i Yoshikawa (4), oraz Ryan i Melville (5—7).

*) Doc. dr habil., **) mgr chemii, Zakład Chemii Analitycznej, Instytut Biochemii i Analityki Medycznej, Akademia Medyczna w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2, 15-230 Białystok.

Zainteresowania ziemniaczanymi inhibitorami proteaz wynikają przede wszystkim z ich szerokiego zakresu działania antyproteolitycznego (8, 9) i hamowania również aktywności proteaz komórkowych (10, 11). Z tego względu znalazły one zastosowanie w leczeniu w stanach wzmoczonej proteolizy (12, 13). Używa się ich także jako odczynników w analizie biochemicznej (14) oraz po związaniu ze stałymi nośnikami do otrzymywania wysokoczystych preparatów proteaz metodą swoistej sorpcji (15). Inhibitory ziemniaczane stosuje się ponadto w badaniach nad strukturą centrów aktywnych i mechanizmem działania enzymów proteolitycznych (16—18).

O dużym zainteresowaniu ziemniaczanymi inhibitorami proteaz zadecydowała także niska cena, łatwo dostępnego w dużych ilościach surowca, którym jest sok ziemniaczany. Stanowi on materiał odpadowy przy produkcji skrobi i w przemyśle gorzelnianym.

II. Izolowanie, struktura chemiczna i właściwości inhibitorów ziemniaczanych

Obecność inhibitorów proteaz stwierdzono w bulwach wszystkich badanych dotąd odmian ziemniaków (19, 20). Nie zawierają ich jednak organy zapasowe innych roślin, z wyjątkiem pomidora, który podobnie jak ziemniak należy do rodziny psiankowatych (21). Spośród różnych części anatomicznych ziemniaka największą ilość inhibitorów zawierają bulwy (22), a zwłaszcza ich część obwodowa (23). Stwierdzono, że około 7—10% rozpuszczalnych białek bulwy ziemniaka wykazuje działanie antyproteolityczne (20, 24). Inhibitory ziemniaczane charakteryzuje olbrzymia heterogenność molekularna (25, 26). Obserwowano także duże różnice między inhibitorami izolowanymi z bulw różnych odmian ziemniaków. Dotyczą one liczby form molekularnych inhibitorów, ich zawartości oraz struktury chemicznej (20, 27). O ich pokrewieństwie świadczą jednak identyczne determinanty antygenowe (28, 29).

II-1. Inhibitory trypsyny i chymotrypsyny

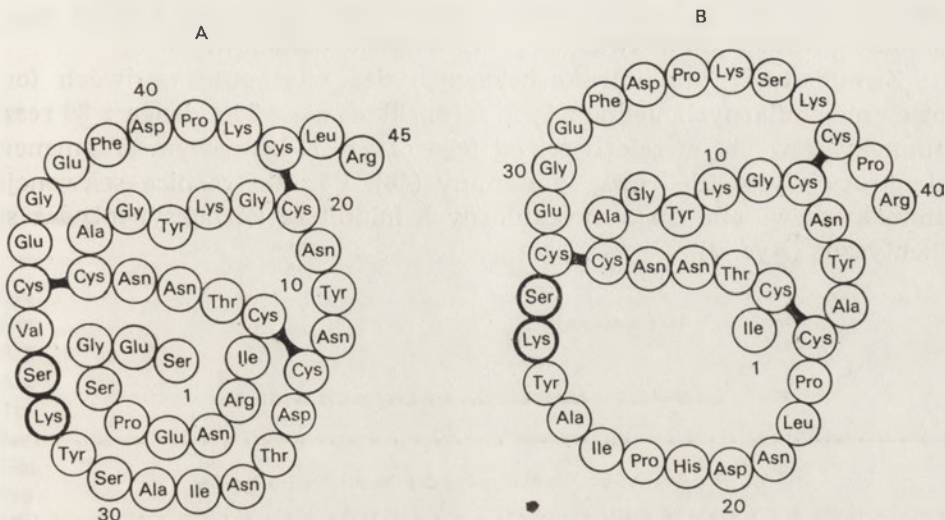
Z ekstraktu ziemniaka odmiany Maritta wyizolowano (30) cztery inhibitory trypsyny przy użyciu techniki: swoistej sorpcji na nierozpuszczalnej trypsynie, sączenia molekularnego na Sephadex G-75 oraz chromatografii jonowymiennej na karboksymetylocelulozie i fosfofelulozie. W centrum antytrypsynowym tych inhibitorów znajduje się arginina a ich masy cząsteczkowe wynoszą 23 500—24 000 daltonów. Inhibitory te hamują także aktywność chymotrypsyny, plazminy oraz kalikreiny osoczowej. Stosując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym stwierdzono

molekularne na Sephadex G-75. Tą drogą uzyskano preparat około 40-krotnie oczyszczony z wydajnością 47⁰%. Hamuje on również aktywność trypsyny. Wyizolowany inhibitor charakteryzuje się znaczną termostabilnością i nie traci aktywności w zakresie pH 2-10. Jego masa cząsteczkowa wynosi 39 000 daltonów. Jedna cząsteczka inhibitora wiąże cztery cząsteczki chymotrypsyny. Kompleks taki ma masę cząsteczkową około 140 000. W 4 M roztworze chlorowodoru guanidyny lub 8 M roztworze mocznika w środowisku kwaśnym inhibitor dysocjuje na cztery podjednostki, które oznaczono literami A, B, C i D. Podjednostki te rozdzielono na sulfoetylocelulozie w 8 M roztworze mocznika (pH 2,8). Ich masy cząsteczkowe wynoszą 9000—10 000 daltonów. Skład aminokwasowy i sekwencję aminokwasów w poszczególnych podjednostkach mało się różnią, wszystkie zaś mają kwas glutaminowy jako N-końcowy aminokwas (Ryc. 1).

Z ziemniaka odmiany Danshaku-Imo wyizolowano trzy inhibitory enzymów proteolitycznych, które oznaczono symbolami I, II-a i II-b (32, 33). Metoda oczyszczania inhibitora I (32) polega na wytrąceniu białek balastowych przez ogrzewanie ekstraktu ziemniaczanego w temperaturze 80°C, wysoleniu inhibitora po 30⁰% nasyceniu siarczanem amonu i zastosowaniu chromatografii kolumnowej. Masa cząsteczkowa inhibitora I wyliczona na podstawie składu aminokwasowego wynosi 9400 daltonów. Masa cząsteczkowa znaleziona za pomocą metody sączenia molekularnego na żelu Sephadex G-100 wynosiła jednak 19 300 daltonów, gdy elucję prowadzono 0,1 M kwasem octowym i 42 000 w przypadku elucji 0,9⁰% chlorkiem sodu (34). Wyniki te wskazują na skłonność inhibitora I do polimeryzacji. W roztworze 0,1 M kwasu octowego występuje on w formie dimeru, a w 0,9⁰% roztworze chlorku sodu w formie tetrameru. Ustalono skład aminokwasowy inhibitora I, jego aminokwasy N- i C-końcowe oraz strukturę antychymotrypsynowego miejsca reaktywnego, które tworzy Leu₅₆-Asx₅₇ (35).

Materiał wyjściowy do wyizolowania inhibitora II-a i II-b stanowił płyn pozostający po 30⁰% nasyceniu ekstraktu ziemniaczanego siarczanem amonu, z którego wysalano następnie oba inhibitory siarczanem amonu o 60⁰% nasyceniu (33). Inhibitor II-a oddzielano od inhibitora II-b na kolumnach karboksymetylocelulozy i dalej oczyszczano na żelu Sephadex G-100. Jednorodność uzyskanych preparatów inhibitorów potwierdzono przy zastosowaniu techniki elektroforezy w żelu skrobiowym przy pH 4,0 i 8,6. Uzyskane inhibitory są odporne na podwyższoną temperaturę i wykazują znaczną stabilność w środowisku kwaśnym. Punkt izoelektryczny inhibitora II-a wynosi 8,5 a inhibitora II-b 9,1. Masy cząsteczkowe obu inhibitorów są identyczne. Wyliczone na podstawie składu aminokwasowego wynoszą 10 300 daltonów, a oznaczone metodą sączenia molekularnego na żelu Sephadex G-100 — 10 600, gdy do elucji używano 0,1 M kwasu octowego, lub 20 700 w przypadku gdy do elucji używano 0,9⁰% roz-

twór chlorku sodu. Skład aminokwasowy obu inhibitorów jest podobny a ich N- i C-końcowe aminokwasy są identyczne (36). Centra reaktywne tych inhibitorów stanowi układ Lys-Ser (37, 38). Sekwencje aminokwasów fragmentów peptydowych zawierających te centra przedstawia rycina 2.



Ryc. 2. Sekwencja aminokwasów okolicy centrum reaktywnego ziemniaczanego inhibitora II-a (A) i II-b (B) (39).

Z ziemniaków odmiany Epoka otrzymano preparat wolny od lektyn, który zawiera mieszaninę inhibitorów proteaz (22, 40). Z tego preparatu wydzielono cztery jednorodnie frakcje tych inhibitorów (41, 42). Różnią się one szeregiem właściwości fizykochemicznych i specyficznością działania antyproteolitycznego.

II-2. Inhibitory kalikrein

Z ekstraktu ziemniaka odmiany Danshaku-Imo stosując frakcjonowanie siarczanem amonu i chromatografię na dwuetyloaminoetylocelulozie otrzymano preparat hamujący aktywność kalikrein (43). Z tego preparatu stosując technikę ogniskowania izoelektrycznego wyodrębniono następnie dwa jednorodne inhibitory kalikrein (44). Punkty izoelektryczne tych inhibitorów wynoszą 5,6 i 6,4 a ich masy cząsteczkowe 22 000—27 000 daltonów. Ustalono skład aminokwasowy omawianych inhibitorów i specyficzność działania w stosunku do kalikrein pochodzących z różnych tkanek oraz w stosunku do innych enzymów proteolitycznych (45).

X—Asn—Gly—Lys—Glu—Leu—Gln (27). Opisano także inhibitor ziemniaczany hamujący aktywność katepsyny A (10). Należy podkreślić, że inhibitory występujące w organach zapasowych żyta, jęczmienia, łubinu, kukurydzy, bobu, grochu, fasoli i soi nie hamują aktywności proteaz komórkowych (51).

Skład aminokwasowy, aminokwasy N- i C-końcowe i masy cząsteczkowe inhibitorów ziemniaczanych wyizolowanych z różnych odmian ziemniaków podane są w tabeli 1.

Tabela 1

Skład aminokwasowy ziemniaczanych inhibitorów proteaz

Aminokwas	Liczba reszt aminokwasowych w cząsteczce inhibitora*								
	I	II-a	II-b	CHT	KP	A ₅	4b	5b	KD
Lys	5	8	10	5	2	8	11	15	10
His	1	0	1	1	2	1	2	3	0
Arg	4	3	2	4	1	4	6	7	8
Asp	11	11	9	9	5	12	23	26	26
Thr	3	6	5	3	2	6	9	10	9
Ser	4	7	6	4	2	7	15	12	14
Glu	8	8	8	9	2—3	9	12	14	12
Pro	5	6	9	5	3	6	10	16	16
Gly	7	13	12	6	3	11	19	21	19
Ala	2	5	6	5	4	5	7	7	7
Cys	2	12	12	2	6	6	5	1	6
Val	9	2	1	8	1	2	14	20	16
Met	0	0	0	1	0	0	1	2	1
Ile	9	4	4	6	1	4	9	12	12
Leu	10	3	3	8	0	3	17	10	22
Tyr	1	6	6	1	1	6	6	8	8
Phe	3	3	3	2	1	4	9	10	12
Trp	1	0	0	—	2	0	1—2	1	1
Suma aminokwasów	85	97	97	79	38—39	94	176—177	205	189
Aminokwas N-końcowy	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	Arg	Arg	Arg	Glu
Aminokwas C-końcowy	Val	Ala	Ala	Ala	Gli	—	—	—	—
Masa cząsteczkowa	9400	10 350	10 350	38 000	3100	24 000	24 000	24 000	21 790
Piśmiennictwo	35	36	36	7	48	26	41	41	27

* — inhibitor: CHT — inhibitor I chymotrypsyny, KP — karboksypeptydaz, KD — katepsyny D.

W składzie aminokwasowym inhibitorów ziemniaczanych zwraca uwagę znaczna zawartość cysteiny. Tworzy ona w wielu miejscach łańcucha polipeptydowego mostki dwusiarczkowe, utrwalające strukturę przestrzenną cząsteczki. Tłumaczy to znaczną odporność inhibitorów ziemniaczanych

czanych na czynniki denaturujące, takie jak podwyższona temperatura, krańcowe wartości pH oraz stężone roztwory mocznika i chlorowodoru guanidyny (7, 40).

III. Specyficzność i mechanizm działania

Inhibitory ziemniaczane hamują aktywność wielu enzymów proteolitycznych. Interesujące jest zestawienie wyników badań wpływu inhibitorów ziemniaczanych na aktywność enzymów proteolitycznych różniących się strukturą miejsca wiążącego i miejsca katalitycznego.

Jak wynika z tabeli 2 inhibitory ziemniaczane hamują aktywność proteaz o hydrofilowym miejscu wiążącym substrat, takich jak trypsyna i plazmina, lecz nie wpływają na aktywność trombiny.

Aktywność chymotrypsyny i katepsyny D, które są enzymami o hydrofobowym miejscu wiążącym jest hamowana, ale aktywność pepsyny mimo, że enzym ten zawiera hydrofobowe miejsce wiążące nie zmienia się. Także nie wszystkie proteazy o poliwalencyjnych miejscach wiążących są inaktywowane przez inhibitory ziemniaczane. Subtilizyna i zasadowa proteaza izolowana z pleśni *Aspergillus flavus* są hamowane przez te inhibitory, natomiast aktywność papainy nie ulega zmianie w ich obecności.

Również struktura miejsca katalitycznego enzymów proteolitycznych nie przesądza o ich podatności na działanie inhibitorów. Inhibitory ziemniaczane hamują aktywność wielu proteaz o serynowym miejscu katalitycznym, ale nie wpływają na aktywność innych enzymów serynowych takich jak trombina. Obniżają aktywność katepsyny D, która posiada karboksylowe centrum aktywne, ale nie hamują aktywności pepsyny, enzymu o identycznej strukturze centrum aktywnego. Podobnie inhibitory te hamują aktywność niektórych metaloproteaz (karboksypeptydaza A i B), podczas gdy nie hamują innych metaloproteaz jak kolagenaza.

Powyższe fakty wskazują, że w interakcji enzymu z inhibitorem, obok warunku absolutnego jakim jest struktura miejsca wiążącego i katalitycznego enzymu, istotnym czynnikiem jest konformacja przestrzenna ich najbliższej okolicy, decydująca o dostępności inhibitora (9).

Heterogenność molekularna inhibitorów ziemniaczanych zawierających miejsca reaktywne o różnej strukturze i to nie tylko w różnych cząsteczkach, lecz i w poszczególnych cząsteczkach (co czyni ją poliwalencyjną) sprawia, że możliwe jest hamowanie aktywności enzymów proteolitycznych o różnej strukturze miejsca wiążącego i katalitycznego (41, 53, 54, 55).

Specyficzność ziemniaczanych inhibitorów endoproteaz wynika ze struktury ich centrum reaktywnego i uwarunkowana jest konformacją przestrzenną. W centrum reaktywnym inhibitora znajduje się wiązanie

Tabela 2

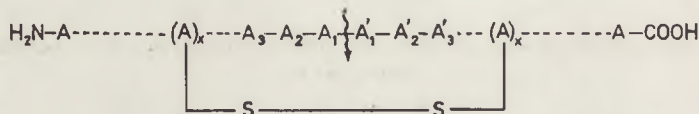
Specyficzność działania antyproteolitycznego inhibitorów izolowanych z bulw ziemniaka odmiany Epoka (9, 52)

Enzym	Miejsce wiążące	Miejsce katalityczne	Substrat, pH pomiaru	Preparat surowy	Inhibitor			
					4a	4b	5a	5b
1. Chymotrypsyna	H	Ser	Kazeina, pH 7,6	+	+	+	+	+
2. Elastaza	H	Ser	Elastyna, pH 8,0	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
3. Karboksypeptydaza A	H	Me	N—Bz—Gly— —L-Phe, pH 7,5	+	—	—	—	—
4. Karboksypeptydaza B	HL	Me	N—Bz—Gly— —L-Arg, pH 8,0	+	—	—	+	—
5. Katepsyna A	H	Ser?	N—Kbz—L— —Glu—L—Tyr, pH 5,0	+	—	+	—	+
6. Katepsyna B ₁	HL	SH	p-NA—N— —Bz—D, L— —Arg, pH 6,0	—	—	—	—	—
7. Katepsyna C	H	SH	p-NA—Gly— —L-Phe, pH 7,0	—	—	—	—	—
8. Katepsyna D	H	COOH	Hemoglobina, pH 4,0	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
9. Kolagenaza bakteryjna	H	Me	Kolagen latoryczny, pH 7,0	—	—	—	—	—
10. Kwaśna proteaza ziemniaczana	?	?	Kazeina, pH 4,5	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
11. Papaina	P	SH	Kazeina, pH 8,0	—	—	—	—	—
12. Pepsyna	H	COOH	Hemoglobina, pH 2,0	—	—	—	—	—
13. Plazmina	HL	Ser	Kazeina, fibryna, euglobuliny, pH 7,6	+	+	+	+	+
14. Pronaza	P	Ser	Kazeina, pH 7,6	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
15. Subtilizyna	P	Ser	Kazeina, pH 8,0	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
16. Trombina	HL	Ser	Fibrynogen, osocze, pH 7,2	—	—	—	—	—
17. Trypsyna	HL	Ser	Kazeina, pH 7,6	+	+	+	+	+
18. Zasadowa proteaza z pleśni <i>A. flavus</i>	P	Ser	Hemoglobina, pH 7,0	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Miejsce wiążące: H — hydrofobowe, HL — hydrofilowe, P — poliwalencyjne; miejsce katalityczne: Ser — serynowe Me — zawierające kation metalu, SH — sulfhydrylowe, COOH — karboksylowe; hamowanie: „+” — występuje, „—” — nie występuje, n.b. — nie badano, Bz — benzoilo, Kbz — karbobenzoksy, NA — nitroanilid.

peptydowe wrażliwe na działanie określonego enzymu. Schemat centrum reaktywnego takich inhibitorów przedstawiono na rycinie 4.

Aminokwas A₁ posiada szczególne znaczenie w budowie tego centrum, bo



Ryc. 4. Struktura centrum reaktywnego ziemniaczanych inhibitorów endoproteaz, zmodyfikowane (56).

warunkuje specyficzność działania antyproteolitycznego. W centrum reaktywnym inhibitorów trypsyny tym aminokwasem jest lizyna lub arginina a inhibitorów chymotrypsyny leucyna (Tabela 3).

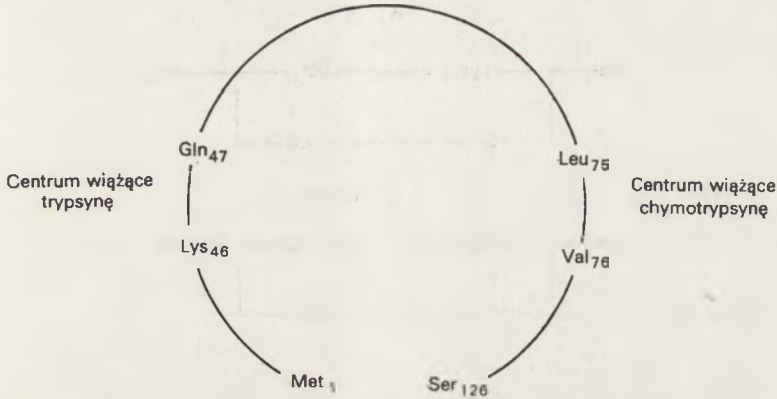
Do identyfikacji aminokwasów tworzących centrum reaktywne inhibitorów ziemniaczanych stosuje się metody enzymatyczne oraz selektywne chemicznie modyfikacje grup funkcyjnych poszczególnych aminokwasów (16, 57, 58, 60). Przeglądu tych metod dokonała ostatnio Muszyńska (59). W metodach enzymatycznych używa się katalityczne ilości enzymu w środowisku kwaśnym. W takich warunkach wiązanie peptydowe $\text{A}_1-\text{A}'_1$ — centrum reaktywnego ulega wybiórczej hydrolizie, w wyniku czego powstaje zmodyfikowana cząsteczka inhibitora z nową wolną grupą karboksylową i aminową. Fragmenty zmodyfikowanego inhibitora łączy mostek

Tabela 3

Struktura centrum reaktywnego ziemniaczanych inhibitorów proteaz

Inhibitor ziemniaczany	Centrum reaktywne	Struktura centrum reaktywnego	Pozycja piśmiennictwa
I	antychymotrypsynowe	—Leu ₅₆ — —Asx ₅₇ —	35
II-a	antytrypsynowe	—Lys ₆₃ — —Ser ₆₄ —	37
II-b proteaz serynowych	antytrypsynowe	—Lys—Ser—	38
	antytrypsynowe	—Lys ₄₆ — —Gln ₄₇ —	57
poliwalencyjny	antychymotrypsynowe	—Leu ₇₅ — —Val ₇₆ —	58
	antytrypsynowe	—Arg—X—	30

dwusiarczkowy, którego obecność warunkuje działanie antyproteolityczne. Redukcja i karboksymetylacja mostka dwusiarczkowego zmodyfikowanego inhibitora powoduje rozerwanie cząsteczki na dwa fragmenty, co unieczynnia inhibitor. Odszczepienie od zmodyfikowanego antytrypsynowego centrum reaktywnego C-końcowej lizyny, za pomocą karboksypeptydazy B lub od zmodyfikowanego antychymotrypsynowego centrum reaktywnego C-końcowej leucyny, za pomocą karboksypeptydazy A, unie-



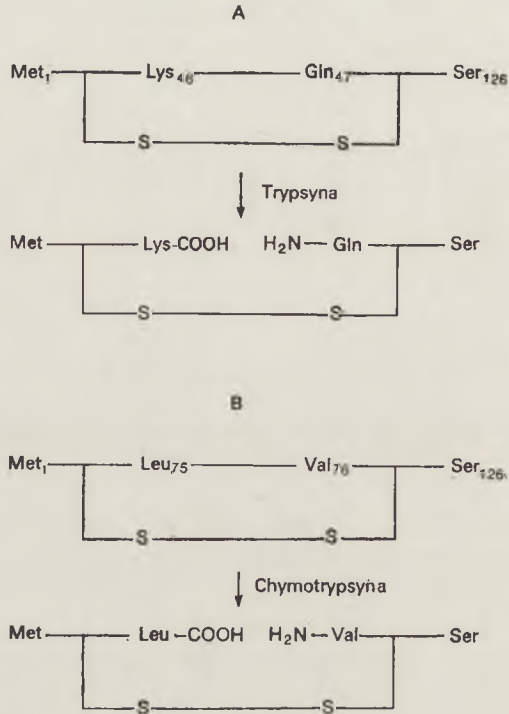
Ryc. 5. Schemat struktury cząsteczki ziemniaczanego inhibitora proteaz serynowych (55).

czynnia inhibitor (57, 58). Model struktury inhibitora ziemniaczanego zawierającego antytrypsynowe i antychymotrypsynowe centrum reaktywne przedstawia rycina 5.

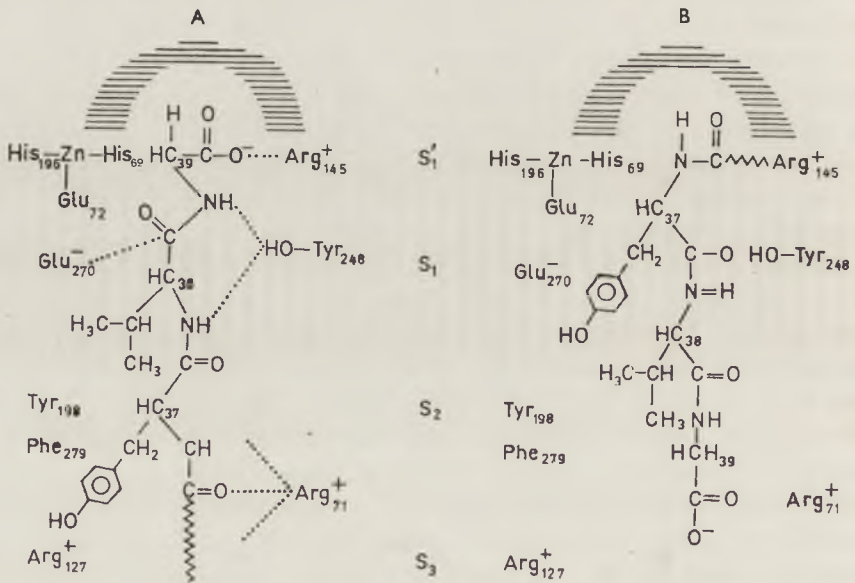
Antytrypsynowe centrum reaktywne występuje w N-końcowej, a antychymotrypsynowe centrum reaktywne w C-końcowej części cząsteczki inhibitora. Można przypuszczać, że znaczne oddalenie w strukturze pierwszorzędowej tych dwóch centrów umożliwia utrzymanie odpowiedniej odległości między nimi w strukturze przestrzennej, dzięki czemu inhibitor może reagować równocześnie z dwoma cząsteczkami enzymów o różnej specyficzności.

Działanie inhibitorów endoproteaz polega na łączeniu się enzymu z inhibitorem i rozszczepieniu specyficznego wiązania peptydowego znajdującego się w centrum reaktywnym inhibitora (58, 60). Następnie tworzy się konwalencyjne wiązanie estrowe przez nowopowstałą grupę karboksylową centrum reaktywnego inhibitora i przez grupę hydroksylową seryny, która znajduje się w miejscu katalitycznym enzymu. Ze względu na lokalizację centrum reaktywnego inhibitora w pobliżu mostka dwusiarczkowego, deacylacja jest utrudniona i enzym zostaje trwale związany z inhibitorem. Mechanizm działania antytrypsynowego i antychymotrypsynowego ziemniaczanego inhibitora proteaz serynowych podano na rycina 6.

Mechanizm hamowania aktywności egzoproteaz przez inhibitor ziemniaczany jest odmienny od przedstawionego dla inhibitorów endoproteaz. Rycina 7 przedstawia dwa możliwe sposoby interakcji inhibitora ziemniaczanego z karboksypeptydazą A. Według jednego z nich inhibitor wiąże się poprzez wiązanie jonowe, utworzone przez grupę karboksylową Gly₃₉ z grupą guanidynową Arg₁₄₅ enzymu oraz poprzez wiązanie hydrofobowe utworzonym przez Tyr₃₇ z Tyr₁₉₈ lub Phe₂₇₉ enzymu (Ryc. 7A). Taki sposób wiązania inhibitora przypomina wiązanie substratu przez karbo-



Ryc. 6. Centrum reaktywne antytrypsynowe (A) i antychymotrypsynowe (B) inhibitora ziemniaczanego (57, 58).



Ryc. 7. Proponowane mechanizmy interakcji inhibitora ziemniaczanego z karboksypeptydazą A, (16).

S'₁, S₁, S₂, S₃ – miejsce wiążące enzym. Dokładne objaśnienia w tekście.

ksypeptydazę. Karboksypeptydaza A odszczepia jednak od substratów tylko C-końcowe aminokwasy hydrofobowe. Nie może więc odłączyć C-końcowej Gly₃₉ inhibitora, co potwierdzono eksperymentalnie (16) i tym samym zostaje zablokowana. Drugi, bardziej prawdopodobny sposób wiązania inhibitora może polegać na interakcji jonowej karboksylowej grupy Gly₃₉ cząsteczki inhibitora z grupą guanidynową Arg₁₂₇ enzymu i interakcji hydrofobowej Val₃₈ i Tyr₃₇ inhibitora z Tyr₁₉₈ i Phe₂₇₉ enzymu (Ryc. 7B). Wiązanie peptydowe C-końcowej reszty Gly₃₉ inhibitora jest w tej sytuacji odległe od miejsca katalitycznego enzymu. Miejsce to zajmuje inne wiązanie peptydowe. Proces katalityczny nie może więc przebiegać i enzym nie może uwolnić się z kompleksu z inhibitorem.

Mechanizm działania peptydowych inhibitorów enzymów proteolitycznych dyskutowano szczegółowo w pracy Rzeszotarskiej i Wiejaka (61) oraz przez innych autorów (62, 63).

IV. Znaczenie biologiczne

Inhibitory ziemniaczane spełniają istotną rolę w regulacji procesów degradacji białek zapasowych bulwy ziemniaczanej w różnych fazach jej rozwoju (64—67). Pojawiają się one już w bardzo wczesnym okresie rozwoju bulwy, w którym biosynteza białek zapasowych jest intensywna. Wysoka zawartość tych inhibitorów utrzymuje się również w okresie spoczynku bulwy. Inhibitory te hamują endogenną aktywność proteolityczną i chronią białka zapasowe przed rozpadem. W okresie kiełkowania inhibitory ulegają degradacji i inaktywacji, co powoduje uwolnienie proteaz z nieaktywnego kompleksu i degradację białek zapasowych do aminokwasów, które są niezbędne dla rozwijającej się rośliny.

Rola biologiczna inhibitorów nie ogranicza się do regulacji proteolizy w bulwie ziemniaczanej. Istnieje wiele danych eksperymentalnych wskazujących, że uczestniczą one również w mechanizmach obronnych chroniących roślinę przed urazami, szkodnikami i drobnoustrojami. Stwierdzono, że uszkodzenie mechaniczne liścia ziemniaka, lub uszkodzenie spowodowane przez owady powoduje gwałtowny wzrost zawartości inhibitorów proteaz w całej roślinie (68—70). Zwiększenie się zawartości inhibitorów w tych przypadkach spowodowane jest aktywacją czynnika indukującego syntezę inhibitorów proteaz (*proteinase inhibitor-inducing factor* — PIIF) (71, 72). Struktura chemiczna PIIF jest dotychczas nieznaną. PIIF przemieszcza się z miejsca uszkodzenia po całej roślinie i odpowiedzią tkanek na ten czynnik jest synteza *de novo* inhibitorów proteaz.

Hamowanie przez inhibitory ziemniaczane aktywności egzogennych proteaz wytwarzanych przez drobnoustroje (8, 14, 34, 45, 73) zabezpiecza zapewne bulwy ziemniaka przed atakiem bakterii i pleśni w czasie wielomiesięcznego składowania (65, 72).

V. Inhibitory ziemniaczane a metabolizm białkowy u zwierząt

Wielu autorów zwraca uwagę na znaczenie jakie mogą mieć roślinne inhibitory proteaz w trawieniu białek w przewodzie pokarmowym zwierząt i człowieka (52, 74—77). Spośród roślin zawierających inhibitory proteaz największy ilościowo udział w żywnieniu przypada ziemniakom (79—81). Inhibitory ziemniaczane hamują nie tylko aktywność wszystkich proteaz trzustkowych, ale także aktywację ich proenzymów (78). Pepsyna nawet w ciągu wielogodzinnej inkubacji nie degradowuje i nie inaktywuje inhibitorów ziemniaczanych. Ich wysoka termostabilność powoduje, że są one tylko częściowo inaktywowane w czasie przygotowania ziemniaków do spożycia (7, 82). Wydawało się więc prawdopodobnym, że po przejściu z pokarmem do dwunastnicy, mogą hamować aktywację proenzymów trzustkowych oraz wiązać pewną ilość czynnych proteaz, przez co z kolei mogłyby upośledzać trawienie białek. Badania polegające na podaniu inhibitorów ziemniaczanych szczurom karmionych uprzednio pokarmem bogatym w białko nie potwierdzają jednak tego przypuszczenia (82). Zwiększa się wprawdzie wówczas nieznacznie ilość wydalanego azotu, ale równocześnie stwierdzono wzrost aktywności proteolitycznej kału. Przypuszczalnie na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego, pobudzana jest czynność wydzielnicza trzustki (83). Być może, że w przypadkach niewydolności trzustki inhibitory ziemniaczane mogą upośledzać trawienie białek (84, 85). Również w wielu innych stanach patologicznych, w których ma miejsce zaburzenie trawienia białek, obecność inhibitorów proteaz w diecie może działać niekorzystnie. Do takich stanów patologicznych należy zespół poresekcyjny, schorzenia jelita cienkiego oraz niedostateczne wydzielanie pepsyny i kwasu solnego.

Inhibitory ziemniaczane wywierają hamujący wpływ na niektóre czynniki układu krzepnięcia krwi i fibrynolizy. Otrzymanie ziemniaczanych inhibitorów proteaz całkowicie oddzielonych od hemoaglutynin pozwoliło na przeprowadzenie badań nad wpływem tych inhibitorów na krzepnięcie krwi i fibrynolizę (86). Efektem podania inhibitorów ziemniaczanych do krążenia było przedłużenie czasu krzepnięcia krwi, upośledzenie zużycia protrombiny, upośledzenie retrakcji skrzepu i zahamowanie aktywności układu fibrynolitycznego. Stwierdzono, że inhibitory ziemniaczane utrzymują się we krwi około 60 minut, co upodabnia je w tym względzie do trasylołu (86).

Antykoagulacyjne działanie ziemniaczanych inhibitorów narasta w czasie i polega na hamowaniu powstawania tromboplastyny osoczowej (87). Inhibitory ziemniaczane wykazują działanie antyfibrynolityczne zarówno w układach oczyszczonych jak i we frakcji euglobulinowej osocza, hamują także fibrynogenolizę jak i fibrynolizę skrzepów fibrynowych. Nie hamują one jednak aktywacji plazminogenu przez urokinazę i strep-

tokinazę (40). Stwierdzono, że inhibitory ziemniaczane i syntetyczny inhibitor fibrynolizy, jakim jest kwas E-aminokapronowy, działają synergistycznie (88). Wynika to najprawdopodobniej z różnych mechanizmów działania tych inhibitorów i braku współzawodnictwa o akceptory ze strony enzymu. Pierwsze z nich wiążą się z centrum katalitycznym plazminy przez co hamują zarówno jej działanie fibrynolityczne jak i proteolityczne. Kwas ϵ -aminokapronowy blokuje natomiast jedynie specyficzne miejsce wiążące fibrynę w tym enzymie, działa więc jedynie antyfibrynolitycznie (89).

Na szczególne podkreślenie zasługuje hamowanie przez inhibitory ziemniaczane aktywności katepsyny A i D (90), co umożliwia podjęcie badań nad rolą tych enzymów w degradacji białek (18).

Szeroki zakres działania antyproteolitycznego preparatów zawierających mieszaninę ziemniaczanych inhibitorów proteaz czyni je przydatnymi w terapii schorzeń, w których patogenezie odgrywa istotną rolę wzmożona aktywność enzymów proteolitycznych (91, 92). W ogniskach zapalnych występują bowiem enzymy proteolityczne o różnej podatności na inhibitory i tylko zastosowanie preparatów o szerokim zakresie działania może być skuteczne.

Zaakceptowano 30.11.1978

PIŚMIENNICTWO

1. Werle E., Maier L., Löffler F., (1951), *Biochem. Z.*, **321**, 372—376.
2. Sohonie K., Ambe K. S., (1955), *Nature*, **176**, 972—973.
3. Mansfeld V., Hladovec J., Horáková Z., (1960), Czechoslov. Patent, No. 90225.
4. Kinugasa S., Yoshikawa M. (1967), *Chem. Abstr.*, **67**, No. 79159y.
5. Ryan C. A., (1966), *Biochemistry*, **5**, 1592—1596.
6. Melville J. C., Ryan C. A., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 700—702.
7. Melville J. C., Ryan C. A., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3445—3453.
8. Hojima Y., Moriya H., Moriwaki Ch., (1971), *J. Biochem.*, **69**, 1027—1032.
9. Worowski K., (1978), *Acta Polon. Pharm.*, (w druku).
10. Worowski K., (1975), *Experientia*, **31**, 637—638.
11. Keilová H., Tomašek V., (1976), *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **41**, 489—497.
12. Hladovec J., Horáková Z., Mansfeld V., (1960), *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **128**, 343—354.
13. Hladovec J., Horáková Z., Mansfeld V., (1961), *Arzneim. Forsch.*, **11**, 102—104.
14. Teisseyre E., Latallo Z. S., Kopeć M., (1974), *Folia Haematol.*, **101**, 99—110.
15. Ager S. P., Hass G. M., (1977), *Anal. Biochem.*, **83**, 285—295.
16. Ako H., Hass G. M., Grahn D. T., Neurath H., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2573.

17. Hass G. M., Ako H., Grahn D. T., Neurath H., (1976), *Biochemistry*, **15**, 93—100.
18. Skrzydlewski Z., Worowski K., (1978), *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, (w druku).
19. Worowski K., (1974), *Bromat. Chem. Toksykol.*, **7**, 223—231.
20. Ryan C. A., Kuo T., Pearce G., Kunkel R., (1976), *Am. Potato J.*, **53**, 443—455.
21. Worowski K., Mariak R., (1973), *Acta Polon. Pharm.*, **30**, 453—457.
22. Worowski K., Szmitkowski M., (1972), *Rocz. Technol. Chem. Zyw.*, **12**, 261—270.
23. Ryan C. A., Huisman O. C., (1967), *Nature*, **214**, 1047—1049.
24. Ryan C. A., Huisman O. C., Van Denbrugh R. W., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 589—596.
25. Worowski K., Bańkowski E., Szmitkowski M., (1970), *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, **18**, 739—741.
26. Belitz H. D., Kaiser K. P., Santarius K., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 420—427.
27. Rupova L., Keilová H., Tomašek V., (1977), *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **42**, 2279—2286.
28. Ryan C. A., Santarius K., (1976), *Plant Physiol.*, **58**, 683—685.
29. Hass G. M., Venkatakrishman R., Ryan C. A., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**, 1941—1944.
30. Hochstrasser K., Werle E., Siegelman R., Schwartz S., (1969), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 897—902.
31. Richardson M., Cossins L., (1974), *FEBS Letters*, **45**, 11—13.
32. Kiyohara T., Iwasaki T., Yoshikawa J., (1971), *Sci. Rept. Fac. Agr. Kobe Univ.*, **10**, 115—124.
33. Iwasaki T., Kiyohara T., Yoshikawa M., (1971), *J. Biochem.*, **70**, 817—826.
34. Kiyohara T., Iwasaki T., Yoshikawa M., (1973), *J. Biochem.*, **73**, 89—95.
35. Kiyohara T., Fujii M., Iwasaki T., Yoshikawa M., (1973), *J. Biochem.*, **74**, 675—682.
36. Iwasaki T., Kiyohara T., Yoshikawa M., (1972), *J. Biochem.*, **72**, 1029—1035.
37. Iwasaki T., Kiyohara T., Yoshikawa M., (1973), *J. Biochem.*, **73**, 1039—1048.
38. Iwasaki T., Kiyohara T., Yoshikawa M., (1973), *J. Biochem.*, **74**, 335—340.
39. Iwasaki T., Wada J., Kiyohara T., Yoshikawa M., (1977), *J. Biochem.*, **82**, 991—1004.
40. Worowski K., (1974), *Thrombos. Diathes. Haemorrhag.*, **32**, 617—632.
41. Worowski K., Turková J., Mikeš O., (1977), *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **42**, 750—758.
42. Worowski K., (1973), *Zjazd Naukowy Pol. Tow. Chem., Lublin, Streszczenie komunikatów*, 46—47.
43. Hojima Y., Moriya H., Moriwaki Ch., (1971), *J. Biochem.*, **69**, 1019—1025.
44. Hojima Y., Moriwaki C., Moriya H., (1973), *J. Biochem.*, **73**, 923—932.
45. Hojima Y., Moriwaki C., Moriya H., (1973), *J. Biochem.*, **73**, 933—943.
46. Rancour J. M., Ryan C. A., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 380—383.
47. Ryan C. A., Hass G. M., Kuhn R. W., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 5495—5499.

48. Hass G. M., Nau H., Biemann K., Grahn D. T., Ericsson L. H., Neurath H., (1975), *Biochemistry*, **14**, 1334—1342.
49. Werle E., Appel W., Happ E., (1959), *Z. Vit. Hormon. Fermentforsch.*, **10**, 127—138.
50. Worowski K., (1977), XV Zjazd Pol. Tow. Biochem., Gdańsk, Streszczenia, 245.
51. Worowski K., Farbiszewski R., Bartoszyński P., (1975), *Bromat. Chem. Toksykol.*, **8**, 429—437.
52. Worowski K., (1975), *Bromat. Chem. Toksykol.*, **8**, 199—200.
53. Keilová H., Tomašek V., (1976), *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **41**, 2440—2447.
54. Ryan C. A., (1971), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1265—1270.
55. Valueva T. A., Zimaczeva A. V., Mosolov V. V., (1977), *Dokl. Ak. Nauk. SSSR*, **237**, 1513—1515.
56. Schechter J., Berger A., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 157—162.
57. Valueva T. A., Mosolov V. V., (1976), *Biogran. Chimija*, **2**, 1389—1393.
58. Valueva T. A., Zimatcheva A. V., Mosolov V. V., (1977), *Bioorgan. Chimija*, **3**, 1273—1279.
59. Muszyńska G., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 347—371.
60. Iwasaki T., Kiyohara T., Yoshikawa M., (1974), *J. Biochem.*, **75**, 843—851.
61. Rzeszotarska B., Wiejak S., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 123—142.
62. Sawaryn A., (1969), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **23**, 787—804.
63. Wilmowska-Pelc A., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 85—93.
64. Ryan C. A., Shumway L. K., (1971), *Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors*, str. 175—188; Walter de Grayter, Berlin, New York.
65. Ryan C. A., (1973), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **24**, 173—196.
66. Nowak A., Skwiercz A., (1975), *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, **23**, 129—133.
67. Nowak J., Szaciłło T., (1976), *Zesz. Nauk. Ak. Rol.-Tech. Olszt.*, Nr 18, 69—80.
68. Ryan C. A., (1968), *Plant. Physiol.*, **43**, 1880—1881.
69. Ryan C. A., (1968), *Plant. Physiol.*, **43**, 1859—1865.
70. Ryan C. A., Huisman W., (1970), *Plant Physiol.*, **45**, 484—489.
71. Wong P. P., Kuo T., Ryan C. A., Kado C. J., (1976), *Plant. Physiol.*, **57**, 214—217.
72. Green T. R., Ryan C. A., (1972), *Science*, **175**, 776—777.
73. Fukamoto J., Tsuru D., Yamamoto T., (1967), *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 710—717.
74. Janicki J., Warchalewski J., Skupin J., Kowalczyk J., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 101—118.
75. Green G. M., Lyman R. L., (1972), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **140**, 6—12.
76. Melmed R. N., El-Aaser A. A. A., Holt S. J., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **421**, 280—288.
77. Yen J. T., Jensen A. H., Simon J., (1977), *J. Nutr.*, **107**, 156—164.
78. Worowski K., Gabryelewicz A., Roszkowska W., Bajko K., (1978), *Acta Hepato-gastroenterologica*, (w druku).
79. Szkiłładziowa W., (1964), *Rocz. Państw. Zakł. Hig.*, **15**, 201—211.
80. Starzyński W., (1969), *Przem. Ferm. Rol.*, **12**, 28—34.
81. Zalewski W., (1977), *Żywnienie człowieka*, **4**, 39—45.
82. Worowski K., Farbiszewski R., (1973), *Acta Physiol. Polon.*, **24**, 361—370.

83. Bajko K., Szalaj W., Gabryelewicz A., Musiatowicz B., Worowski K., (1978), *Acta Physiol. Polon.*, (w druku).
84. Halawa B., Świdarska T., (1969), *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **42**, 879—883.
85. Hasik J., (1972), *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **49**, 551—558.
86. Worowski K., Głowiński S., (1976), *Haematologia*, **10**, 331—337.
87. Worowski K., (1975), *Thrombos. Diathes. Haemostas.*, **34**, 763—769.
88. Worowski K., (1976), *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, **27**, 125—128.
89. Łukasiewicz H., Niewiarowski S., Worowski K., Lipiński B., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 503—508.
90. Worowski K., (1976), *Post. Biol. Kom.*, **3**, 51—74.
91. Mansfeld V., Rybak M., Horáková Z., Hladovec J., (1960), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **318**, 6—11.
92. Hojima Y., Moriya H., Moriwaki C., Tajima T., (1972), *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1312—1320.

Peter Mitchell laureatem nagrody Nobla.

Teoria chemiosmotyczna

Nagrodę Nobla z chemii za rok 1978 otrzymał 58-letni biochemik brytyjski, Peter Mitchell, za teorię tłumaczącą podstawy przemian energetycznych w oksydacyjnej fosforylacji i fotofosforylacji.

Oksydacyjna fosforylacja, czyli synteza ATP sprzężona z utlenianiem, została odkryta już w latach trzydziestych obecnego stulecia (H. Kalckar, V. A. Belicer i E. T. Cibakova, S. Ochoa). Wykazanie w dziesięć lat później, że zachodzi ona w mitochondriach, dało nowy impuls badaniom nad tym procesem. Dla wytłumaczenia molekularnego mechanizmu sprzężenia utleniania z syntezą ATP F. Lipmann zaproponował pierwszy hipotezę przyjmującą istnienie substancji pośredniczących pomiędzy obiema reakcjami. Koncepcja ta, rozwinięta następnie przez B. Chance'a, A. L. Lehningera i E. C. Slatera, doprowadziła do sformułowania tak zwanej hipotezy chemicznego sprzężenia. Zakłada ona, że w utlenianiu komórkowym swobodna energia reakcji zostaje zachowana w formie chemicznych związków wysokoenergetycznych, które następnie biorą udział w syntezie ATP. Zapoczątkowało to liczne poszukiwania wysokoenergetycznych pośredników oksydacyjnej fosforylacji. Pojawiały się nawet doniesienia o natrafieniu na takie produkty pośrednie. Bliższa analiza tych badań wykazywała jednak, że chodziło tu albo o pomyłki doświadczalne albo o błędy w interpretacji wyników. Historia notuje też jedno lub dwa mniej lub bardziej świadome oszustwa naukowe na tym polu. W rezultacie nie dostarczono do chwili obecnej żadnych przekonujących dowodów doświadczalnych o istnieniu tego rodzaju wysokoenergetycznych produktów pośrednich oksydacyjnej fosforylacji.

W 1961 r. mało znany wówczas biochemik brytyjski, Peter Mitchell, ogłosił swój pierwszy artykuł (1) wysuwający hipotezę, że energia utleniania gromadzona zostaje nie jako wysokoenergetyczny związek chemiczny, lecz pod postacią potencjału elektrochemicznego błony mitochondrialnej. Mitchell oparł się przy tym na dwóch znanych już wówczas faktach, a mianowicie: znacznej nieprzepuszczalności wewnętrznnej błony mitochondrialnej wobec protonów (a także innych nieorganicznych kationów jednowartościowych) oraz obserwacji, że oddychające izolowane mitochondria powodują wzrost stężenia jonów wodorowych w środowisku zewnętrznym. Inne dane doświadczalne wskazywały, że w przestrzeni wewnątrzmitochondrialnej dochodziło równocześnie do alkalizacji (wzrostu stężenia jonów OH^-). Mitchell wysunął tezę, że wytworzenie gradientu pH po obu stronach wewnętrznnej błony mitochondrialnej jest pierwotnym efektem funkcjonowania łańcucha oddechowego a nie wynikiem transportu jonów na koszt wysokoenergetycznego chemicznego pośrednika oksydacyjnej fosforylacji, jak twierdzili zwolennicy teorii chemicznego sprzężenia. Według Mitchella istnienie chemicznego pośrednika nie jest potrzebne, gdyż funkcję tę spełnia gradient elektrochemiczny na błonie mitochondrialnej.

Jak wiadomo, procesy oksydoredukcyjne w mitochondriach polegają na przeniesieniu pomiędzy poszczególnymi enzymami lub koenzymami łańcucha oddecho-

wego bądź całych atomów wodoru, bądź tylko elektronów. Tam, gdzie oksydoredukcja „wodorowa” zamienia się na „elektronową”, następuje uwolnienie jonów H^+ . Zgodnie z hipotezą Mitchella, jony te wydzielane są na zewnątrz błony mitochondrialnej. Natomiast proces odwrotny, przejście oksydoredukcji „elektronowej” w „wodorową”, prowadzący do pobrania jonów H^+ , czerpać je ma z wnętrza mitochondriów. Tak więc postulowana anizotropia funkcjonalna łańcucha oddechowego musiałaby doprowadzić do powstania gradientu stężeń jonów wodorowych i wodorotlenowych po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej. Ten właśnie gradient stanowi według Mitchella o stanie energetycznym mitochondrionu i jest źródłem energii dla syntezy ATP a także innych zależnych od energii procesów mitochondrialnych, np. transportu jonów i metabolitów. W odróżnieniu od teorii chemicznego sprzężenia hipoteza Mitchella zyskała sobie miano teorii chemiosmotycznej (czyli chemiczno-osmotycznej).

Rozporządzamy obecnie bogatym materiałem doświadczalnym wskazującym, że na wewnętrznej błonie mitochondrialnej rzeczywiście istnieje znaczny potencjał elektrochemiczny. Wiemy również, że zniesienie tego potencjału bądź przez mechaniczne przerwanie ciągłości błony, bądź przez substancje zwiększające przepuszczalność błony wobec protonów prowadzi do zniesienia zdolności mitochondriów do syntetyzowania ATP, czyli powoduje tak zwane rozprzężenie oksydacyjnej fosforylacji. Sama synteza ATP prowadzi również do spadku potencjału transmembranowego. W tym jednak przypadku energia elektrochemiczna zamieniona zostaje na energię chemiczną wiązania pirofosforanowego w cząsteczce ATP. Jest to zresztą reakcja odwracalna. Hydroliza ATP przez mitochondria buduje potencjał transmembranowy. Wieloletnie badania E. Rackera, a następnie P. L. Pedersena, E. A. Seniora i L. Ernstera wykazały, że wewnętrzna błona mitochondrialna zawiera kompleks enzymatyczny, który w warunkach wysokoenergetycznego stanu błony prowadzi syntezę ATP, natomiast w stanie niskoenergetycznym, a więc przy braku potencjału transmembranowego, hydrolizuje ATP, czyli działa jako ATP-aza. Badania ostatnich lat wykazują, że jedna z podjednostek tego właśnie kompleksu ma właściwości kanału protonowego w błonie mitochondrialnej i przy hydrolizie ATP powoduje wyrzucanie protonów na zewnątrz. Natomiast w przypadku istnienia wysokiego gradientu stężeń jonów H^+ , wytworzonego przez funkcjonujący łańcuch oddechowy, przepływ protonów przez ten kanał ze strony zewnętrznej do wnętrza mitochondrionu, czyli zgodnie z gradientem stężeń, daje odwrócenie hydrolizy, a więc syntezę ATP.

Pięknych dowodów na poparcie teorii chemiosmotycznej dostarczyły badania nad rekonstrukcją wewnętrznej błony mitochondrialnej, prowadzone głównie przez E. Rackera i V. P. Skulacheva. Polegały one na włączeniu do pęcherzyków lipidowo-białkowych (proteoliposomów) izolowanych enzymów mitochondrialnych lub całych kompleksów enzymatycznych. Gdy włączono na przykład oksydazę cytochromową, udawało się uzyskać gradient protonów między wnętrzem liposomów a środowiskiem zewnętrznym wtedy, gdy liposomy, a ściślej mówiąc zawarta w nich oksydaza cytochromowa utleniała dodany zredukowany cytochrom c. Jeśli ponadto włączono do pęcherzyków kompleks mitochondrialnej ATP-azy, wówczas kosztem gradientu pH zachodziła dająca się zmierzyć synteza ATP.

Znakomitą zaletą teorii chemiosmotycznej jest to, że opisuje ona w jednolity sposób zarówno oksydacyjną fosforylację w mitochondriach eukariontów, procesy „konserwacji” energii u bakterii, jak wreszcie fotofosforylację w chloroplastach roślin zielonych. W tych ostatnich pochłonięcie kwantu światła przez chlorofil powoduje, jak wiadomo, podniesienie elektronu na wysoce ujemny potencjał oksydoredukcyjny, po czym następuje powrót elektronu do stanu wyjściowego przez chloroplastowy łańcuch oddechowy. W rezultacie więc i tu mamy transport elektronów, co — podobnie jak w mitochondriach — powoduje powstanie gradientu pH po obu stronach błony

chloroplastu. A zatem i w tym przypadku synteza ATP zachodzi według Mitchella kosztem potencjału elektrochemicznego. Przy użyciu chloroplastów udało się A. T. Jagendorfowi wykonać niezwykle efektowne doświadczenie potwierdzające teorię chemiosmotyczną. Wykazał on mianowicie, że sztucznie wytworzony gradient pH na skutek umieszczenia izolowanych chloroplastów w lekko kwaśnym środowisku i następnie przeniesienia ich do środowiska lekko alkalicznego daje krótkotrwałą syntezę ATP bez udziału światła, a więc i w nieobecności transportu elektronów w chlorofilowym łańcuchu oddechowym.

Wreszcie badania ostatnich lat nad słonolubną bakterią *Halobacterium halobium* przyniosły jeszcze jeden dowód słuszności teorii Mitchella. Bakteria ta zawiera w swej błonie komórkowej barwnik, bakteriorodopsynę, zbliżony chemicznie do rodopsyny siatkówki oka. Pod wpływem pochłonięcia energii świetlnej barwnik ten zdolny jest aktywnie transportować protony, tworząc w efekcie gradient pH po obu stronach błony. I tu gradient ten może być wykorzystany do syntezy ATP. Jest przy tym godne uwagi to, że w tym przypadku jego synteza zachodzi bez udziału jakiegokolwiek łańcucha oddechowego i procesów oksydoredukcji. Tak więc teoria chemicznego pośrednika między syntezą ATP a transportem elektronów nie ma tu punktu oparcia.

Koncepcja Mitchella dotyczy, jak to przedstawiono, ogólnych zasad „konserwacji energii” w błonach mitochondriów, chloroplastów i bakterii. Ukierunkowała ona sposób myślenia współczesnej bioenergetyki a także dała asumpt wielu nowych prób eksperymentalnych. Nie tłumaczy jednak molekularnych mechanizmów samej syntezy ATP z ADP i ortofosforanu. Nie wiemy nadal, w jaki sposób gradient elektrochemiczny lub też ruch jonów tym gradientem wywołany może „napędzać” tak wysoce endoergiczną reakcję, jaką jest synteza ATP. Nie jest również jasny mechanizm budowania tego gradientu przez funkcjonujący łańcuch oddechowy. Na podstawie ostatnich badań A. L. Lehningera można sądzić, że jest on bardziej skomplikowany, niż postulował to Mitchell.

Na zakończenie warto w paru słowach przedstawić losy teorii, która w końcu została wyróżniona nagrodą naukową cieszącą się najwyższym prestiżem. U swych początków była ona gorąco zwalczana przez większość bioenergetyków zajmujących się oksydacyjną fosforylacją, w tym również przez znane autorytety w tej dziedzinie. Stopniowo jednak zyskiwała sobie coraz to szersze uznanie i wielu dawniejszych przeciwników teorii chemiosmotycznej stało się z upływem czasu gorącymi jej zwolennikami. Sam Mitchell wiele lat swej pracy poświęcił na dostarczanie nowych dowodów na poparcie swej koncepcji i na przekonywanie o jej słuszności (2—3). Okolicznością niewątpliwie pomocną była finansowa niezależność Autora. Pracuje on bowiem we własnym laboratorium, należącym do stworzonej przez siebie fundacji. Warto jednak pamiętać, że sukces teorii chemiosmotycznej nie jest tylko zasługą jej twórcy. Wiele podstawowych dowodów na poparcie teorii Mitchella wyszło także z innych pracowni.

Lech Wojtczak

PIŚMIENICTWO

1. Mitchell P. (1961) *Nature*, **191**, 144—148.
2. Mitchell P., Moyle J. (1965), *Nature*, **208**, 1205—1206.
3. Mitchell P. (1966) *Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation*. Glynn Research Laboratory, Bodmin.
4. Mitchell P. (1966) *Biol. Rev.*, **41**, 445—502.
5. Mitchell P., Moyle J. (1967) w *Biochemistry of Mitochondria*, red. Slater E. C.,

Kaniuga Z., Wojteczak L., str. 53—74. Academic Press — P.W.N., London, New York, Warszawa.

6. Mitchell P. (1968) *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*. Glynn Research Laboratory, Bodmin.
7. Mitchell P. (1972) *Bioenergetics*, 3, 5—24.
8. Mitchell P. (1978) *Trends Biochem. Sci.*, 3, 58N—61N.

Werner Arber, Daniel Nathans i Hamilton Smith

Nagrody Nobla za badania nad enzymami restrykcyjnymi

Tegorocznymi laureatami Nagrody Nobla z dziedziny medycyny i fizjologii zostało trzech uczonych: prof. Werner Arber ze Szwajcarii oraz prof. prof. Daniel Nathans i Hamilton Smith ze Stanów Zjednoczonych. Nagroda ta została przyznana za prace związane z badaniami mechanizmu restrykcji i modyfikacji DNA, wyizolowaniem i określeniem własności endonukleaz restrykcyjnych oraz praktycznym zastosowaniem tych enzymów do badania struktury DNA i rekombinowania cząsteczek DNA *in vitro*.

Pierwsze doniesienia dotyczące zjawiska restrykcji i modyfikacji pochodzą z początku lat pięćdziesiątych (1, 2, 3). Z badań tych wynikało, że rozwój bakteriofagów wewnątrz komórki bakteryjnej zależy od typu bakterii, w których fagi te były uprzednio namnażane. Wzrost fagów w danym szczepie bakterii powoduje ich modyfikację. Cząstki fagowe po modyfikacji są zdolne do rozwoju w komórkach bakterii tego szczepu, w którym je namnażano, natomiast w innym szczepie podlegają działaniu bakteryjnego mechanizmu restrykcji.

Zapoczątkowane przez W. Arbera, w początkach lat sześćdziesiątych, doświadczenia wyjaśniły zjawiska restrykcji i modyfikacji na poziomie molekularnym, doprowadzając do zrozumienia ich najważniejszych etapów (4, 5, 6, 7, 8). W pracach tych Arber i współpracownicy wykazali, że proces restrykcji *in vivo* polega na szybkiej degradacji DNA fagowego do fragmentów niskocząsteczkowych (7, 8). Proces restrykcji zapoczątkowują endonukleazy restrykcyjne w kilku określonych miejscach w cząsteczkach DNA (9), w następnym etapie ten DNA ulega stopniowej degradacji do form niskocząsteczkowych. Obserwacje te znalazły dalsze potwierdzenie w doświadczeniach również z pracowni Arbera (10), w których badano mutanty fagów fd i lambda, niewrażliwych na działanie enzymów restrykcyjnych. Niewrażliwość ta spowodowana jest mutacjami punktowymi, ich położenie na mapie genetycznej badanych fagów określono dzięki analizie rekombinacyjnej.

W równoległe prowadzonych badaniach Arber i współpracownicy wyjaśnili mechanizm procesów prowadzących do zabezpieczenia fagów przed restrykcją (6, 8). Zjawisko to jest wynikiem chemicznej modyfikacji cząsteczki DNA, nie wymaga ono zajęcia replikacji fagowego DNA, wystarczy modyfikacja jednej nici DNA, aby był on odporny na działanie enzymu restrykcyjnego. Wykazano również, że z modyfikacją nie łączy się pojawienie żadnych wykrywalnych zmian fizycznych w cząsteczce DNA, oraz, że obecność modyfikacji uodparniającej DNA na działanie jednego enzymu restrykcyjnego nie wyklucza wprowadzaniu modyfikacji względem innego enzymu restrykcyjnego. Arber (10) zapoczątkował również eksperymenty, które doprowadziły następnie do zrozumienia na czym, w sensie molekularnym, polega proces modyfikacji. Okazało się, że jeżeli infekcję fagiem lambda prowadzono w hodowli *E. coli* bez metioniny w pożywce, to uzyskiwane wówczas fagi potomne charakteryzowały się obniżoną opornością na restrykcję, a także niższym stopniem modyfikacji. Ponieważ wiadomo było, że metionina jest donorem grup metylowych w reakcjach metylacji DNA, Arber wysunął przypuszczenie, że właśnie ten proces leży u podstawy zabezpieczającej przed restrykcją modyfikacji DNA. Przypuszczenie to zostało następnie w pełni potwierdzone przez innych badaczy.

W. Arber był również jednym z pierwszych, którzy zapoczątkowali badania procesu restrykcji i modyfikacji *in vitro*. Wykazał on, że częściowo oczyszczony ekstrakt z *E. coli* B wykazuje właściwości enzymu restrykcyjnego (11) oraz enzymu modyfikującego, obu w stosunku do niemetylowanego DNA.

Na szczególne zainteresowanie zasługuje artykuł przeglądowy opublikowany przez Arbera i Lina w 1969 roku (12). W artykule tym Arber nie tylko podsumował wiadomości dotyczące mechanizmu restrykcji i modyfikacji DNA, ale na ich podstawie przedstawił hipotezę dotyczącą rodzaju miejsc rozpoznawanych w DNA przez enzymy restrykcyjne i modyfikujące. Zakładając, że to samo miejsce powinno być rozpoznawane przez oba typy enzymów oraz, że nie powinno ono obejmować odcinków dłuższych niż 6—8 par zasad Arber zaproponował trzy różne modele sekwencji zasad w miejscu rozpoznawanym. Modele te, w zasadzie, różniły się obecnością lub brakiem symetrii w sekwencji zasad. Przypuszczenia te znalazły w następnych latach potwierdzenie w wynikach eksperymentalnych.

Pierwszym wyizolowanym i oczyszczonym enzymem restrykcyjnym była endonukleaza wydzielona w 1968 roku z *E. coli* K (13). Kofaktorami reakcji katalizowanej przez ten enzym są S-adenozylometionina, ATP i Mg^{++} . Enzym ten, chociaż rozpoznaje określoną sekwencję zasad, to nacina cząsteczkę DNA w dowolnym miejscu. W wyniku działania endonukleazy K powstaje zatem heterogenna populacja fragmentów cząsteczek DNA, o różnej długości. Z tych względów enzym ten nie nadaje się do analitycznego badania struktury DNA.

W 1970 roku ukazały się dwie publikacje H. Smitha i współpracowników. W pierwszej z nich (14) opisany został enzym restrykcyjny wyizolowany z *Haemophilus influenzae* Rd. Enzym ten, endonukleaza, wymagał do swego działania jedynie obecności jonów Mg^{++} i wprowadzał ograniczoną ilość cięć w dwuniciowej cząsteczce niemodyfikowanego DNA. W kolejnej pracy (15) określono sekwencje zasad rozpoznawaną przez ten enzym i co najważniejsze, wykazano, że przecięcie nici DNA następuje również w zakresie tej sekwencji, co prowadzi do powstania kilku produktów, każdy z nich składa się z fragmentów cząsteczek DNA o tej samej długości. Prace H. Smitha zapoczątkowały poszukiwania podobnych enzymów w innych gatunkach bakterii i doprowadziły liczbę poznanych obecnie enzymów restrykcyjnych do ponad 120.

Enzymy restrykcyjne podobne do odkrytego i opisanego enzymu przez Smitha i współpracowników mogą być użyte do konstrukcji fizycznych map różnorodnych genomów. Myśl ta podjęta została i rozwinięta przez Daniela Nathansa (16), który wykazał, że DNA wirusa SV40 jest cięty przez endonukleazę Hind II na 5 fragmentów, przez endonukleazę Hind III na 6 fragmentów, a przez endonukleazę Hpa I na 3 fragmenty. Biorąc pod uwagę znany uprzednio fakt, że ten sam DNA jest cięty tylko raz przez endonukleazę Eco RI można było ustalić wzajemne położenie fragmentów DNA otrzymanych po działaniu Hind II, Hind III i Hpa I, a tym samym skonstruować mapę fizyczną DNA tego wirusa. Metoda ta okazała się szczególnie przydatną do określenia map fizycznych genomów takich organizmów u których nie można tego wykonać wykorzystując klasyczną metodę rekombinacji genów. Prace Nathansa zapoczątkowały serię późniejszych publikacji, w których wykorzystano enzymy restrykcyjne do konstrukcji map fizycznych różnych cząsteczek DNA (17).

Prace trzech badaczy uhonorowanych tegoroczną nagrodą Nobla doprowadziły nie tylko do poznania i wyjaśnienia zjawiska restrykcji i modyfikacji DNA, lecz dały również biologom narzędzie do badań o znaczeniu zarówno podstawowym, jak i mogącym doprowadzić do znaczących zastosowań praktycznych.

Andrzej Piekarowicz

PISMIENNICTWO

1. Bertani G., Weigle J. J., (1953), *J. Bacteriol.*, **65**, 113.
2. Luria S. E., Human H. L., (1952), *J. Bacteriol.*, **64**, 557.
3. Ralston D. J., Kreuger M. P., (1952), *Proc. Exptl. Biol. Med.*, **80**, 217.
4. Arber W., (1963), *Virology* **23**, 173.
5. Arber W., (1965), *J. Mol. Biol.*, **11**, 247.
6. Arber W., Dussoix O., (1962), *J. Mol. Biol.*, **5**, 18.
7. Arber W., Hattman S., Dussoix D., (1963), *Virology* **21**, 30.
8. Dussoix D., Arber W., (1962), *J. Mol. Biol.*, **5**, 37.
9. Terzi M., (1968), *J. Mol. Biol.*, **34**, 165.
10. Arber W., Kühnlein U., (1967), *Pathol. Microbiol.*, **30**, 946.
11. Linn S., Arber W., (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 1300.
12. Arber W., Linn S., (1969), *Ann Rev. Biochem.*, **38**, 467.
13. Meselson M., Yuan R., (1968), *Nature (London)* **217**, 1110.
14. Smith H. O., Wilcox K. W., (1970), *J. Mol. Biol.*, **51**, 379.
15. Kelly T. J. Jr., Smith H. O., (1970), *J. Mol. Biol.*, **51**, 393.
16. Danna K., Nathans D., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2913.
17. Nathans D., Smith H. O., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 273.

Zwielokrotnienie zwierzęcego genu, jego klonowanie i ekspresja w komórce bakteryjnej

Od blisko trzydziestu lat wiadomo, że w wielu tkankach i komórkach zwierzęcych opornych na cytostatyczne działanie ametoptyryny zawartość białka reduktazy redukującej folian i dihydrofolian *) przewyższa wielokrotnie jej zawartość w tkankach i komórkach wrażliwych. Dopiero jednak w 1976 roku Robert T. Schimke (1,2) i John W. Littlefield (3) selekcionując komórki rosnące w obecności coraz to zwiększonych ilości ametoptyryny **) w pożywce stwierdzili niezależnie, że wzrost zawartości białka enzymatycznego w komórkach opornych wynika ze wzmożonej syntezy enzymu. W 1978 roku zaś R. T. Schimke wykazał wraz z współpracownikami, że wzmożona synteza enzymu jest konsekwencją zwielokrotnienia właściwego genu (4,5). W komórce zwierzęcej zatem regulacja syntezy białek może zachodzić nie tylko na etapach transkrypcji i translacji, lecz także w efekcie selektywnego zwielokrotnienia kodującego te białka DNA. Co więcej, w komórkach każdej kolejno badanej opornej linii zwielokrotnienie ilości kodującego DNA i ilości białka enzymatycznego było takie samo; w przypadkach niektórych linii nawet czterokrotne (5,7,8). Wykazano ponadto, że zwielokrotnienie genu może być efektem trwałym lub też przejściowym, odwracającym po usunięciu czynnika wywołującego; w danym przypadku po przeniesieniu komórek do pożywki nie zawierającej ametoptyryny (4,8). Oznacza to, że genom komórki zwierzęcej nie jest tak stałą całością (*constant entity*), jak dotąd sądzono (4,5,9).

Stwierdzenie selektywnego zwielokrotnienia genu strukturalnego w komórkach ssaków nasunęło pytanie: gdzie znajduje się fragment genomu ulegający powieleniu i czy w procesie tym odgrywają rolę jakieś szczególne sekwencje nukleotydów w DNA.

Aby odpowiedzieć na pierwsze z postawionych pytań R. T. Schimke i jego współpracownicy posłużyli się trwale oporną na aminopterynę linią komórek chomika chińskiego. Wykazali, że chromosom drugi uległ w nich znacznemu powiększeniu, a jego homogennie barwiące się Giemzą po traktowaniu trypsyną, powiększone ramię zawiera DNA komplementarny wobec mRNA mysiej reduktazy dihydrofolianowej, a zatem genu reduktazy dihydrofolianowej w komórkach chomika zidentyfikowano w homogennie barwiącym się regionie drugiego chromosomu (7).

W początkowej fazie szukania odpowiedzi na drugie pytanie autorzy podjęli próbę klonowania genu mysiej reduktazy dihydrofolianowej w komórkach bakteryjnych (6). A ponieważ reduktazy zwierzęca i bakteryjna różnią się znacznie powinowactwem do folianu i niektórych inhibitorów dają się łatwo odróżnić przy zastosowaniu prostych testów biologicznych i biochemicznych.

*) Oksydoreduktaza 5,6,7,8-tetrahydrofolian:: NADP⁺ (E.C. 1.5.1.3) zwana potocznie reduktazą dihydrofolianową.

**) Na temat cytotoksycznego działania ametoptyryny metabolizmu folianu i jego analogów opublikowano w *Postęпах Biochemii* w ostatnich latach następujące artykuły:

- 1) Manteuffel-Cymbrowska M. (1978) 24, 93—115,
- 2) Grzelakowska-Sztabert B. (1977) 23, 559—578,
- 3) Grzelakowska-Sztabert B. (1976) 22, 345—385.

Aby uzyskać czysty gen Schimke i współpracownicy oczyszczili mRNA genu reduktazy z opornych na ametoptynę mysich komórek AT — 3000. Następnie zaś użyli ów mRNA do syntezy komplementarnego DNA (cDNA) przez odwrotną transkryptazę. Do syntetycznego genu (cDNA) dołączono — działając terminalną transferazą — pojedynczoniowe końce poli(dC). Jednocześnie przygotowano jako wektor plazmid *pBR 322*. Plazmid, który izoluje się w formie kolistej, przeprowadzono w formę liniową nacinając go enzymem restrykcyjnym *Pst I*, po czym stosując terminalną transferazę dołączono pojedynczoniowe końce poli(dG). Po zmieszaniu syntetycznego genu z wektorem utworzyły się między innymi koliste asocjaty obu DNA utrzymywane przez powstałe wiązanie wodorowe między odcinkami poli(dC) i poli(dG), które stanowią syntetyczne „lepkie” końce wektora i genu. Zrekombinowany tak DNA został użyty do transformacji *E.coli* szczepów (κ) 1776 i 2282 (wariant *thy*⁺) (szczepy zatwierdzone przez Narodowy Instytut Zdrowia U.S.A. do stosowania jako bezpieczne w pracach badawczych ze zrekombinowanym DNA z organizmów wyższych) (6).

Uzyskano kilkanaście klonów bakteryjnych, w których metodą hybrydyzacji DNA w komórkach z cDNA reduktazy mysiej, wykazano obecność plazmidu *pBR 322*, zawierającego włączony podczas rekombinacji fragment DNA (1500 par zasad) odpowiadający syntetycznemu genowi reduktazy (6,7). Bakterie zawierające zrekombinowany plazmid rosły w pożywkach z trimetoprimem w wysokich stężeniach, w jakich giną komórki kontrolne, bez plazmidu. Co więcej analiza sekwencji nukleotydów w plazmidowym cDNA mysiej reduktazy dihydrofolianowej z komórek *E.coli* opornych na trimetoprim pozwoliła na bezpośrednie stwierdzenie, iż rzeczywiście występuje w nim odcinek odpowiadający sekwencji aminokwasów mysiego enzymu. Ekstrakty bakterii zawierających zrekombinowany plazmid redukowały folian, co wskazywało że zawierają zwierzęcą reduktazę dihydrofolianową, która — w przeciwieństwie do reduktazy bakteryjnej — może redukować do tetrahydrofolianu i folian i dihydrofolian. Autorzy wnioskowali zatem, że komórki *E.coli* zawierające zrekombinowany plazmid syntetyzowały białko o strukturze i właściwościach zwierzęcej reduktazy dihydrofolianowej, którego transkrypcja i translacja rozpoczęła się od sygnału startowego obecnego we włączonym do plazmidu fragmencie DNA. Ze specyficznej aktywności ekstraktów, znając aktywność specyficzną mysiej reduktazy dihydrofolianowej i parametry wiązania przez nią ametoptynę autorzy oszacowali, że w badanych ekstraktach z komórek *E.coli* we frakcji rozpuszczalnych białek enzym mysiej stanowił 0.01%.

Zwierzęce pochodzenie reduktazy dihydrofolianowej zakodowanej przez zrekombinowane plazmidy w komórkach *E.coli* potwierdzano stosując test radioimmunologiczny (solid phase sandwich radioimmuno assay). Zastosowanie nowej, nieopublikowanej dotąd metody, która pozwala na immunologiczną charakterystykę białek w żelu po elektroforezie doprowadziło do wykazania, że owe białko z *E.coli* reagujące z przeciwciałem wytworzonym przeciw mysiej reduktazie dihydrofolianowej ma tę samą ruchliwość elektroforetyczną co enzym z komórek mysich o ciężarze cząsteczkowym 22.000. Immunologicznie reaktywne białko o tej samej ruchliwości można było również otrzymać z ekstraktów przez zastosowanie chromatografii powinowactwa na kolumnie z ametoptyną i elucję roztworem folianu. Wskazywało to, że izolowane białko o ciężarze cząsteczkowym 22.000 ma miejsca wiążące folian i ametoptynę, jak zwierzęca reduktaza dihydrofolianowa.

Przedstawione wyniki pozwalają wnioskować, że skonstruowane przez Schimkego i współpracowników klony bakteryjne syntetyzowały reduktazę dihydrofolianową zakodowaną przez mysiej cDNA. Oczywiście nie wszystkie z otrzymanych klonów bakteryjnych zawierały plazmid z pełnym genem reduktazy dihydrofolianowej. W komórkach takich klonów udało się wykazać peptyd, który chociaż krótszy

od białka reduktazy i nie mający właściwości enzymatycznych, miał już miejsce antygenowe reagujące z przeciwciałami wytworzonymi przeciw zwierzęcej reduktazie dihydrofolianowej.

Opisane tu doświadczenia stanowią pierwszy, udokumentowany przykład ekspresji genu ssaków wprowadzonego do bakterii metodą rekombinacji. Fakt zaś, że dotyczą one znanego w onkologii zjawiska pojawiania się oporności tkanek nowotworowych na podawany lek, ametopterynę, podnosi walor badań zespołu R. T. Schimke ze Stanfordu.

Magdalena Fikus i Zofia Zielińska

PIŚMIENNICTWO

1. Kellems R. F., Alt F. W., Schimke R. T., (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, 6987—6993.
2. Alt F. W., Kellems R. F., Schimke R. T., (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, 3063—3074.
3. Hänggi U. J., Littlefield J. W., (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, 3075—3080.
4. Schimke R. T., Alt F. W., Kellems R. E., Kaufman R. J., Bertino J. R., (1978), *Cold Spring Harbor Symposia* **42**, 649—657.
5. Alt F. W., Kellems R. E., Bertino J. R., Schimke R. T., (1978), *J. Biol. Chem.* **253**, 1357—1370.
6. Chang A. C. Y., Nunberg J. H., Kaufman R. J., Ehrlich H. A., Schimke R. T., Cohen S. N., (1978), *Nature* **275**, 617—624.
7. Nunberg J. H., Kaufman R. J., Schimke R. T., Urlaub G., Chasin L. A., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A.*, (w druku)
8. Schimke R. T., Kaufman R. J., Nunberg J. H., Dana S. L., (1978), *Cold Spring Harbor Symposia*, **43**, (w druku)
9. Shields R., (1978), *Nature* **273**, 269—70.

Chemiczna Synteza Genu Insuliny Ludzkiej i jego Ekspresja w komórkach *Escherichia coli*

W październiku 1977 r. zespół chemików: K. Itakura, R. Crea, T. Hirose i A. Kraszewski*) z City of Hope Medical Center w Duarte koło Los Angeles oraz zespół biochemików: D. Goeddel, D. Kleid, F. Bolivar, H. Heyneker, D. Yansura z firmy Genentech z San Francisco i A. Riggs z City of Hope Medical Center podjęły prace nad otrzymaniem insuliny ludzkiej przy pomocy technik inżynierii genetycznej.

W pierwszym etapie dokonano syntezy genów łańcucha „A” i „B” insuliny. Synteza polegała na przygotowaniu od 0,5 do 1,0 mola odpowiednio zablokowanych monomerów pochodnych 3'-fosforanów tymidyny, dezoksycytydyny, dezoksyadenozyny i dezoksyguanozyny z ich preparatów handlowych nukleozydów. Monomery posłużyły do syntezy 45 trójnukleotydów, które w większości stanowiły kodony aminokwasów łańcucha insuliny. W ten sposób utworzona została „biblioteka” „trójek” kodonowych stanowiących bloki służące do łączenia w dłuższe oligomery. Według tej koncepcji dokonano syntezy 29 oligomerów o długości od 10 do 15 jednostek nukleotydowych. Wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa, elektroforeza w żelu poliakryloamidowym oraz analiza sekwencyjna pozwoliły stwierdzić nie mniejszą niż 95% czystość preparatów oraz ich poprawny skład nukleotydowy. Syntetyczne odcinki DNA połączono za pomocą ligazy DNA z faga T-4 w łańcuchach DNA o sekwencji zawierającej gen strukturalny insuliny poprzedzony kodonem metioniny oraz zakończony sygnałami terminującymi proces translacji. Skrajne sekwencje stanowiły tak zwane lepkie końce umożliwiające połączenie syntetycznego genu z plazmidem. W ten sposób zakończono pierwszy etap to jest chemiczno-enzymatyczną syntezę genów łańcuchów „A” i „B” insuliny ludzkiej.

W drugim etapie syntetyczne geny zostały połączone z plazmidem przy pomocy ligazy DNA. Do tego celu użyto plazmidu pBR 322 zawierającego dużą część genu β -galaktozydazy (3009 par zasad kodujących 1003 aminokwasów), który po rekombinacji poprzedzał gen syntetyczny. W ten sposób region kontroli biosyntezy β -galaktozydazy kontrolował jednocześnie inicjację transkrypcji i translacji genu syntetycznego. Taki hybrydowy DNA został wprowadzony, (transformowany) do komórek *E.coli*. W trakcie namnażania bakterii uzyskano także powielenie plazmidu z genem insuliny. Po izolacji plazmidu „wycięto” przy pomocy odpowiednich enzymów rekombinacyjnych gen syntetyczny i sprawdzono sekwencję jego nukleotydów — okazała się one poprawną. Powtórzono więc cykl: włączenie genu insuliny do plazmidu \rightarrow transformacja bakterii \rightarrow ich wzrost. Po uzyskaniu wystarczającej liczby komórek wyizolowano z nich hybrydy peptydowe: β -galaktozydaza—łańcuch „B” insuliny ludzkiej i β -galaktozydaza—łańcuch „A” insuliny ludzkiej. Stosując następnie bromocyjan, który selektywnie rozszczepia łańcuch peptydowy za resztą metioniny oddzielono łańcuchy „A” i „B” od pozostałej części peptydu.

Dla wykazania ekspresji syntetycznych genów wykonano następujące testy i analizy stwierdzające obecność łańcuchów „A” i „B” insuliny ludzkiej:

a) testy radioimmunologiczne następujących rekombinantów:

* Staż podoktorski, adiunkt Zakładu Stereochemii Produktów Naturalnych Instytutu Chemii Organicznej PAN w Poznaniu.

- łańcuch „A” z bakterii z łańcuchem „B”*) wołu,
- łańcuch „B” z bakterii z łańcuchem „A”**) świni,
- łańcuchy „A” i „B” z bakterii.

b) chromatografię porównawczą peptydów otrzymanych w bakteriach z ich analogami ze świni i wołu (wykonano sączenie żelowe, chromatografię jonowymienną i wysokociśnieniową chromatografię cieczą w fazie odwróconej).

c) sekwencjonowanie bakteryjnego łańcucha „A” (łańcucha „B” nie udało się jak dotychczas oczyścić tak dokładnie by wykonać analizę składu aminokwasowego). Wszystkie powyższe analizy w pełni potwierdziły, że otrzymano insulinę ludzką w bakteriach.

Wyniki powyższych prac zostały opublikowane w *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*.

Adam Kraszewski

** Łańcuch „A” insuliny świni jest identyczny z ludzkim, natomiast łańcuch „B” insuliny wołu różni się jednym aminokwasem (w ostatniej 30 pozycji) od ludzkiego. Odpowiednie mieszaniny łańcuchów powinny prowadzić do otrzymania aktywnej insuliny ludzkiej.

KRONIKA Z ŻYCIA
POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Pewnie Państwo zauważyli, że Zarząd Główny PTBiochem. przestał rozsyłać komunikaty. Wracamy za to do zwyczaju drukowania kroniki w Postępkach Biochemii. Tym razem kronika poświęcona jest działalności Oddziałów PTBiochem. w 1978 roku, ale w przyszłości chcielibyśmy zamieszczać ją co kwartał. Najważniejszą formą tej działalności jest organizowanie zebrań naukowych. Oto ich lista.

Białystok

Prof. A. Lindberg (Stockholm): Lipopolysaccharide as a phage receptor.

Lublin

Dr J. Wojcierowski (Lublin): Budowa nici chromatydowej.

Łódź

Dr R. Krasnodębski (Wrocław): O formułowaniu i weryfikacji pewnych hipotez biologicznych.

Katowice

Prof. M. Chorąży (Gliwice): Wirusy onkogenne.

Prof. W. Kunicki-Goldfinger (Warszawa): Ewolucja białek a syntetyczna teoria ewolucji.

Kraków

Doc. M. Gumińska (Kraków): Gospodarka energetyczna erythrocyta.

Doc. M. Gumińska, dr M. Ważewska-Czyżewska (Kraków): Nowy wariant wrodzonej niedokrwistości hemolitycznej z obniżeniem aktywności kinazy pirogronianowej erythrocytów.

Prof. O. Ulutin (Istambuł): The alteration of haemostatic mechanism in arteriosclerosis and thromboembolism.

Olsztyn

Prof. W. Minakowski (Olsztyn): Jedność przemian biochemicznych światażywionego.

Prof. P. Masłowski (Toruń): Rola nieorganicznego pirofosforanu i pirofosfatazy w akumulacji i przetwarzaniu energii na poziomie subkomórkowym.

Dr J. Głogowski (Olsztyn): Biochemiczne i immunologiczne właściwości fosfatazy alkalicznej plazmy nasienia buhaja.

Dr J. Dostał (Libechow): Badania nad białkami układu rozrodczego buhaja i knura.

Poznań

Prof. S. Ghisel (Konstancja): Stosowanie samobójczych substratów w badaniach nad enzymami flawinowymi. Ponadto 4 zebrania poświęcone arylosulfatazom, alfa-amylazom i enzymom flawinowym.

Szczecin

Mgr D. Jurek (Szczecin): Własności fizyko-chemiczne, metody oznaczania i rozdziału oraz znaczenie diagnostyczne fosfatazy zasadowej i kwaśnej.

Lek. T. Dutkiewicz (Szczecin): Znaczenie i rola kwasów tłuszczowych w metabolizmie ustroju ludzkiego.

Prof. J. Mąkowski (Szczecin): Lipidy krwi a niektóre aspekty metabolizmu energetycznego erytrocytów oraz Współczesne poglądy na niektóre glikolityczne uwarunkowania transportu tlenu i przekazywania do tkanek.

Doc. Z. Machoy (Szczecin): Główne kierunki badań biochemicznych w 1978 roku w świetle zjazdów krajowych i zagranicznych.

Toruń

Doc. H. Wehr (Warszawa): Wzajemne oddziaływania komórek i lipoproteidów.

Prof. M. Zydowo (Gdańsk): Metabolizm aminokwasów i nukleotydów w komórkach mięśni ssaków.

Warszawa

Prof. M. Chorąży (Gliwice): Geny, wirusy i rak.

Dr G. Wright (USA): Structure-activity relationships of inhibitors of DNA polymerases.

Prof. W. M. Watkins (Londyn): Blood group gene-specific glycosyl transferases in normal ABO groups and rare variants.

Prof. L. Wojtczak, doc. M. Fikus, doc. W. Filipowicz (Warszawa): Sprawozdanie z FEBS-78 (bioenergetyka, inżynieria genetyczna, regulacja transkrypcji i translacji).

Dr A. Kraszewski (Poznań): Chemiczna synteza genu dla insuliny ludzkiej i jego ekspresja w bakteriach *E. coli*.

Prof. K. Kirchner (Bazylea): Multifunctional enzymes.

Wrocław

Dr C. Ługowski (Wrocław): Wspólny antygen *Enterobacteriaceae*.

Mgr A. Jankowski (Wrocław): Molekularny mechanizm nieodwracalnej denaturacji lizozymu.

Prof. K. Kleczkowski (Warszawa): Regulacja biosyntezy białka u roślin.

Dr M. Koter (Łódź): Zjawisko fuzji i agregacji w vesicles PC/PA badane metodą [³¹P] — NMR.

Dr M. Warwas (Wrocław): Immunizacja owiec akrozyną a zapłodnienie.

Prof. I. Z. Siemion (Wrocław): [¹³C] — NMR w badaniach konformacji peptydów.

Prof. W. M. Watkins (Londyn): Blood groups gene-specified glycosyltransferases in normal ABO groups and rare variants.

Prof. W. M. Durand (Clermont-Ferrand): Proteins involved in phosphate transport system of pig heart mitochondria.

Dr G. Ashwell (Bethesda): The role of cell surface glycoproteins in recognition and endocytosis.

Prof. T. Kłopotowski (Warszawa): Regulacja syntezy dehydrogenazy D-amino-kwasów — enzymu błon bakteryjnych.

Przyznają Państwo chyba, że Wrocław, choć ostatni na liście, zasługuje na pierwsze miejsce pod względem liczby zebrań. Szkoda, że brak miejsca nie pozwala na zacytowanie zawiadomień o tych zebraniach, dowcipnie i atrakcyjnie zredagowanych, zapraszających do udziału. Jak wieść niesie — frekwencja dopisywała. Ale i Białystok, Poznań i Szczecin nie mają się czego wstydzić, biorąc pod uwagę liczebność Oddziałów w tych miastach. Może to łatwiej spotykać się w małym, zgranym, zżytym gronie? Zresztą wiele jest spotkań nieoficjalnych, nie ujętych w sprawozdaniach, organizowanych przez osoby pracujące w niektórych Programach Rządowych. Niezależnie od form organizacyjnych lub ich braku — życzymy wszystkim owocnej pracy i wymiany doświadczeń.

Zarząd Główny

KOMUNIKATY

Sekcja Tkanki Łącznej Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików informuje, że w dniach 2—5.09.1980 r. odbędzie się VII Sympozjum na temat tkanki łącznej.

Szczegółowych informacji udziela:

Dr Z. Deyl
Institute of Physiology
Academy of Sciences
142 00 Praha 4-Krč
Budejovicka 1083
CSRS

SYMPOZJUM N.T. BIOLOGII I PATOLOGII CHRZĄSTKI

Instytut Reumatologiczny i Sekcja Tkanki Łącznej Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików organizuje Sympozjum na temat „Biologii i patologii chrząstki”.

W programie sympozjum przewidziane są referaty z zakresu biochemii, histochemii, histologii, histopatologii, ultrastruktury chrząstki w stanach patologicznych i prawidłowych.

Sympozjum odbędzie się w Instytucie Reumatologicznym w Warszawie 24 listopada 1980 roku. Zgłoszenia referatów wraz z zamówieniem hotelu należy zgłaszać w nieprzekraczalnym terminie do 31 maja 1980 roku na adres:

Profesor dr hab. med. Eugeniusz Małydk,
Instytut Reumatologiczny, ul. Spartańska 1,
02-637 Warszawa

SPRAWOZDANIA

VI Międzynarodowe Sympozjum nt. „Chemia i biologia pterydyn”

La Jolla, 25—28.IX.1978

W dniach 25—28 września 1978 odbyło się w La Jolla, California, U.S.A. już szóste z kolei międzynarodowe Sympozjum na temat chemii i biologii pterydyn. W skład Komitetu Organizacyjnego Sympozjum wchodził wybitni amerykańscy specjaliści, od lat zajmujący się zagadnieniami folianu: F. M. Huennekens i J. M. Whiteley (Scripps Clinic and Research Foundation), G. Brown (Massachusetts Institute of Technology), J. J. Burchall (Wellcome Research Laboratories), R. L. Kisliuk (Tufts University), S. Kaufman (National Institute of Health), J. Montgomery (Southern Research Institute) i T. Shiota (University of Alabama). W sympozjum wzięło udział ponad 200 uczestników (w tym 3 z Polski), a więc niemal dwukrotnie więcej niż w analogicznym Sympozjum przed trzema laty. Na sympozjum przedstawiono 140 doniesień, z których wygłoszono 59, resztę zaś prezentowano w postaci plakatów. Obrady odbywały się w sali wykładowej miejscowego muzeum sztuki (Sherwood Hall), plakaty zaś wystawione były w laboratoriach Scripps Clinic and Research Foundation przez cały czas trwania sympozjum. Materiały Sympozjum zawierające pełne prace zostały już opublikowane w specjalnym tomie zjazdowym wydanym przez Elsevier North-Holland Biochemical Press.

Tematyka Sympozjum obejmowała wszechstronne omówienie chemii i biologii prostych pterydyn oraz pochodnych folianowych.

Stosowanie w chemioterapii nowotworów aminoanalogów folianu (ametoptyeryny i aminopteryny) prowadzi niejednokrotnie do powstania oporności na ten lek. Dlatego też duże znaczenie mają próby otrzymania nowych analogów o podobnych do ametoptyeryny właściwościach biologicznych. Na sympozjum prezentowano doniesienia o syntezie chemicznej deazapochodnej folianu i aminopteryny oraz o syntezie amidów i estrów ametoptyeryny, które hamują reduktazę dihydrofolianową i odznaczają się nieco odmiennymi od ametoptyeryny charakterystykami transportu do komórek. Przedstawiono także dane wskazujące, że związki z różnymi modyfikacjami w części kwasu homofoliowego oraz różnego typu pochodne pterydynowe mogą stanowić efektywnie działające inhibitory innych niż reduktaza dihydrofolianowa enzymów folianowych.

Dyskutowano również szereg aspektów stosowania analogów folianu w chemioterapii. Tak na przykład, przedstawiono dane, że wprowadzenie do organizmu ametoptyeryny w połączeniu z inertnymi nośnikami (np. albuminą) zwiększa jej skuteczność w leczeniu niektórych nowotworów (np. *Lewis lung carcinoma*), prawdopodobnie dzięki przedłużeniu czasu pozostawania kompleksu w surowicy. Zwrócono także uwagę — szczególnie przy zastosowaniu leczenia ametoptyeryną w dużych dawkach — na ważną w klinice potrzebę śledzenia w surowicy, oprócz poziomu ametoptyeryny, także produktów przemian pochodnych folianowych użytych jako środki ochronne. Doniesiono ponadto, że aminowe analogi folianu, poza zaburzeniami przemian folianu mogą w pewnych warunkach doprowadzać także do zaburzeń

w przemianach cukrowców, co manifestuje się między innymi zahamowaniem aktywności LDH w komórkach ssaków hodowanych *in vitro* w obecności ametoptyryny.

Na Sympozjum wiele uwagi poświęcono biosyntezie poliglutaminianów pochodnych folianowych oraz ulepszeniom metod ich identyfikacji. Podkreślano także zależność ilości i rodzaju syntetyzowanych pochodnych poliglutaminianów folianu od składu środowiska hodowanego komórek lub stanu fizjologicznego zwierząt (np. niedobór u szczurów witaminy B12). Zaprezentowano także dwie nowe metody oznaczania aktywności enzymu odpowiedzialnego za syntezę poliglutaminianowych pochodnych folianu.

Spśród kilkunastu enzymów folianowych najwięcej wiadomo o budowie i mechanizmie działania reduktazy dihydrofolianowej i syntetazy tymidylanowej. Na Sympozjum ogłoszono szereg doniesień o strukturze pierwszorzędowej reduktazy dihydrofolianowej z bakterii, niektórych komórek hodowanych *in vitro* oraz wątroby wołu. Omówiono także wyniki badania reduktazy dihydrofolianowej za pomocą metod krystalograficznych, jądrowego rezonansu magnetycznego oraz z użyciem fluoryzujących pochodnych niektórych inhibitorów.

Podano również sekwencję aminokwasową syntetazy tymidylanowej z *Lactobacillus casei* i przedstawiono dane na temat powstawania i struktury jej kompleksów z różnymi inhibitorami. Podkreślano także znaczenie zmian aktywności reduktazy metylenotetrahydrofolianowej w przemianach folianu w tkankach zwierząt zdrowych, jak i obciążonych nowotworami.

Bardzo wiele komunikatów dotyczyło także: transportu pochodnych folianowych i ich analogów do komórek różnych typów; izolacji i charakterystyki komórkowych i występujących w płynach ustrojowych białek wiążących, a być może także transportujących, pochodne folianowe; przemian folianu i jego różnych pochodnych w komórkach prawidłowych i nowotworowych oraz w wątrobie zwierząt obciążonych nowotworami.

Przedstawiony przegląd zagadnień nie wyczerpuje oczywiście tematyki Sympozjum, a wskazuje jedynie na podstawowe poruszane problemy. Wszyscy uczestnicy Sympozjum podkreślali bardzo sprawną organizację Zjazdu oraz panującą życzliwą i serdeczną atmosferę sprzyjającą wielu wartościowym chociaż nieformalnym dyskusjom.

B. Grzelakowska-Sztabert

RECENZJE

Horizons in Biochemistry and Biophysics, tom 5

Red. E. Quagliariello, F. Palmieri, Th. P. Singer

Addison-Wesley Publishing Company, Advanced Book Program, Reading, 1978, Massachusetts, stron 321, cena \$ 22,50

Tom 5 tej serii, podobnie jak tomy poprzednie (por. recenzja tomu 2, *Post. Biochem.* 23, 476—477, 1977) zawiera referaty z różnych dziedzin biochemii i biofizyki, w których w ostatnich latach nastąpił znaczny postęp badań. Pozwoliło to na dokonanie pewnego podsumowania i spojrzenia w przyszłość.

I. Mabuchi omawia biochemię ATP-azy rzęsek i wici i jej rolę w ruchach komórki. Tak np. wydzielone ze struktur aksonomowych *Tetrahymena* dyneiny są ATP-azami i mają współczynnik sedymentacji 30 S i 14 S. Na przykładzie dynein z kilku źródeł autor rozpatruje polimorfizm, różnice gatunkowe, właściwości fizykochemiczne, aktywność ATP-azową, oddziaływanie z mikrotubulami oraz warunki inaktywacji i reaktywacji enzymu.

J. Knoll przedstawił zróżnicowanie oksydaz monoamin uzyskane dzięki zastosowaniu selektywnych inhibitorów tych enzymów. Oksydaza typu A, deaminująca serotoninę jest hamowana przez klogilinę (2,4-dichlorofenoksypropylo-N-metylopropyloaminę), natomiast typu B, deaminująca fenyloetyloaminę jest hamowana przez deprenyl (fenyloizopropylo-N-metylopropyloamina). Interesujące są rozważania o możliwościach wykorzystania specyficzności działania tych inhibitorów w chemoterapii.

Funkcje transportowe zewnętrznej błony bakterii jelitowych (*Escherichia coli* K-12 i *Salmonella typhimurium* LT-2) są tematem referatu J. B. Neilands. Na przykładzie dobrze już poznanych biochemicznie układów transportujących witaminę B₁₂ maltodekstryn siderofory oraz receptorów wiążących specyficznie fagi i bakteriocyny, przedstawia dane wskazujące na dużą selektywność transportu przez zewnętrzną błonę bakterii składników pożywienia i związków szkodliwych dla komórki.

„Problemy wylaniające się w badaniach kurczliwości” (M. F. Morales, J. Bo-rejdo) są rozpatrywane głównie z punktu widzenia sprzężenia między cyklami kinematycznymi i enzymatycznymi skurczu mięśnia, przy częstotliwości każdego z nich rzędu 10 Hz. Badania takie wymagają odpowiednich metod pomiarowych (omawianych krytycznie) oraz techniki obliczeniowej.

Zagadnienia chemii i biochemii wiązania azotu przedstawił J. M. Pratt. W artykule tym, podobnie jak w wielu innych na ten temat, wiązanie azotu jest omawiane bardziej szczegółowo od strony chemicznej niż biochemicznej, ponieważ biochemia tego procesu ciągle jest niedostatecznie poznana.

O nowym spojrzeniu na perystaltykę i jej funkcje pisze N. Liron z przeświadczeniem, że poruszone problemy zachęca do dalszych badań tego procesu, zarówno teoretyków jak i eksperymentatorów.

L. Peller przedstawił termodynamiczne podstawy syntezy kwasów nukleinowych, rozważając energetykę tworzenia wiązań fosfodiesterowych, drugorzędowe oddziaływania strukturalne i hydrolizę pirofosforanu.

„Oddziaływanie białko-lipid i rola wody” jest tematem referatu H. Edelhocha, w którym autor rozpatruje termodynamikę interakcji między niepolarnymi grupami hydrofobowymi tworzącymi wiązania lipid-białko.

Tom kończy referat R. M. Friedmana „Mechanizm działania interferonu: Możliwe pierwotne efekty na błonę”, w którym przedstawia efekty interferonu na chemiczne, fizyczne, morfologiczne i immunologiczne zmiany powierzchni błony komórki i replikację wirusa.

Różnorodność zawartej w „Horyzontach” tematyki może być dla pewnych czytelników zaletą, ponieważ umożliwia im poznanie aktualnego stanu wiedzy w dziedzinie, w której sami nie pracują, natomiast inni mogą uważać to zróżnicowanie tematyki za wadę, gdyż obejmuje problematykę, często znacznie odbiegającą od głównego nurtu ich zainteresowań. Przykładem takiej sytuacji są zawarte w omawianym tomie artykuły o perystaltyce, wiązaniu azotu czy termodynamicznych podstawach syntezy kwasów nukleinowych. Jeśli jednak założyć, że ten typ publikacji jest przeznaczony dla szerokiego grona czytelników interesujących się zagadnieniami nie tylko z zakresu własnej specjalności, to ten sposób przedstawiania ostatnich osiągnięć biochemii i biofizyki można uznać za udany i wartościowy.

Z. Kaniuga

David E. Metzler

Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells.

Academic Press, 1977, New York, San Francisco, London, stron 1129 + XXXII, cena \$ 24.95

Miernikiem postępu nauki są nie tylko odkrycia ale także treść podręczników akademickich, w których osiągnięcia te znajdują swe odzwierciedlenie w formie odpowiedniej do przekazania ich studentom. Do podręczników biochemii wydanych w ostatnim dwudziestolecu, stanowiących słupy milowe na drodze rozwoju tej dziedziny wiedzy można zaliczyć podręczniki: „General Biochemistry” (J. Fruton, S. Simmonds, I wyd. 1956, II wyd. 1958), „Biochemistry” (A. L. Lehninger, I wyd. 1970, II wyd. 1975) oraz obecnie „Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells” w opracowaniu D. E. Metzlera. Wszystkie te podręczniki są nie tylko bardzo obszerne (rzędu 800—1100 stron) ale cechuje je przede wszystkim zawarta w nich treść i oryginalność jej przedstawienia czytelnikowi. Wprawdzie w ostatnich 10-ciu latach ukazały się również obszerne podręczniki biochemii (1—3) to jednak ze względu na ich określone przeznaczenie lub sposób ujęcia, rozpowszechnienie tych książek było ograniczone do pewnego kręgu czytelników. Przeciwnie, podręczniki traktujące biochemię możliwie szeroko, z uwzględnieniem wszystkich grup żywych organizmów, umożliwiały ich autorom znacznie większą swobodę konstrukcji książki i w rezultacie opracowania budzące ogólne zainteresowanie. Do takich podręczników można obecnie zaliczyć książkę D. E. Metzlera, który główny nacisk położył na reakcje chemiczne zachodzące w żywej komórce. Inni autorzy też o nich piszą, przedstawiają je jednak bardzo często w sposób dość powierzchowny. Metzler natomiast zrobił to w sposób najbardziej szczegółowy i zgodnie z obecnym stanem naszej wiedzy w tym zakresie.

Drugą istotną cechą omawianego podręcznika jest jego układ i sposób ilustrowania. Tak więc zamiast tradycyjnie dzielić biochemię na działy, obejmujące grupy związków jak białka, kwasy nuleinowe, lipidy, cukrowce itd (co jest napewno nieodzowne w podstawowym kursie biochemii) Metzler przyjął za podstawę rozważań typy reakcji chemicznych, które towarzyszą powstawaniu, rozpadowi i przekształceniom tych związków. Opisując natomiast znaczenie biologiczne określonego zjawiska fizjologicznego, sprowadza cały wywód do jego źródła, którym ostatecznie są przekształcenia chemiczne związków.

Podręcznik zawiera dwa nurty myślowe, przebiegające równolegle w 16 rozdziałach. Główny nurt, stanowiący około 90% objętości książki, to setki reakcji chemicznych uporządkowanych w sposób przedstawiony niżej. Obok niego przebiega drugi, uzupełniający (wyróżniony w tekście zielonym tłem papieru) który obejmuje krótkie od 1/2 do 2 stron omówienia pozornie oderwanych zagadnień, stanowiących jednak całość (por. wykaz zamieszczony niżej). W poszczególnych rozdziałach jest tych omówień (w formie tzw. „Box”) od 4 do 11.

Książkę można podzielić na kilka części. Rozdziały 1—3 zawierają materiał informacyjny o budowie komórki, molekularnej architekturze komórki i energetyce. I tak w rozdziale 1 można znaleźć dane liczbowe o wielkości komórek i organelli, o genetycznej złożoności organizmów. Jest w nim również charakterystyka gatunków opisywanych w dalszych rozdziałach. Rozdział ten jest napisany z myślą o studentach o niewielkiej znajomości biologii (np. studentach chemii) ale w praktyce będzie użyteczny także i dla innych, ponieważ ma wyeksponowane elementy najbardziej potrzebne biochemikowi. Zarówno tutaj jak i w całej książce z jednakową uwagą są traktowane bakterie, rośliny i zwierzęta. Drugi rozdział jest przeglądem zasad budowy cząsteczek, po czym następują rozważania o zależności między ich budową a właściwościami chemicznymi białek, cukrowców, kwasów nukleinowych i lipidów. Zagadnienia te, szczególnie odnośnie zmian konformacyjnych i szczegółów przebiegu reakcji, są przedstawione nowocześnie zarówno w tekście jak i graficznie (rysunki i zdjęcia). Omówieniu pierwiastków nieorganicznych towarzyszy przegląd metod oznaczania struktury związków łącznie z techniką NMR. W trzecim rozdziale, po przeglądzie podstawowych równań termodynamicznych, zestawiono tabelarycznie do praktycznego stosowania wiele danych z termodynamiki biochemicznej. Wartości energii swobodnej i entalpii zarówno tutaj jak i w całym podręczniku są podane w kilodżulach (kJ), zgodnie z obowiązującymi obecnie jednostkami standardowymi (SI).

Następna część książki (rozdziały 4 i 5) opisuje drogi i sposoby w jaki cząsteczki żywych organizmów reagują między sobą. Jest to (rodz. 4) nowoczesne ujęcie zagadnienia od ilościowego traktowania wiązania do powstawania struktur oligomerycznych enzymów, mikrotubuli, wirusów i mięśni. Efekty allosteryczne są rozpatrywane ilościowo i po raz pierwszy tak szczegółowo w podręczniku biochemii. Budowę i chemiczne właściwości błon oraz otaczające komórki osłonki i ściany przedstawiono w rozdziale 5. Zawarty w nim materiał da studentowi wystarczające podstawy do zrozumienia bieżących prac doświadczalnych z tego zakresu, bez konieczności szukania uzupełniających danych w innych opracowaniach.

W trzeciej części książki (rozdz. 6—8) przedstawiono ogólne właściwości enzymów, kinetykę reakcji chemicznych oraz przedyskutowano różne mechanizmy katalizy enzymatycznej. Kinetyka reakcji enzymatycznych omawiana w rozdz. 6 jest na tyle szczegółowa by zaspokoić potrzeby studentów starszych lat studiów. Poza tym opisano mechanizmy regulacyjne reakcji enzymatycznych. Rozdział 7 zawiera systematyczną i logiczną klasyfikację typów reakcji enzymatycznych: a) przemieszczenie lub sybstitucja, b) addycja, c) eliminacja, d) izomeryzacja, e) rozszczepienie wiązania C-C oraz f) izomeryzacja i przegrupowania inne niż wymienione poprzednio. Z kolei rozdział 8 traktuje o budowie i specjalnych funkcjach koenzymów i odnosi

ich działanie do typów reakcji omówionych w poprzednim rozdziale. Oba rozdziały mają wiele odnośników do różnych części książki i nie muszą być czytane systematycznie. Rozdział 8 może natomiast być łączony w całość z materiałem zawartym w rozdziale 2 dotyczącym białek, cukrów, kwasów nuleinowych i lipidów.

Czwartą, dużą część stanowią rozdziały 9—14, omawiające sekwencje reakcji występujących w metabolizmie. Rozdział 9 przedstawia „logikę” cykli i szlaków metabolicznych. Podane są przykłady wykazujące kolejne chemiczne przekształcenia prowadzące od substratu do produktu końcowego. Jest tu m.in. wiele przemian charakterystycznych dla drobnoustrojów. Transport elektronów i fosforylacja oksydacyjna oraz reakcje dostarczające energii zachodzące u chemiautotrofów omawiane są w rozdziale 10, natomiast wykorzystanie energii ATP do różnych biosyntezy przedstawiono w rozdziale 11. Niektóre specyficzne szlaki metaboliczne cukrowców i lipidów opisane są w rozdziale 12. Rozdział 13 — „Światło w biologii” jest poświęcony nie tylko fotosyntezie, procesowi widzenia i innym biologicznym reakcjom na świetle ale także widmom absorpcyjnym światła, dichroizmowi kołowemu i fluorescencji. Biosynteza i katabolizm dużej grupy związków azotowych w tym również wiązanie N_2 , jest przedstawione w rozdziale 14.

Na ostatnią część książki składają się rozdziały 15 i 16, w których omówiono zagadnienia genetycznej i hormonalnej kontroli metabolizmu, rozwoju, funkcji mózgu. Przedstawiono więc nie tylko biosyntezę kwasów nukleinowych i białka ale także podsumowano metody stosowane w badaniach z zakresu genetyki biochemicznej (rozd. 15). Ostatni rozdział jest krótkim wprowadzeniem do zagadnień komunikacji między komórkami, neurochemii, różnicowania i warunków ekologicznych wpływających na metabolizm.

Na wspomniany wyżej nurt boczny, zamieszczony w tzw. „box”, składają się następujące zagadnienia: a) Właściwości witamin i historia ich odkrycia (funkcje koenzymatyczne oraz biosynteza są przedstawione w podstawowym tekście książki); b) rola pierwiastków elementarnych (np. Selen; Mangan; Molibden; itd); c) Rola mutacji i przykłady wad metabolicznych u człowieka (np. genetycznie uwarunkowane wady struktury kolagenu; metylomalonyloaciduria, i. in.). d) Działanie trucizn i ich zastosowanie w badaniach biochemicznych (np. Sulfoamidy i antymetabolity, Insektocydy, Białka toksyczne: toksyna dyfterytu, itp.), e) Metody i pomiary (np. „Ciężar cząsteczkowy a dalton”, gdzie wyjaśnia te pojęcia i ich stosowalność, zwracając przy tym uwagę na częste błędne wyrażanie ciężaru cząsteczkowego w daltonach), „Izotopy w badaniach biochemicznych”, „Elektronowy rezonans paramagnetyczny” i „znaczniki spinowe” itp. f) Chemia fizjologiczna. Z tego zakresu są np. „Białka plazmy krwi”, „Wirusy” „Chemia skurczu mięśni”, „Przeciwciężła”, „Syntetaza tymidylanowa a chemoterapia raka”. g) Różne, np. „Wici bakterii”, „Jak rośliny wytwarzają barwniki”, „Replikacja bakteriofaga zawierającego RNA”.

Wydzielenie z głównego tekstu tematów wymienionych wyżej ma, zdaniem recenzenta, dwie zalety: 1) nie zaciemnia spraw bardziej istotnych, wynikających z tytułu i podtytułu książki, 2) wydzielenie w/w informacji nie tylko nie pomniejszyło ich ważności ale przeciwnie, uwypukliło ich rolę i znaczenie w całości omawianych zagadnień.

Każdy rozdział podręcznika kończy się pytaniami, zadaniami i problemami do rozwiązania czy przemyślenia a także obszernym wykazem cytowanej literatury. Cytowane są trzy rodzaje piśmiennictwa a) podręczniki i monografie, b) szczególnie istotne prace doświadczalne, dawniejsze i najnowsze, oraz c) bieżąca literatura zapoznająca z pracami eksperymentalnymi. O ogromie materiału zawartego w podręczniku dowodzi najlepiej 80 stronicowy indeks rzeczowy.

Książka jest przeznaczona dla czytelnika ze znajomością podstaw biochemii a więc studentów po kursie podstawowym ale bardziej zaawansowani znajdą w niej również bardzo wiele nie znanych sobie faktów. W przedmowie autor skromnie

zastrzega się, że jego sposób przedstawienia biochemii w podręczniku nie jest ucieczką od tradycyjnego ujmowania podstaw biochemii ale tylko innym spojrzeniem i podejściem do omawianych zagadnień. Zdaniem recenzenta podręcznik biochemii D. E. Metzlera jest i ucieczką od tradycji i nowym spojrzeniem. Jeśli do tego dodać, że zawiera niezliczoną ilość różnych informacji, piękne graficzne opracowanie, można oczekiwać że będzie poszukiwanym podręcznikiem biochemii końca lat 70-tych. Naszym biochemikom należy życzyć szczęścia w jego zdobyciu a bibliotekom biochemicznych placówek naukowych by przynajmniej jeden egzemplarz znalazł się w ich zbiorach.

Z. Kaniuga

1. H. R. Mahler, E. H. Cordes, (1972), „Biological Chemistry” 2 wyd. Harper and Row, str. 1009.
2. A. White, P. Handler, E. L. Smith, (1973), „Principles of Biochemistry” 5 wyd. McGraw-Hill, str. 1226.
3. N. V. Bhagavan, (1974), „Biochemistry: A Comprehensive Review”, Lippincott, str. 964.

Transition States of Biochemical Processes

Red. R. D. Gandour, R. L. Schowen

Plenum Press, 1978, New York, str. 616, \$ 59,40

Recenzowana książka to dzieło 21 autorów, którzy w 16-tu rozdziałach zgrupowanych w czterech częściach przedstawiają zagadnienia związane z teorią stanu przejściowego w zastosowaniu do reakcji biochemicznych. Wydaje się, że do głębokiego studiowania książki powinien zachęcić przede wszystkim rozdział 2, napisanego przez drugiego z redaktorów, R. L. Schowena. Autor udowadnia w nim, że katalizę enzymatyczną opisaną poprzez efekty zbliżenia, destabilizację geometryczną (czyli zmianę konformacji cząsteczki substratu na niekorzystną energetycznie ale w określony sposób bardziej reaktywną chemicznie), czy destabilizację związaną z desolvatacją substratu po adsorpcji w centrum aktywnym — można, używając odpowiedniego podejścia, przedstawić jako stabilizację stanu przejściowego reagentów w wyniku ich wiązania z enzymem.

Sz szczególnie interesujący jest wywód, w którym Showen opisuje za pomocą teorii stanu przejściowego mechanizm „entropowej pułapki” (kataliza polega na zwiększeniu efektywnego stężenia substratów poprzez ich selektywną adsorpcję i odpowiednią orientację w centrum aktywnym enzymu). Był to zawsze (przynajmniej dla autora tej recenzji) przykład, do którego nie można było tej teorii zastosować! Innymi słowy Schowen przekonująco argumentuje, że teoria stanu przejściowego jest teorią uniwersalną tłumaczącą wszystkie mechanizmy reakcji enzymatycznych. Powyżej omówiony rozdział wchodzi w skład części pierwszej — „Rola stanu przejściowego w katalizie chemicznej i biologicznej”. Poprzedza go rozdział napisany przez E. K. Thornton i E. R. Thorntona, gdzie na 73 stronach wyłożone są podstawy teorii stanu przejściowego wraz z jej ograniczeniami.

Druga część, to metody określania struktury i własności stanów przejściowych w biochemii. Omówiono podejścia teoretyczne (chemia kwantowa) oraz doświad-

czalne poprzez efekty izotopowe i metody oparte na rezonansie magnetycznym i krystalografii. W szczególności szeroko, bo aż w 4-ch rozdziałach (na 140 stronach) opisano efekty izotopowe, a mianowicie: zmiany parametrów reakcji enzymatycznych związanych z podstawieniem wodoru deuterem lub trytem w układach gdzie następuje przerwanie wiązania walencyjnego z wodorem (efekty pierwszego rzędu) oraz układach, w których reakcja nie dotyczy atomów wodoru (efekty drugiego rzędu); efekty związane z zamianą wody na wodę ciężką oraz efekty związane z wprowadzaniem do substratów izotopów ciężkich atomów.

Trzecia część książki zawiera opisy typowych reakcji enzymatycznych z punktu widzenia stanów przejściowych. Zostały one dobrane w taki sposób, by ilustrować zastosowanie metod opisanych w części drugiej. Omówiono reakcje metylacji i acylacji, hydrolizy acetalu, ketali glikozydów i glikozamin, dekarboksylacji ketokwasów i fosforylacji. W ostatnim rozdziale części trzeciej napisanym przez R. D. Gandoura przedstawiono na podstawie danych zaczerpniętych z czystej fizycznej chemii organicznej, dyskusję mechanizmów reakcji enzymatycznych.

Ostatnia część książki składa się z dwóch rozdziałów — pierwszy napisany przez R. Wolfendena dotyczy problemu naturalnych inhibitorów w świetle (oczywiście) teorii stanu przejściowego; drugi napisany przez J. K. Cowarda dotyczy działania i projektowania leków.

Redaktorzy, R. D. Gondour i R. L. Schowen pragnęli tą, przygotowaną od strony redakcyjnej bardzo logicznie i starannie, książką namówić czytelników-biochemików do rozpoczęcia pracy metodami fizyko-chemii, a fizyko-chemików do zajęcia się biochemią. Redaktorzy książki są orędownikami „biochemii mechanistycznej” a ponieważ autor recenzji jest również jej gorącym zwolennikiem, dlatego też poleca tę książkę wszystkim zainteresowanym biofizyką molekularną oraz zagadnieniami mechnizmów reakcji chemicznych.

A. Rabczenko

Enzymes of Lipid Metabolism

Red. S. Gatt, L. Freysz, P. Mandel

tom 101 z serii *Advances in Experimental Medicine and Biology*,
Plenum Press, 1978, New York, London, stron XIV + 791, cena 71,40 \$

Książka zawiera materiały sympozjum zorganizowanego przez jej redaktorów wiosną 1977 roku w Alzacji. Jak piszą we wstępie redaktorzy, celem tego spotkania było przedyskutowanie w szerokim gronie naukowców zajmujących się różnymi aspektami metabolizmu lipidów zagadnienia interakcji enzymów z substratami lipidowymi. Mniej uwagi poświęcono natomiast „klasycznym” problemom enzymologii jak izolacja i badanie struktury enzymów.

Materiał zebrany w książce (na którą składają się obok wykładów również i doniesienia sympozjalne) podzielony został według klas enzymów i reakcji, które one katalizują. Stosunkowo najbardziej heterogenna jest część pierwsza, w której zamieszczono doniesienia dotyczące enzymów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych i lipidów neutralnych. Cztery z przedstawionych prac w obrębie tej części dotyczą mechanizmu działania lipazy i co-lipazy trzustkowej. Pozostałe dotyczą różnych enzymów i zagadnień jak m. innymi mitochondrialnego i mikroosomalnego układów wydłużania łańcucha kwasów tłuszczowych w rozwoju mózgu,

roli hydrolazy tioestrów acylo-CoA w określaniu długości łańcucha kwasów tłuszczowych w tkance gruczołu mlecznego i wątrobowej, lipazy mikrosomów mózgu i zależnej od cyklicznego AMP lipazy tkanki tłuszczowej.

Część druga dotyczy enzymów biorących udział w metabolizmie fosfolipidów. Wyodrębniono tu fosfolipazy, enzymy biorące udział w biosyntezie fosfolipidów acylowych oraz eterowych. Do szczególnie ciekawych artykułów tej części zaliczyłbym artykuł omawiający zależność pomiędzy strukturą i aktywnością trzustkowej fosfolipazy A₂ (praca z pracowni Prof. de Haasa w Utrechcie, A. J. Slotboom i wsp.) oraz artykuły dotyczące kinetycznych własności tego enzymu w przypadku użytych mieszanich, fosfolipidowo-detergentowych micelli jako substratu (T. T. Allgyer i M. A. Wells, Tucson oraz E. A. Dennis, San Diego).

Część trzecia poświęcona jest sfingolipidom z wyodrębnieniem neuraminidaz, sfingomielinaz, hydrolaz glikolipidów i enzymów biosyntezy.

W części czwartej, ostatniej zamieszczone zostały teksty wykładów i doniesień dotyczące enzymatycznych defektów w chorobach zwanych sfingolipidozami — spowodowanych nagromadzeniem się określonych lipidów.

W sumie omawiana książka zawiera ogromną ilość informacji i jest cenną pozycją dla biochemika zajmującego się metabolizmem lipidów.

J. Zborowski

The Lipoprotein Molecule

Red. H. Peeters

NATO Advanced Study Institutes Series,

Series A: Life Sciences,

tom 15, 1978, Plenum Press (New York, London)

przy współpracy NATO Scientific Affairs Division,

stron IX + 301, cena 39 \$

Książka „The Lipoprotein Molecule” stanowi przegląd aktualnych problemów w zakresie prowadzonych badań nad lipoproteidami. Zebrane w niej materiały pochodzą ze spotkania zorganizowanego przez NATO Advanced Study Institute, które odbyło się w maju 1977 roku w Brugii. Książka podzielona jest na cztery działy. Trzy pierwsze działy dotyczą kolejno: metod izolacji i składu cząsteczek lipoproteidów, ich budowy oraz metabolizmu, dział czwarty poświęcony jest lipoproteidom w stanach patologicznych. Książkę zamyka krótki, podsumowujący rozdział napisany przez jej redaktora. Najbardziej rozbudowany jest dział pierwszy. Dwa z artykułów tego działu chciałbym wymienić. Jeden z nich dotyczy ilościowego oznaczania apolipoproteidów (P. N. Herbert i wsp., Providence i Bethesda), drugi zautomatyzowanego systemu jakościowego oznaczania lipoproteidów dla celów klinicznych (F. T. Lindgren, Berkeley). Spośród innych artykułów książki wyróżniłbym artykuł działu drugiego omawiający badania nad ustaleniem struktury lipoproteidów o wysokiej gęstości przy pomocy metod rezonansowych (H. Hauser, Zürich).

Warto może podkreślić, że wydanie tej książki zbiega się z pięćdziesięcioleciem podjętych przez Macheboeufa pierwszych badań nad składem lipoproteidów osocza i surowicy krwi.

J. Zborowski

DNA Synthesis — Present and Future

Red. I. Molineux, M. Kohijama

NATO Advanced Study Institutes Series, Seria A: Life Sciences, tom 17, Plenum Press, 1978, New York, London, stron 1161, \$ 90.—

Książka powstała z inicjatywy NATO Advanced Study Institutes i zawiera zbiór 75-ciu referatów przedstawianych w czerwcu 1977 roku w Santa Flawa na Sycylii. Materiały, opracowane w większości przez wybitnych badaczy z dziedziny genetyki, biologii molekularnej i biochemii stanowią, jak zaznaczono we wstępie, podsumowanie współczesnego stanu wiedzy o przebiegu syntezy DNA i działaniu kierujących nią mechanizmów kontrolnych — procesie złożonym i jakże istotnym dla zapoczątkowania wszelkich zjawisk metabolicznych w organizmach żywych. Oddano tu do rąk czytelnika szeroki i interesująco dobrany przegląd zagadnień dotyczących replikacji i naprawy DNA w genomie prokariotów jak i organizmów eukariotycznych.

Zebrane artykuły uporządkowane są w siedmiu działach tematycznych. W części pierwszej, poświęconej inicjacji i kontroli replikacji, autorzy zgodnie utożsamiają kontrolę pełnego przebiegu replikacji w genomach chromosomalnych, plazmidowych i wirusowych z wybiórczą kontrolą miejsca i czasu inicjacji syntezy DNA. Stanowisko to poparto licznymi dowodami dostarczonymi za pomocą metod biochemicznych i ultrastrukturalnych oraz na drodze analizy genetycznej. Dyskusja nad tym problemem przewija się przez wszystkie dalsze rozdziały książki. W rozdziale drugim, pt. „biosynteza chromosomalnego DNA”, omówiono niektóre zagadnienia dotyczące kontroli biosyntezy produktów pośrednich, niezbędnych dla syntezy i naprawy DNA. Rozdział trzeci poświęcono omówieniu procesów energetycznych, towarzyszących strukturalnym zmianom DNA w czasie replikacji. W nim też omówiono udział niektórych białek wiążących DNA: polimeraz, ligaz, nukleaz, niektórych białek bakteryjnych, jak również glikoproteidów, w ukształtowaniu się podwójnego heliksu skręcaniu i rozkręcaniu obu nici DNA, stopniu spiralizacji DNA i wreszcie stopniu kondensacji i dekondukcji chromatyny, które to procesy nierozdzielalne są z mechanizmami replikacji, naprawy, rekombinacji i transdukcji DNA. Białkom tym, ich strukturze i funkcji jaką spełniają w komórkach eukariotów i prokariotów poświęcono szczegółowo rozdział następny. W części piątej zgromadzono informacje dotyczące replikacji DNA wirusów i plazmidów, stanowiące przykłady złożoności i różnorodności tego procesu. Oddzielny rozdział omawia zagadnienia związane z naprawą DNA uszkodzonego działaniem czynników fizycznych i chemicznych. Mechanizmy naprawy, jakimi dysponują komórki bakteryjne i zwierzęce, są całkiem odrębne od mechanizmów replikacji i różnią się między sobą w różnych rodzajach komórek. Wymagają one oddzielnych układów enzymatycznych i podlegają specyficznym systemom kontrolnym. Przedstawione tu wyniki oparto na obserwacjach klinicznych i na badaniach prowadzonych na poziomie komórkowym i molekularnym. W ostatnim rozdziale, poświęconym syntezie *in vitro* przedstawiono różne układy modelowe stosowane do badań replikacji, jak np. oocyty *Xenopus laevis*, których wielkość pozwala na mikrochirurgiczne wprowadzenie do komórki dowolnego genomu prokariotycznego lub eukariotycznego, bądź tzw. komórki eterowe, przepuszczalne dla dNTP i NTP, stosowane w badaniach transkrypcji i replikacji komórek drożdżowych i bakteryjnych.

Zebrane w tej książce artykuły zawierają bogaty materiał doświadczalny i metodyczny ilustrowany licznymi schematami i wykresami dobrze dokumentującymi przedstawione koncepcje. Dyskusja, poparta szeroko danymi z literatury podsumo-

wuje każdorazowo omawiane zagadnienie. Książka reprezentuje poziom wysoce specjalistyczny i stanowi materiał warsztatowy dla stosunkowo wąskiego grona specjalistów.

B. Skoczyła

Structure and Biosynthesis of Antibodies

Consultant Bureau, 1977, New York, str. 367, \$ 42.—

Książka ukazała się w serii „Studies in Soviet Science” i stanowi przekład dzieła rosyjskiego, które ukazało się pod tym samym tytułem w r. 1972. W porównaniu do rosyjskiego oryginału książka została rozszerzona i unowocześniona, nie mniej cytowana literatura nie wybiega poza r. 1974. Książka liczy 367 stron i zawiera 7 rozdziałów w których autor omawia kolejno metody oznaczania i izolacji przeciwciał, ich właściwości, strukturę i biosyntezę oraz na końcu genetyczne aspekty biosyntezy przeciwciał. Wymienione zagadnienia są omówione w sposób przejrzysty i interesujący, często w aspekcie metodycznym i historycznym. Ten sposób wykładu sprawia, że czytelnik może wyrobić sobie własny pogląd na omawiane problemy. Niewątpliwym mankamentem jest brak indeksu co w znacznym stopniu ogranicza przydatność książki jako dzieła źródłowego. Brak ten jest w pewnym stopniu nadrobiony przez wykaz literatury zawierający pełne tytuły cytowanych artykułów. W sumie książka zasługuje na polecenie w szczególności czytelnikom pragnącym zdobyć podstawowe, a niekiedy najnowsze wiadomości o przeciwciałach, ich budowie i biosyntezie.

J. Kościelak

Prostaglandine and Thromboxanes

Red. F. Bertl, B. Samuelsson, G. P. Velo

NATO Advanced Study Institutes Series, Seria A: Life Sciences, tom 13, Plenum Press, 1976, New York, London, stron 449, cena \$ 54.—

Omawiana książka stanowi 13 tom serii wydawniczej Life Sciences NATO Advanced Study Institutes. W tomie tym zebrano materiały przedstawione na międzynarodowym kursie poświęconym Postępowi Badań nad Prostaglandynami, który odbył się w Centrum Szkoleniowym „Ettore Majorana” w Erice (Włochy) w dniach od 4 do 15 października 1976 r.

Na początku książki podany jest krótki rozdział dotyczący chemii prostaglandyn i tromboksanów, a następnie dość obszerny przegląd dotychczas stosowanych metod służących do ich oznaczania w płynach biologicznych i tkankach. W części tej omówiono szczegółowo metodę biologiczną, radioimmunologiczną, chromatografię gazową i spektrometrię masową. Godny podkreślenia jest udział w opracowaniu monografii prof. Ryszarda J. Gryglewskiego z Zakładu Farmakologii w Krakowie (Polska), który przedstawił skринingową metodę testowania związków jako potencjalnych inhibitorów biosyntezy prostaglandyn i tromboksanów. Ocena stopnia zahamowania biosyntezy prostaglandyn *in vitro* w tym teście może posłużyć do oceny skuteczności działania przeciwwzapalnego leku. Badaniem uzupełniającym jest ocena stopnia wią-

zania badanego inhibitora z hydrofobowymi grupami albuminy. Wskaźnik działania hamującego aktywność cyklo-oksigenazy i stopień wiązania inhibitora z albuminą pozwala wnioskować o aktywności badanych inhibitorów *in vivo*. Szczegółowe dane dotyczące inhibitorów syntetazy prostaglandynowej są zawarte w rozdziale opracowanym przez T. Y. Shen z Mere Sharp i Dohne Laboratorium z Rahway (USA).

W dalszej części książki poruszono zagadnienia związane z biosyntezą i metabolizmem prostaglandyn, cyklicznych nadtlenków i tromboksanów oraz ich rolę w żywym organizmie.

Szpecially interesujące dane można znaleźć w rozdziale poświęconym układowi oddechowemu i astmie oskrzelowej. Wyodrębnienie spośród chorych na astmę oskrzelową grupy osób wrażliwych na terapię aspiryną pozwoliło na powiązanie przyczynowe tego schorzenia z zahamowaniem biosyntezy prostaglandyn w śródmiąszkowej tkance płucnej.

Ciekawe informacje zawierają również rozdziały poświęcone układowi krążenia i naczynom. Wyniki przytaczanych badań dowodzą, że prostaglandyny serii E i A, podane dożylnie, działają rozkurczowo na naczynia. W przeciwieństwie do tego prostaglandyny serii F powodują skurcz naczyń i wzrost ciśnienia tętniczego, co przejawia się m.in. we wzroście stężenia PGF_2 w płynie mózgowo-rdzeniowym podczas skurczu tętnic mózgowych.

Wpływ prostaglandyn na czynność ośrodkowego układu nerwowego omówili R. Fumagalli i wsp. z Instytutu Farmakologii i Farmakognozji Uniwersytetu w Rzymie. Prostaglandyny i tromboksany powstają w tkance nerwowej i są z niej uwalniane pod wpływem różnych bodźców. Z pobudzonego układu nerwowego uwalniane są głównie prostaglandyny serii E a w stanie pobudzenia prostaglandyny serii F. Występowanie prostaglandyn w podwzgórzu w stosunkowo wysokich stężeniach ma związek z rolą jaką one odgrywają w regulacji w sekrecji hormonów przysadki. Prostaglandyny działają albo za pośrednictwem podwzgórzowych czynników uwalniających i hamujących albo bezpośrednio na przysadkę i kontrolują czynność osi podwzgórze—przysadka—nadnercza. Prostaglandyny stymulują uwalnianie ACTH, GH, FSH, TSH i prolaktyny przez przedni płat przysadki a następnie przedostają się do płynu mózgowo-rdzeniowego, gdzie można je oznaczyć ilościowo. Wyniki oznaczeń poziomu PGF_2 w płynie mózgowo-rdzeniowym mają znaczenie diagnostyczne i różnicowe w takich schorzeniach jak padaczka, zapalenie opon mózgowych i mózgu, udar mózgu.

Liczne schematy i zestawienia zawarte w książce ogromnie ułatwiają korzystanie z tej niezmiernie ciekawej monografii. Bardzo przystępny sposób przedstawienia zebranego materiału, obszerny przegląd piśmiennictwa, omówienie i dyskusja najnowszych osiągnięć w dziedzinie badań nad prostaglandynami i tromboksanami stanowi o dużych walorach tej pozycji wydawniczej.

E. Rosnowska

The Prostaglandins, tom 3

Red. P. W. Ramwell

Plenum Press, 1977, New York, London, stron 359, cena \$ 47,40.

Trzeci tom pt. „Prostaglandyny” wydany przez P. W. Ramwella stanowi cenne uzupełnienie dwóch poprzednio wydanych części. Składa się on z 10 rozdziałów poświęconych badaniom metodycznym oraz udziałowi prostaglandyn w czynności

fizjologicznej i procesach patologicznych dotyczących układu oddechowego, pokarmowego, sercowo-naczyniowego, endokrynnego i rozrodczego.

W części metodycznej obejmującej dwa pierwsze rozdziały dużo miejsca poświęcono nowoczesnym technikom wykrywania i identyfikacji prostaglandyn i ich metabolitów we krwi i moczu. Omówiono szczegółowo metodę chromatografii gazowej (GC) i spektrometrii masowej. Połączenie tych dwóch technik stanowi bardzo duży postęp w identyfikacji prostaglandyn w materiale biologicznym. Omówiono także szczegółowo metodę wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) pozwalającą na ilościowe oznaczenia prostaglandyn. Ilustracje zamieszczone w książce są dobrze dobrane i przekonujące. Następną metodą przydatną w badaniach ze względu na czułość i specyficzność jest metodą radioimmunologiczna (RIA). W metodzie wykorzystano współzawodniczenie prostaglandyny znakowanej trytem i nieznakowanej o wiązanie ze specyficznym przeciwciałem.

Opisane w rozdziale drugim badania poświęcone biosyntezie i metabolizmowi prostaglandyn wykonano właśnie przy użyciu radioimmunologicznego ich oznaczania. Omawiając biosyntezę prostaglandyn autorzy podkreślili rolę najważniejszego prekursora tych związków, a mianowicie kwasu arachidonowego (składnik fosfolipidów błon komórkowych uwalniany z nich pod wpływem różnych czynników). Jest on prekursorem zarówno prostaglandyn klasy E_2 jak i F_2 . Z błonami komórkowymi związany jest także układ syntetyzujący prostaglandyny. Niektóre leki przeciwzapalne, takie jak indometacyna i aspiryna są silnymi inhibitorami tego układu enzymatycznego. Najważniejszym enzymem biorącym udział w biologicznej inaktywacji prostaglandyn jest dehydrogenaza prostaglandynowa. Szczególnie obfitują w ten enzym płuca i nerki, w których właśnie przede wszystkim zachodzi biotransformacja prostaglandyn.

Rozdział trzeci poświęcony jest zagadnieniom wpływu prostaglandyn na układ dokrewny i roli cyklicznego AMP. Z przytoczonych danych jasno wynika, że prostaglandyny wpływają na czynność sekrecyjną podwzgórza i przysadki zarówno drogą stymulacji wydzielania hormonów podwzgórzowych, jak też na przysadkowe hormony tropowe. Prostaglandyny zwiększają uwalnianie LH, FSH, ACTH, GH i prolaktyny i w ten sposób wpływają na gruczoły wydzielania dokrewnego.

W rozdziale czwartym omawiającym wpływ prostaglandyn na narządy rozrodcze i udział w normalizacji porodu podano szczegółowe dane kliniczne oraz przytoczono obszerne dane porównawcze dotyczące dotychczas stosowanych konwencjonalnych środków stymulujących czynność porodową.

W rozdziale piątym omówiono hipotensyjny wpływ prostaglandyn i ich prekursorów na układ krążenia. Stwierdzono ponadto, że prostaglandyny E_1 i E_2 zwiększają wydatnie przepływ krwi przez naczynia wieńcowe podczas gdy F_1 i F_2 wzmagają przede wszystkim siłę skurczu mięśnia sercowego. Część ta stanowi krótki i zwarty zbiór najważniejszych faktów nagromadzonych w ostatnich latach. Dobrze dobrane piśmiennictwo stanowi o wartości tego krótkiego i interesującego opracowania.

Rozdział szósty jest poświęcony udziałowi prostaglandyn w procesach regulacji fizjologicznej ciepłoty i w wywołaniu gorączki. Przytoczone przez autorów eksperymenty sugerują, że prostaglandyny serii E mogą być naturalnymi mediatorami hipertermii. Podczas gdy mechanizm regulacji fizjologicznej ciepłoty ciała budzi w dalszym ciągu wiele wątpliwości.

Osobny rozdział poświęcono syntezie i katabolizmowi prostaglandyn w tkance płucnej. Badając grupy prostaglandyn F i E stwierdzono w płucach przewagę ilościową PGF_2 nad PGE_2 . Katabolizm prostaglandyn w płucach przebiega w kilku etapach, z których najważniejszym jest utlenienie grupy hydroksylowej przy C_{15} zachodzące przy współudziale prostaglandynowej dehydrogenazy. Wpływ grupy E i F prostaglandyn na mięśniówkę gładką oskrzeli jest przeciwstawny. Prostaglan-

dyny grupy F wywołują skurcz mięśniówki, natomiast seria E działa rozkurczowo. Autor rozważa możliwości udziału prostaglandyn grupy F i E w etiopatogenezie dychawicy oskrzelowej.

W rozdziale ósmym omówiono wpływ prostaglandyn na układ pokarmowy, zamieszczono w nim liczne dowody sugerujące wpływ tych związków na czynność wydzielniczą żołądka. Prostaglandyny podawane w iniekcji dożylniej powodują zahamowanie wydzielania soku żołądkowego i stąd znalazły zastosowanie w terapii choroby wrzodowej. Udział prostaglandyn w mechanizmie powstawania biegunek jest dotąd niejasny, chociaż hyperprostaglandynemia towarzyszy zwykle biegunkom w przebiegu cholery, raka rdzeniastego tarczycy, rakowiaka i innych.

Rozdział dziewiąty jest poświęcony udziałowi prostaglandyn w funkcji nerek. Autorzy tego rozdziału przeznaczyci dużo miejsca na omówienie procesów syntezy i katabolizmu prostaglandyn w nerce oraz ich roli w regulacji przepływu krwi przez nerkę i spadek oporów naczyniowych, podczas gdy prostaglandyny serii F nie wywołują tego efektu, lub mają efekt znikomy. Wpływ hypotensyjny prostaglandyn serii A i E został wykorzystany w leczeniu nadciśnienia.

Przedmiotem żywego zainteresowania jest udział prostaglandyn w procesach powstawania nowotworów. Znalazło to swoje odbicie w ostatnim rozdziale pt. Prostaglandyny a rak. Doświadczenia wykonane na zwierzętach wykazały, że prostaglandyny biorą udział w kontroli proliferacji komórek nowotworowych. Stwierdzono także, że inhibitory biosyntezy prostaglandyn mogą być pomocne w leczeniu hiperkalcemii towarzyszącej procesom nowotworowym oraz mogą zapobiegać osteolizie spowodowanej przerzutami raka.

Recenzowana książka stanowi obszerny przegląd dotychczasowych metod badawczych prostaglandyn oraz roli tych związków w funkcji poszczególnych narządów i układów oraz podkreśla możliwości zastosowania ich w praktyce. Stanowi ona cenną i interesującą pozycję wydawniczą dla tych wszystkich, którzy łączą problemy teoretyczne z praktyczną medycyną.

E. Rosnowska

Metal Toxicity in Mammals

Chemical Toxicity of Metals and Metalloids

Red. B. Venugopal and T. T. Luckey

Tom 2, Plenum Press, 1978, New York, str. 409, \$ 42.—

Omawiana książka stanowi drugi tom dzieła „Metal Toxicity in Mammals”. Pierwszy tom, poświęcony zagadnieniom ogólnej toksykologii metali, omówiono poprzednio (*Post. Biochem.* 3 (1978)). Tom drugi omawia szczegółową toksykologię metali i metaloidów. Książka zawiera dziewięć rozdziałów, z których pierwszych osiem poświęconych jest toksykologii metali i metaloidów według grup układu okresowego, rozdział dziewiąty stanowi próbę uogólnienia. Książka zawiera dodatek w postaci wykazu pierwiastków i ich cech fizycznych oraz tablic układu okresowego, a ponadto słownik wyrazów (terminów) specjalnych, który umożliwi śledzenie tekstu również niespecjaliście. Literatura podana na końcu książki obejmuje około 1250 pozycji, z których najwięcej pochodzi z lat 1968—1973. Tylko sporadyczne pozycje pochodzą z lat 1974—76.

Książka omawia w zasadzie tzw. chemiczną toksyczność metali (wykluczając radio-toksyczność), ograniczoną do związków nieorganicznych. Dla każdego oma-

wianego pierwiastka podano informacje o występowaniu, zastosowaniu, a także podstawowe dane chemiczne i jego rolę biologiczną. Informacje ściśle toksykologiczne obejmują wchłanianie, rozmieszczenie ustrojowe, kumulację i wydalanie metali oraz zagadnienia homeostazy, a także toksyczność ostrą, podostrą i przewlekłą oraz odległe efekty toksyczne, wraz z ich prawdopodobnym tłem biochemicznym. Dla celów porównawczych autorzy posługują się głównie danymi o toksyczności ostrej, wyrażonymi w molarnej skali pT ($pT = -\log T$). Pozwala to na logiczne śledzenie siły działania biologicznego w zależności od różnych czynników dyskutowanych w pracy (np. od drogi podania lub gatunku zwierząt). Poprzez odpowiednie zestawienia tabelaryczne autorzy podkreślają fakt, że nawet metale uważane za szczególnie toksyczne (np. Cd, Hg, Tl) nie należą do silnych trucizn w skali ogólnej, gdzie czołową pozycję zajmują trucizny pochodzenia biologicznego (dla przykładu, wartości pT dla botulin A, B, E są rzędu 11–15, podczas gdy dla soli rtęci zaledwie 4, 7). Duża waga, jaką przywiązuje się obecnie toksyczności metali, wynika z kontaminacji środowiska pracy i bytowania, która wykazuje tendencję rosnącą z rozwojem cywilizacji.

W omawianym tu drugim tomie autorzy konsekwentnie rozwijają tezę, postawioną w tomie pierwszym: Nie ma metali toksycznych i nietoksycznych, toksyczność jest funkcją dawki metalu. Dla większości metali i metaloidów można zaobserwować jakąś pozytywną rolę biologiczną przy umiarkowanych lub niskich dawkach. W tablicy (dodatek) wyróżniono 20 pierwiastków zdecydowanie niezbędnych, a ponadto 14 pierwiastków których biologiczna niezbędność jest prawdopodobna. Z pozostałych pierwiastków — 14 odgrywa w niskich dawkach pozytywną rolę z uwagi na właściwości stymulacyjne. Tak więc, dla większości lepiej rozeznaczonych pierwiastków można rozważać ich działanie biologiczne w funkcji dawki, do działania stymulacyjnego w dawkach niskich, poprzez terapeutyczne (jeśli istnieje) do toksycznego w dawkach wysokich.

Książka stanowi wartością pozycję i przyda się nie tylko wykładowcom toksykologii, lecz także toksykologom i biochemikom i badającym metaboliczną rolę metali.

J. K. Piotrowski

Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine, tom 1

Red. A. Frigerio,

Plenum Press, 1978, New York, stron 658, cena \$ 66.

W omawianej książce przedstawiono 52 prace prezentowane na „4th International Symposium on Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine”, które odbyło się w Riva del Garda we Włoszech w czerwcu 1977 roku. Książka ta stanowi kontynuację i rozszerzenie monografii „Mass Spectrometry in Drug Metabolism” opartej na materiałach Międzynarodowego Sympozjum „Mass Spectrometry in Drug Metabolism”, Mediolan 1976, recenzję której zamieszczono w *Postęпах Biochemii* **24**, (1978) 422–423.

Zaletą spektrometrii masowej jest stosowanie bardzo małych, śladowych ilości substancji badanych oraz możliwość automatyzacji w przypadku dłuższych serii pomiarów (np. przemysł, ochrona środowiska, medycyna). Spektrometria masowa umożliwia ustalanie struktury różnych związków chemicznych, jakościowe i ilościowe

badanie mieszanin, oznaczanie aktywności niektórych enzymów, badanie metabolizmu różnych substancji biologicznie czynnych. Tak szeroki zakres stosowalności metody zawdzięczamy połączeniu nowoczesnych technik spektrometrii masowej (np. *chemical ionization*, *field desorption* itd.) z chromatografią gazową i wysokociśnieniową chromatografią ciecząową oraz z techniką komputerową.

Zgromadzone w książce artykuły obejmują szeroki zakres zastosowań spektrometrii masowej w biochemii, medycynie, farmakologii i w ochronie naturalnego środowiska człowieka. Omówione są tu zastosowania spektrometrii masowej do badania metabolizmu różnych leków, charakterystyki dystrybucji leków i ich pochodnych w organizmie oraz ich wydalanie. Przedstawiono wykorzystanie spektrometrii masowej w medycynie do badania funkcji oddechowej, do ciągłego oznaczania parcjalnych ciśnień tlenu i dwutlenku węgla we krwi *in vivo*, w powietrzu wdychanym i wydychanym a także do badania metabolitów charakterystycznych dla różnych stanów chorobowych. W związku z wielką wagą przykładaną obecnie w pediatrii do genetycznie uwarunkowanych zaburzeń metabolicznych, które po opanowaniu chorób zakaźnych są jednym z najważniejszych problemów, interesujące wydaje się być oznaczanie *in vivo* aktywności enzymu hydroksylazy fenyloalaniny u heterozygot fenyloketonurii metodą spektrometrii masowej. Metodę tą można stosować ogólnie do oznaczania aktywności enzymów z grupy monoooksygenaz. Szereg artykułów poświęconych jest zagadnieniom ochrony naturalnego środowiska człowieka. Dla osób pamiętających, szeroko opisywany w masowych środkach przekazu, wypadek w Seveso we Włoszech, gdzie 10 lipca 1976 roku bardzo gęsto zaludniony obszar został skażony jedną z najbardziej toksycznych substancji, a mianowicie TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin), interesujące będą artykuły opisujące zastosowanie spektrometrii masowej do identyfikacji i pomiarów ilościowych TCDD w tkankach zwierząt i w gazach po spaleniu skażonego materiału roślinnego. Poza tematami wymienionymi powyżej, poruszane są zagadnienia ustalania struktury różnych związków, badania stereoizomerii, zagadnienie komputeryzacji pomiarów i analizy wyników, aparatura itp.

W poszczególnych artykułach podane są warunki pobierania i przygotowywania materiału, jego ewentualna obróbka, warunki pomiaru i aparatura. Bogata bibliografia, duża liczba zamieszczonych widm, szeroki zakres poruszanych tematów czynią tą książkę godną polecenia dla lekarzy, farmakologów, biochemików i chemików. Należy mieć nadzieję, że książka ta przyczyni się do szerszego wprowadzenia spektrometrii masowej w naszych laboratoriach i klinikach.

T. Mańkowski

Oxygen Transport to Tissue, tom 2

Red. J. Grote, D. Reneau, G. Thews

Plenum Press, 1976, London, New York, stron 782, cena \$ 59,40.

Książka, stanowiąca 75 tom serii „Advances in Experimental Medicine” wydanej przez Plenum Press, zawiera materiały II Sympozjum Międzynarodowego Towarzystwa Transportu Tlenu do Tkanek, poświęcone tej problematyce.

Materiały ujęte są w 13 rozdziałach, odpowiadających sesjom Sympozjum, poświęconym różnym aspektom problemu. Zawierają one oryginalne referaty i doniesienia prezentowane na Sympozjum, wraz z dokumentacją wyników przedsta-

wianych badań oraz streszczenie dyskusji, przygotowane przez specjalistę, który przewodniczył obradom odpowiedniej sesji.

Poszczególne rozdziały omawiają: (1) pomiary tlenu we krwi, (2) utlenowanie krwi, (3) oddychanie tkankowe, (4) dyfuzję tlenu we krwi i w tkankach, (5) modele matematyczne transportu tlenu we krwi i w tkankach, (6) zaopatrzenie w tlen ośrodkowego układu nerwowego (dwa rozdziały), (7) zaopatrzenie w tlen różnych narządów, (8) wspólne aspekty zaopatrzenia w tlen, (9) wymianę oddechową gazów i metabolizm tkanki nowotworowej (dwa rozdziały), (11) zaopatrzenie w tlen tkanki mięśniowej oraz (12) perinatalne zaopatrzenie w tlen.

Jak widać to już z zestawienia zawartości książki, obejmuje ona właściwie wszystkie podstawowe aspekty transportu tlenu w organizmie.

W rozdziale dotyczącym technik pomiarowych zwraca uwagę propozycja metodyki jednoczesnej rejestracji lokalnej tkankowej prężności tlenu i aktywności bioelektrycznej tkanki nerwowej, opis techniki przeżyciowej lokalizacji elektrody tlenowej w badanej tkance (kłębek szyjny), propozycja metody stałe napotykanego na bardzo duże trudności ciągłego rejestrowania P_{O_2} we krwi ludzi (autorzy stosują pomiar w sztucznym zespoleńiu tętniczo-żylnym), nadająca się również do prac doświadczalnych. Nowe możliwości pomiaru wewnątrzkomórkowego stężenia tlenu *in situ* rokuje opisana w jednej z prac metoda z wykorzystaniem kwasu pyrenomasłowego (PBA) (tłumienie fluorescencji w obecności tlenu).

Ponadto przedstawione są różne inne techniczne zagadnienia pomiarów tlenu w tkankach.

W drugim rozdziale zaleźć można nowe informacje o mechanizmie wpływu DPG na metabolizm erytrocytów i ich funkcję transportu tlenu, o wpływie zmian hematokrytu na transport tlenu w organizmie i in.

Kolejny rozdział przedstawia szereg aktualnych zagadnień komórkowej kontroli oddychania mitochondrialnego związku powinowactwa hemoglobiny do tlenu i zaopatrzenia tkanek w tlen, dysocjacji oksyhemoglobiny krwi ptaków i in.

Istotne dane dotyczące zagadnień dyfuzji tlenu w organizmie zawiera dalsza część książki. Szczególnie interesujące są prace poświęcone „ułatwionej” (facilitated) dyfuzji tlenu i jej przebiegu w obecności hemoglobiny i mioglobiny oraz matematycznej analizie procesu.

Próby matematycznego modelowania oddechowej funkcji krwi i dyfuzji tlenu w tkankach zarysowują nowy kierunek opisu tych procesów. Ciekawa jest propozycja matematycznego modelowania transportu tlenu w niedokrwiłości oraz stochastycznego modelu transportu tlenu do mózgu.

Duża grupa prac poświęcona jest różnym aspektom transportu i utylizacji tlenu w mózgu w normie i doświadczalnej patologii. Na uwagę zasługuje tu m.in. praca dotycząca mózgowej reakcji tkankowej na wstrząs, hipoksję i udar, praca kwestionująca związek między wzrostem mózgowego przepływu krwi a kwasicią mleczanową w hipoksji oraz podkreślająca znaczenie neurogennej kontroli mózgowych naczyń oporowych. Nowe i ważne dane przynosi praca dotycząca zmian rozmieszczenia jonów w mózgu w wyniku anoksji oraz farmakologicznej analizy autoregulacji prężności tlenu w mózgu, z koncepcją „tkankowego czujnika tlenowego” i in.

W innej części książki omówione są szczegółowe zagadnienia transportu tlenu do różnych tkanek (rogówka, siatkówka, nerki i in.).

W kolejnym rozdziale przedstawione są m.in. nowe dane dotyczące heterogenności komórek pod względem cech rozpuszczalności tlenu i czynników fizycznych determinujących wysokie stężenie tlenu w mitochondriach, zapotrzebowanie na tlen tkanki płucnej, zagadnienie funkcji chemoreceptorów zatokowych w warunkach hipoksji bez hiperkapnii, bardzo interesujące dane przemawiające przeciw koncepcji lokalnej kontroli zaopatrzenia jelit w tlen z udziałem mechanizmu miogennego i in.

Liczne prace dotyczą wymiany gazowej w tkance nowotworowej.

W części dotyczącej zaopatrzenia w tlen mięśni zwracają uwagę m.in. badania dotyczące roli unerwienia mięśni w zapoczątkowywaniu i podtrzymywaniu wazodilatacji związanej z ich skurczami, badania opisujące „spontaniczne” oscylacje prężności tlenu w tkance mięśniowej, dotyczące zmian mikrokrążenia w mięśniu sercowym w warunkach hipoksji i hiperkapnii. Badania nad związkiem zaopatrzenia tkanek w tlen i geometrią kapilarów podnoszą bardzo istotną i dyskusyjną kwestię fizjologicznego znaczenia anastomoz w łożysku kapilarnym.

Reasumując: recenzowana książka jest dziełem przedstawiającym bardzo cenny materiał doświadczalny i poglądy na temat transportu tlenu do tkanek. Książka zawiera wiele danych orientujących w postępie metodycznym w tej dziedzinie a zarazem informuje o aktualnych kierunkach badań dotyczących problemu o kapitalnym znaczeniu poznawczym, a niejednokrotnie również praktycznym.

Wartość książki podnosi zwartość tekstu oraz eksponowanie zagadnień dyskusyjnych i hipotez. Książka powinna znaleźć się w bibliotece każdego zakładu fizjologii, wielu zakładów biochemii i patologii (problemy hipoksji) i w każdej klinice prowadzącej badania doświadczalne na zwierzętach. Przy takich badaniach prawie zawsze wyłania się bezpośrednio lub pośrednio problem zaopatrzenia tkanek w tlen.

S. Kozłowski

SPIS TREŚCI

Do Autorów i Czytelników od Redakcji i Rady Redakcyjnej <i>Postępów Biochemii</i>	115
K. Kaletka — Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej przy użyciu scałkowanej postaci równania szybkości reakcji	119
M. Wilk, A. B. Wojtczak — Metabolizm aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym	141
I. Borkowska — Metabolizm aminokwasów i białek mózgu w przebiegu fenylketonurii	159
W. Makarewicz — Cykliczna przemiana nuleotydów purynowych	169
A. Przykorska — Specyficzność roślinnych enzymów degradujących DNA	197
J. Kopcewicz — Fitochrom jako receptor światła w procesach fotomorfogenezy roślin	211
K. Worowski, W. Roszkowska — Ziemiaczane inhibitory proteaz	229
Nowe w biochemii	
Peter Mitchell laureatem nagrody Nobla. Teoria chemiosmotyczna (L. Wojtczak)	247
Werner Arber, Daniel Nathans, Hamilton Smith — Nagrody Nobla za badania nad enzymami restrykcyjnymi (A. Piekarewicz)	251
Zwielokrotnienie zwierzęcego genu, jego klonowanie i ekspresja w komórce bakteryjnej (M. Fikus i Z. Zielińska)	254
Chemiczna synteza genu insuliny ludzkiej i jego ekspresja w komórkach <i>Escherichia coli</i> (A. Kraszewski)	257
Kronika z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	259
Sprawozdanie — IV Międzynarodowe Sympozjum pt. „Chemia i Biologia Pterydyn”, La Jolla (B. Grzelakowska-Sztabert)	263
Recenzje książek	
Horizons in Biochemistry and Biophysics, t. 5	265
Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells	266
Transition States of Biochemical Processes	269
Ezymes of Lipid Metabolism	270
The Lipoprotein Molecule	271
DNA Synthesis — Present and Future	272
Structure and Biosynthesis of Antibodies	273
Prostaglandins and Thromboxanes	273
The Prostaglandins, t. 3	274
Metal Toxicity in Mammals, t. 2	276
Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine, t. 1	277
Oxygen Transport to Tissue, t. 2	278
Komunikaty	140, 196, 210, 262

Dr.

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

POSTĘPY BIOCHEMII

June 1979

ARTICLES IN POLISH

VOLUME 25

Number 2

Editorial	115
K. Kaletha — Evaluation of the Kinetic Constants of Enzyme-Catalysed Reaction with the Use of Integrated Rate Equation (Dept. Biochem., Inst. Biol. Med., School of Medicine, Gdańsk)	119
M. Wilk, A. B. Wojtczak — Metabolism of Branched-chain Amino Acids (Dept. Horn. Drug, Drug Inst., Warszawa: Dept. Cellular Biochem., Inst. Exp. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	141
I. Borkowska — Brain Amino Acids and Protein Metabolism in Phenylketonuria (Inst. Physiol Chem., School of Medicine, Lublin)	159
W. Makarewicz — The Purine Nucleotide Cycle (Dept. Biochem., Inst. Biol. Med., School of Medicine, Gdańsk)	169
A. Przykorska — Specificity of Plant Enzymes Degrading DNA (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci, Warszawa)	197
J. Kopcewicz — Phytochrome as a Photoreceptor in Plant Photomorphogenesis (Dept. Plant Physiol. Inst. Biol., N. Copernicus University, Toruń)	211
K. Worowski, W., Roszkowska — Potato Inhibitors of Proteases (Dept. Anal. Chem., Inst. Biochem. and Med. Anal., School of Medicine, Białystok)	229
Biochemical News	247
Meeting Reports	263
Book Reviews	265
Announcements 140, 196, 210,	262

Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzania poprawek nie wpływających na treść pracy.

Piśmiennictwo: w artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawionej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nieuporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), **276**, (1) np.

Pipa J. P., Buchanan F. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **247**, 181—184.

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, np.

Dixon M., Webb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Longmans Green and Co., London;

Grant J. K., (1969) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1—58; Academic Press, London

Załączniki: każdy załącznik należy sporządzić w 2 egz. na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście, oraz oznaczyć (na górze strony ołówkiem) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk powinny jasno opisywać ich treść zaznaczając, z jakich (jakiej) pracy(zy) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny, tj. wykresy, rysunki, schematy lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzory cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca.

Podpisy i objaśnienia pod rycinami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można wpisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem.

Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku prac wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów do artykułu przeznaczonego do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

Redakcja prosi o właściwe pakowanie artykułów, aby zabezpieczyć maszynopisy i ilustracje przed pogięciem.

SPIS TREŚCI

Do Autorów i Czytelników od Redakcji i Rady Redakcyjnej <i>Postępów Biochemii</i>	115
K. Kaletha — Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej przy użyciu scałkowanej postaci równania szybkości reakcji	119
M. Wilk, A. B. Wojtczak — Metabolizm aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym	141
I. Borkowska — Metabolizm aminokwasów i białek mózgu w przebiegu fenylketonurii	159
W. Makarewicz — Cykliczna przemiana nukleotydów purynowych	169
A. Przykorska — Specyficzność roślinnych enzymów degradujących DNA	197
J. Kopcewicz — Fitochrom jako receptor światła w procesach fotomorfogenezy roślin	211
K. Worowski, W. Roszkowska — Ziemniaczane inhibitory proteaz	229
Nowe w biochemii	
Peter Mitchell laureatem nagrody Nobla. Teoria chemioosmotyczna (L. Wojtczak)	247
Werner Arber, Daniel Nathans, Hamilton Smith — Nagrody Nobla za badania nad enzymami restrykcyjnymi (A. Piekarewicz)	251
Zwielokrotnienie zwierzęcego genu, jego klonowanie i ekspresja w komórce bakteryjnej (M. Fikus i Z. Zielińska)	254
Chemiczna synteza genu insuliny ludzkiej i jego ekspresja w komórkach <i>Escherichia coli</i> (A. Kraszewski)	257
Kronika z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	259
Sprawozdanie — IV Międzynarodowe Sympozjum pt. „Chemia i Biologia Pterydyn”, La Jolla, U.S.A. (B. Grzelakowska-Sztabert)	263
Recenzje książek	
Horizons in Biochemistry and Biophysics, t. 5	265
Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells	266
Transition States of Biochemical Processes	269
Enzymes of Lipid Metabolism	270
The Lipoprotein Molecule	271
DNA Synthesis — Present and Future	272
Structure and Biosynthesis of Antibodies	273
Prostaglandins and Thromboxanes	273
The Prostaglandins, t. 3	274
Metal Toxicity in Mammals, t. 2	276
Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine, t. 1	277
Oxygen Transport to Tissue, t. 2	278
Komunikaty	140, 196, 210, 262