

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

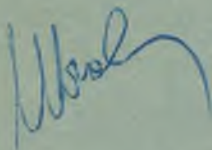
# POSTĘPY BIOCHEMII

1967

tom 13

nr 3

KWARTALNIK



<http://rcin.org.pl>

## INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1967  
tom XIII  
zeszyt 3

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE  
<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

*Przewodniczący:* B. Filipowicz (Łódź)

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

Komitet Redakcyjny

*Redaktor* — Zofia Lassota

*Sekretarz* — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1967

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| Nakład 1510 (1372+138)                   | Oddano do składania 19. IV. 1967   |
| Ark. wyd. 13,5; ark. druk. 11,5 + 2 kol. | Podpisano do druku w sierpniu 1967 |
| Papier druk. sat. kl. V, 70×10d          | Druk ukończono w sierpniu 1967     |
| Cena zł 20.—                             | Zam. nr 660/67. T-75.              |

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

WACŁAW HENDRICH\*

**Struktura chloroplastów a biochemia fotosyntezy****Structure of Chloroplasts and Biochemistry of Photosynthesis**

A review concerning structure of chloroplasts, their composition, and function of components as well of the photosynthetic apparatus is presented.

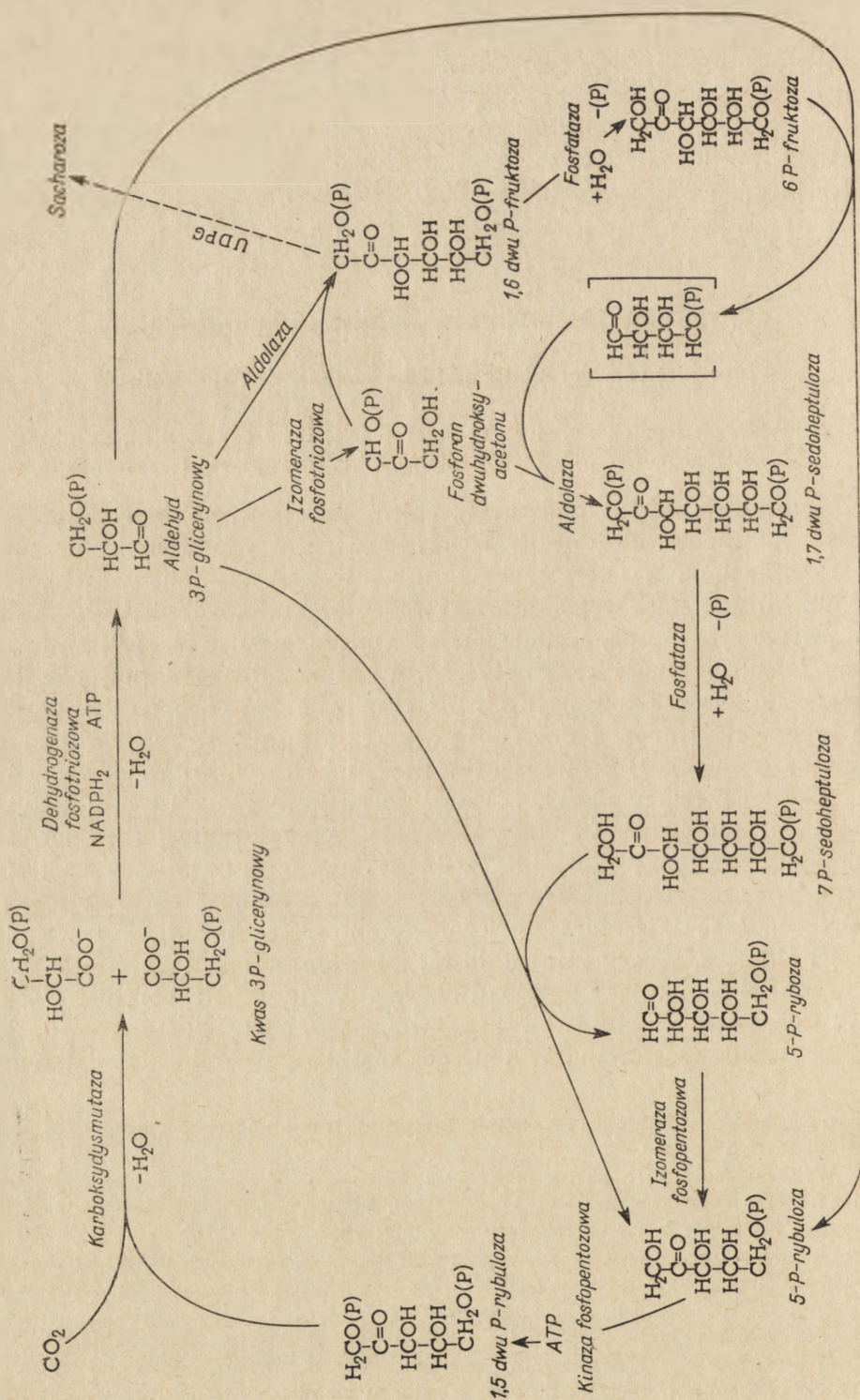
Fotosynteza jest złożonym zespołem procesów, w którym energia promieniowania widzialnego, absorbowana przez odpowiednie barwniki, jest zamieniana w energię chemiczną i wykorzystywana w reakcjach redukcji dwutlenku węgla do węglowodanów i utlenienia wody do tlenu. W zespole tym można, zgodnie z wynikami A r n o n a (4, 124), wydzielić fazę fotochemiczną i enzymatyczną. W fazie fotochemicznej powstają pewne ilości zredukowanego NADP oraz ATP. W fazie enzymatycznej te źródła elektronów i energii są wykorzystywane w reakcjach cyklu Calvina (rysunek 1) prowadzących do redukcji CO<sub>2</sub> do węglowodanów.

R a c k e r (96) wykazał, że sześć pierwszych reakcji cyklu Calvina można przeprowadzić *in vitro*. Zastosował on mieszaninę enzymów zawierającą karboksylazę rybulozodwufosforanu, kinazę rybulozofosforanu, izomerazę i epimerazę pentozofosforanów, kinazę glicerofosforanu, dehydrogenazę i izomerazę triozofosforanów, transketolazę, transaldolazę i aldolazę. Wprowadzając do tej mieszaniny nadmiar ATP, NADH<sub>2</sub> (lub NAD i redukujący go układ enzymatyczny) oraz rybozo-5-fosforan, H<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>, Racker zaobserwował zużywanie się H<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub> oraz gromadzenie się heksozodwufosforanu. W ten sposób w bezpośrednim doświadczeniu

---

\* Dr, adiunkt Zakładu Biochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław.

Wykaz stosowanych skrótów: DPIP i DPIP<sub>H2</sub> — 2,6-dwuchlorofenolindofenol i jego forma zredukowana; PQ, PQA(=PQ9), PQB, PQC, PQD, PQ3 — plastochinony; α-TQ, β-TQ, γ-TQ — tokoferyllochinony; UQ6, UQ10 — ubichinony; CMU — 3-*p*-chlorofenylo-1,1-dwumetylomocznik; DCMU — 3,(3,4-dwuchlorofenylo)-1,1-dwumetylomocznik; NQNO — *N*-tlenek 2-*n*-nonylo-4-hydroksychinoliny; BDHB — *n*-butylo-3,5-dwujodo-4-hydroksybenzoesan; *p*-CF<sub>3</sub>O-CCP — *p*-trójfluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu; TMQ i TMQH<sub>2</sub> — trójmetylochion i jego forma zredukowana; TMPD — tetrametylo-*p*-fenylenodwuamina; PMS i PMS<sub>zred.</sub> — metylosiarczan *N*-metylofenazyny i jego forma zredukowana; Ca — chlorofil *a* (z podanym obok maksimum absorpcji (w nm) w czerwonym paśmie).



Rys. 1. Cykl Calvina wg (27)

udowodniono, że redukcja CO<sub>2</sub> do węglowodanów nie wymaga żadnej struktury nadmolekularnej. Wynik ten potwierdzili Trebst i wsp. (124) wykazując, że wiązanie CO<sub>2</sub> może przebiegać w ciemności, w rozpuszczalnym w wodzie wolnym od chlorofilu wyciągu z chloroplastów.

Inaczej przedstawia się związek funkcji i struktury aparatu fotosyntetycznego, odpowiedzialnego za absorpcję promieniowania i przemianę jego energii w energię chemiczną. Współczesny stan badań fotosyntezy pozwala przypuszczać, że warunkiem przebiegu fazy fotochemicznej jest zachowanie pełnej struktury odpowiedniej części komórki.

W artykule tym zajmiemy się omówieniem struktury, składu i funkcji tej części komórki.

### I. Struktura chloroplastów i chromatoforów

Pierwszych informacji o strukturze chloroplastów dostarczyły badania, prowadzone przy pomocy zwykłego mikroskopu. Metodą tą ustalono, że: 1. cały chlorofil jest zgromadzony w chloroplastach wyższych roślin lub chromatoforach bakterii, 2. niektóre chloroplasty zawierają kuliste zagęszczenia — „grana”, 3. chloroplasty wykazują ujemną dwójłomność — charakterystyczną dla jednoosiowych kryształów, można więc przypuszczać, że istnieje w nich submikroskopowa struktura laminarna, 4. chloroplasty wykazują zjawisko osmozy, muszą więc posiadać na swej powierzchni błonę.

Dopiero jednak zastosowanie nowych metod badania, głównie mikroskopii elektronowej, umożliwiło dokładniejsze poznanie struktury. Wyniki tych badań przedstawimy na przykładzie struktury chloroplastów glonu *Chlamydomonas* (107).

Chloroplast jest otoczony podwójną błoną, w której nie ma żadnych kanałów ani otworów. Do błony nie przylegają żadne elementy strukturalne. Wewnątrz chloroplastów znajdują się zgrupowania błon, zwanych lamellami. Pary lamelli połączone są ze sobą końcami tak, że każda para tworzy zamknięty dysk. W lamellach zgromadzony jest cały chlorofil. Przestrzeń na zewnątrz dysków jest wypełniona przez *matrix* (dawniej zwaną *stroma*). W *matrix* zawieszono są krople lipidów oraz pirenoid, otoczony ziarnkami skrobi. Pirenoid jest zagęszczeniem proteidów o dużym współczynniku załamania światła.

Według Frencha (43) pirenoid jest połączony z otaczającymi go dyskami siecią kanalików. Można przypuszczać, że kanalikami tymi przenoszą się pierwotne produkty fotosyntezy od dysków do pirenoidu, gdzie następuje synteza skrobi. Rozmieszczenie dysków w chloroplastcie może wykazywać różny stopień uporządkowania. U roślin wyższych często obserwuje się zespoły kilku do kilkunastu równolegle ułożonych dysków, zwane granami. W takich chloroplastach zaobserwowano kana-

liki, łączące dyski jednego granum z dyskami drugiego, sąsiedniego granum.

Wpływ braku określonych składników na strukturę oraz na funkcję fotosyntetyczną komórki, pozwalają ocenić badania mutantów szczepu *Chlamydomonas*: żółtego i bladeo-zielonego (106). Zawartość chlorofilu i karotenoidów w normalnych, zielonych komórkach oraz w obu mutantach *Chlamydomonas* przedstawia tablica 1. Żółty mutant jest pozbawiony chlorofilu, zawiera natomiast normalną liczbę drobin karoteno-

Tablica 1

Zawartość chlorofilu i karotenoidów w normalnych komórkach oraz w mutantach *Chlamydomonas* (wg 106)

|   | normalna zielona komórka<br>która wyrosła |                    | bladezielony<br>mutant w<br>ciemności | żółty<br>mutant w<br>ciemności |
|---|---|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
|   | na świetle                                | w ciemności        |                                       |                                |
| Liczba drobin chlorofilu<br>w 1 komórce     | $2,84 \times 10^9$                        | $1,85 \times 10^9$ | $1,55 \times 10^8$                    | —                              |
| Liczba drobin karotenoi-<br>dów w 1 komórce | $1,92 \times 10^8$                        | $4,67 \times 10^8$ | $8,7 \times 10^5$                     | $2,8 \times 10^8$              |
| Stosunek<br>chlorofil/karotenoidy           | 14,8                                      | 3,96               | 178                                   | —                              |
| Stosunek<br>chlorofil/ $\beta$ -karoten     | 23,6                                      | 6,9                | 241                                   | —                              |

idów oraz wszystkich innych składników. W ciemności można go hodować na pożywce zawierającej octan. Na świetle szybko przebiegająca synteza chlorofilu powoduje przejście żółtego mutantu w normalną formę. Na elektronowych mikrofotografiach komórek żółtego mutantu widoczne są pojedyncze, nieuporządkowane banieczki, zawierające prawdopodobnie surowiec do budowy dysków. Normalna struktura dysków i gran powstaje dopiero po nagromadzeniu chlorofilu, co wskazuje, że jest on istotnym składnikiem błon dysków.

Blado-zielony mutant zawiera około 20 razy mniej chlorofilu od normalnego szczepu, przy czym chlorofil *a* stanowi około 90% całkowitej zawartości chlorofilu, podczas gdy w normalnej komórce stanowi on około 62—68%. Mutant ten zawiera też znacznie mniej karotenoidów (około 0,25% normalnej zawartości karotenu) i jest zupełnie pozbawiony ksantofilu. Porównanie ze szczepem normalnym wykazało, że bladeo-zielony mutant ma normalne dyski, ale jest ich znacznie mniej, oraz że komórki mutantu zawierają znacznie więcej mitochondriów.

Blado-zielony mutant jest zdolny do prowadzenia fotosyntezy: na świetle pochłania  $\text{CO}_2$  i wydziela  $\text{O}_2$ . W przeliczeniu na jedną drobinę chlorofilu procesy te przebiegają intensywniej, niż w normalnym szczepie. Pod działaniem światła, a także przy aeracji komórek zachodzi utle-



nianie nukleotydów pirydynowych oraz cytochromów b, c i f. Nie stwierdzono natomiast zmian absorpcji w zakresie 510—520 nm występujących w widmach różnicowych (światło-ciemność) normalnych komórek. Zmiany te należałoby przypisać karotenoidom, które nie grają istotnej roli w samym procesie fotosyntezy.

Równoległe z badaniami struktury chloroplastów roślin wyższych badano strukturę chromatoforów bakteryjnych, którą przedstawimy na przykładzie chromatoforów *Chromatium*, opisanych przez Bergerona (13). Chromatofory są strukturami hydrofilnymi, nie zmieniającymi się w czasie liofilizacji ani pod krótkotrwałym wpływem ultradźwięków. Działaniem rozpuszczalników denaturujących można uwolnić z nich barwniki. Na podstawie gęstości i stałej sedymentacji chromatoforów obliczono, że ich średnica wynosi około 320 Å, a ciężar cząsteczkowy — około 13 000 000. Skład chromatoforów podano w tablicy 2.

T a b l i c a 2

Skład chromatoforów po liofilizacji wg (13)

| Składnik          | %    | ciężar cząsteczkowy | ilość drobin na 1 chromatofor | stosunki molowe |
|-------------------|------|---------------------|-------------------------------|-----------------|
| Karotenoidy       | 1,5  | 700                 | 300                           | 1               |
| Bakteriochlorofil | 4,2  | 900                 | 600                           | 2               |
| Fosfolipidy       | 22,3 | 900*                | 3000                          | 10              |
| Białko            | 61,0 | 120**               | 67000***                      | 220             |
| DNA               | 0    |                     |                               |                 |
| RNA               | 0    |                     |                               |                 |
| Inne              | 11,0 |                     |                               |                 |

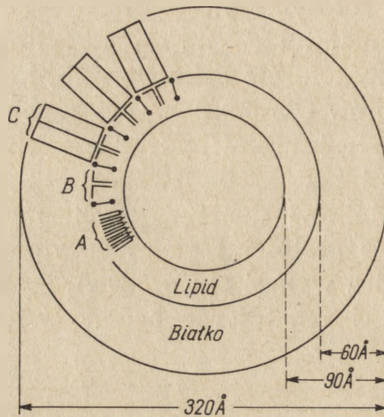
\* głównie kefaliny, zawierające kwas tłuszczowy C<sub>16</sub>

\*\* w przeliczeniu na średnią resztę aminokwasową

\*\*\* liczba reszt aminokwasowych

Minimalna jednostka, składająca się z 1 drobinę karotenoidu, 2 — bakteriochlorofilu, 10 — fosfolipidów i 220 reszt aminokwasowych miałaby ciężar cząsteczkowy około 40 000. Jeśli założyć, że cytochromy i nukleotydy pirydynowe są też stałymi składnikami minimalnej jednostki, byłaby ona jeszcze 5—10 razy większa. Na podstawie elektronowych mikrofotografii ustalono, że średnica chromatoforu istotnie wynosi około 300 Å, oraz że środek chromatoforu bardziej pusty dla elektronów, otoczony jest ciemniejszym pierścieniem grubości około 60 Å. Hydrofilny charakter chromatoforu, jego wysoka aktywność enzymatyczna oraz stabilność względem niedenaturujących rozpuszczalników wskazują na białkowy charakter warstwy zewnętrznej. Na podstawie tego materiału doświadczalnego Bergeron podał hipotetyczną strukturę chromatoforów (rysunek 2).

Warstwa białkowa chromatoforu zawiera cząsteczki o formie podwójnej  $\alpha$ -spiral, zbudowane z 220 reszt aminokwasowych. Struktura ta jest usztywniona wiązaniami S-S. Za udziałem tych wiązań w utrzymaniu



Rys. 2. Struktura chromatoforu wg (12):

- A — monomolekularna warstwa fosfolipidów
- B — barwniki
- C — drobiny białka

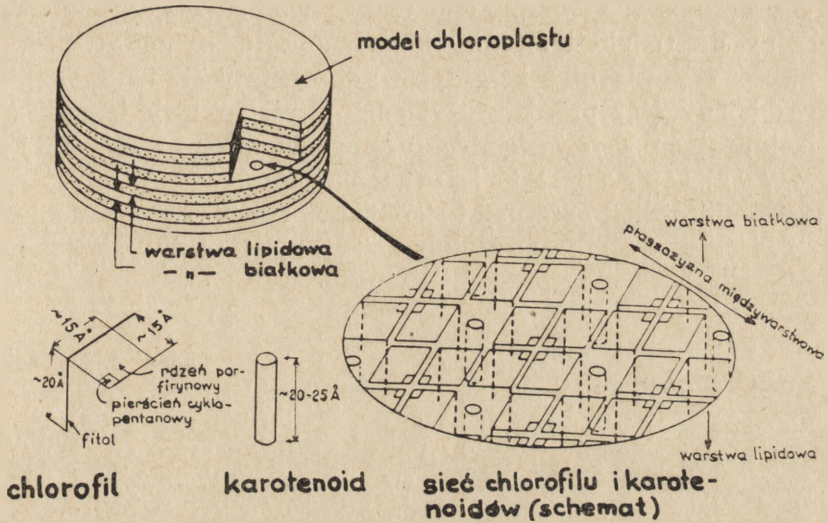
struktury chromatoforów przemawia rozpad chromatoforu na mniejsze podjednostki pod działaniem HCN, osłabiającego wiązania S-S oraz znikanie pasm 850 i 890 nm pod działaniem trypsyny przy czym widmo staje się podobne do widma mieszaniny barwników *in vitro*. Po krótkotrwałym działaniu trypsyny widmo barwników regeneruje się pod wpływem cysteiny.

## II. Struktura lamelli

Wewnętrzną strukturę lamelli badano w mikroskopie elektronowym, jednakże metody przygotowywania preparatów silnie zakłócały naturalną strukturę. Dlatego też zastosowano inne metody, głównie optyczne: badanie dwójłomności preparatów, anizotropii absorpcji i polaryzacji fluorescencji. Na podstawie uzyskanych tymi metodami wyników zaproponowano różne modele struktury lamelli.

Badania pod mikroskopem elektronowym i metodą dyfrakcji promieni Röntgena wykazały, że chloroplasty zawierają dyski grubości około 200 Å, złożone z dwóch lamelli. Warstwa zewnętrzna lamelli jest mniej przenikliwa, ma grubość około 50 Å. Na podstawie danych o zawartości chlorofilu w chloroplaście oraz o geometrii chloroplastu i drobin chlorofilu Wolken i Schwertz (142) obliczyli rozmieszczenie drobin chlorofilu i karotenoidów. W proponowanym przez nich modelu chloro-

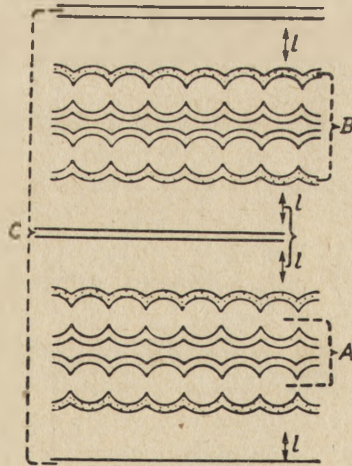
plastu (rysunek 3) cząsteczki chlorofilu ułożone są warstwą monomolekularną na granicy faz między warstwą lipidową a wodno-białkową, przy czym skierowane są hydrofobowymi łańcuchami fitolowymi do warstwy lipidowej, a hydrofilnymi rdzeniami porfirynowymi do warstwy wodno-białkowej.



Rys. 3. Struktura chloroplastów wg (142)

Przestrzenie wolne między drobinami chlorofilu są wypełnione cząsteczkami karotenoidów.

Według obliczeń tych autorów, hipotetyczny ciężar cząsteczkowy kompleksu chlorofilowego, zawierającego 1 drobinę chlorofilu powinien



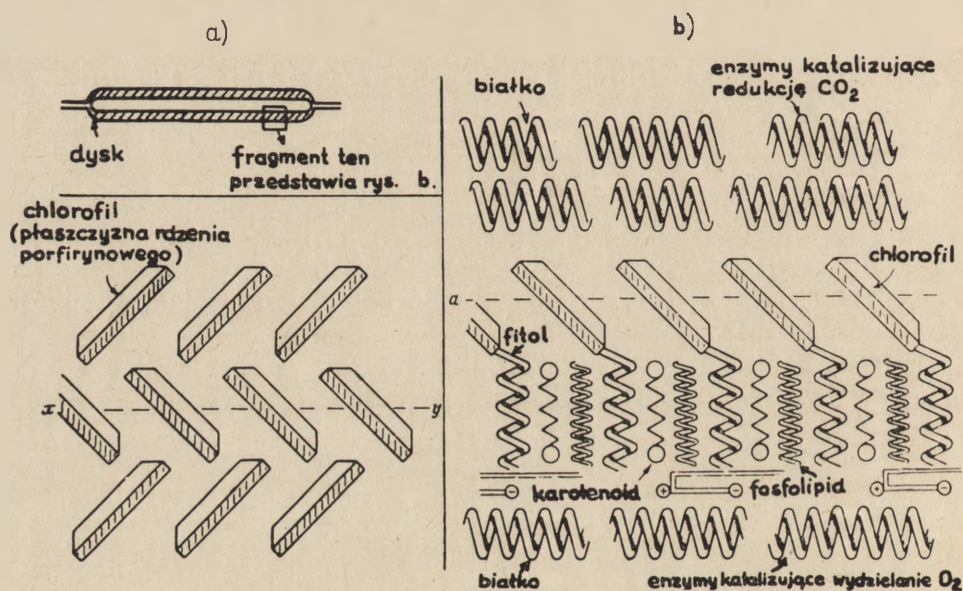
Rys. 4. Struktura lamelli wg (45)

- A — proteinowe części lipoprotein
- B — monomolekularna warstwa chlorofilu
- C — warstwa wody
- l — zorientowane swobodne lipidy

wynosić 21 000—37 000. Kompleks o podobnym ciężarze ( $M = 40\ 000$ ) i zawartości 1—2 drobin chlorofilu na drobinę białka wydzielił *Wolken* (141) z chloroplastów po działaniu digitoniną i wirowaniu. Kompleks ten odbarwia się zarówno w ciemności, jak i na świetle, przy czym w obu wypadkach suma energii jest równa około 48,3 kcal/mol, to znaczy jest w przybliżeniu równa energii denaturacji białka (143). Kompleks ten jest zdolny do redukcji 2,6-dwuchlorofenolu indofenolu (DPIP) oraz (w obecności odpowiednich kofaktorów) do syntezy ATP.

*Goedheer* (45) przedstawił model ultrastruktury lamelli (rysunek 4) zakładając podstawową strukturę podobną do proponowanej przez *Frey-Wysslinga* i *Steinmanna* (44).

Z badań anizotropii absorpcji i stopnia polaryzacji fluorescencji wzbudzonej światłem spolaryzowanym wynika, że stopień uporządkowania



Rys. 5. Struktura lamelli wg (28)

cząstek chlorofilu jest niższy niż przypuszczano. *Goedheer* wyjaśnia to specyficznym rozmieszczeniem chlorofilu w formie monomolekularnej warstwy na powierzchni kulistych drobin białek.

Godny uwagi jest model, proponowany przez *Calvina* (28) (rysunek 5). *Calvin* uwzględnił wyniki obserwacji *Goedheera* o niskim stopniu uporządkowania drobin chlorofilu w lamelli oraz założył półprzewodnikowy mechanizm działania kompleksu chlorofilowego w pierwszym etapie fotosyntezy (17). Proponowany przez niego model spełniałby rolę warstwy półprzewodnikowej.

Równoległe z badaniami nad strukturą lamelli próbowano ustalić ciężar i skład tak zwanej jednostki fotosyntetycznej, to znaczy najmniej-

szego funkcjonalnego fragmentu chloroplastu i wyjaśnić czy istnieje jakiś morfotyczny odpowiednik takiej jednostki.

Stwierdzono, że wielkość jednostki zależy od funkcji, którą przyjmuje się za podstawę wyznaczenia tej wielkości. Na przykład ustalono (33), że jedna drobina  $O_2$  powstaje na 2500 drobin chlorofilu, a zatem tyle drobin chlorofilu powinna by zawierać jednostka fotosyntetyczna. Natomiast do wykorzystania jednego kwantu światła w procesie fotoredukcji potrzebny jest zespół 300 drobin chlorofilu (71). Zgadza się to z wyliczeniami (114), opartymi o wydajność fluorescencji w czasie fotosyntezy oraz szybkość przeniesienia energii między drobinami chlorofilu, że przed reakcją fotochemiczną zachodzi około 300 aktów przeniesienia energii. Od wyników tych niewiele odbiegają dane otrzymane przy pomocy mikroskopu elektronowego: element strukturalny lamelli, zwany kwantasomem, zawiera około 230 drobin chlorofilu (89). Hill (53), badając ilość cytochromu *f* stwierdził, że jedna jego drobina przypada na około 400 drobin chlorofilu. Thomas i wsp. (116) badając reakcję Hilla stwierdzili, że fragmenty chloroplastów, zawierające około 200 drobin chlorofilu zachowują jeszcze zdolność redukcji utleniaczy i wydzielania  $O_2$ . Przy dzieleniu na mniejsze fragmenty aktywność ich gwałtownie spada. Park i Pon (90) natomiast uzyskali pełną aktywność w procesie redukcji żelacyjanków tylko dla fragmentów, zawierających nie mniej niż 1200 drobin chlorofilu (5—6 kwantasomów). Według Grossa i wsp. (50) prawie pełną aktywność w reakcji Hilla wykazują fragmenty, zawierające 2—3 kwantasomy. Ostatnio Izawa i Good (56) stosując selektywne inhibitory wydzielania  $O_2$  w reakcji Hilla ustalili, że najmniejsza jednostka fotosyntetyczna zawiera około 2500 drobin chlorofilu. Aby wyjaśnić rozbieżności między swoimi pomiarami i wynikami innych autorów, przeprowadzili oni dodatkowe badania (57), wychodząc z założenia, że reakcja Hilla (podobnie jak przeniesienie elektronu w mitochondriach przy oddychaniu) jest kontrolowana przez mechanizm fosforylacji, oraz że sprzężenie to może utrudniać prawidłową interpretację wyników. Zastosowali zatem odpowiednią substancję rozprzegającą (chlorowodorek metyloaminy) i stwierdzili, że w tych warunkach małe fragmenty chloroplastów, którym Park i Pon oraz Gross i wsp. przypisywali wysoką aktywność, wykazują zaledwie kilka procent aktywności całych chloroplastów.

Interesujące są również wyniki, otrzymane przez Bigginsa (14), który wydzielił z chloroplastów *Spinacia oleracea* podjednostki, aktywne w reakcji Hilla. Oznaczony metodą sedymentacyjną ciężar cząsteczkowy tych fragmentów wynosił  $18 \times 10^6$ , a zawartość chlorofilu — 2000 drobin. Obliczony stąd ciężar cząsteczkowy kwantasomu wynosił  $2 \times 10^6$ . Analiza chemiczna wykazała, że preparat zawiera dwa cytochromy *b* i *f*, oraz 95% niehemowego, homogennego białka o ciężarze cząsteczkowym  $22 \times 10^3$ , wykazującego silną tendencję do asocjowania. Park i Pon

(91) przyjmując za podstawę zawartość Mn, obliczyli, że minimalny ciężar cząsteczkowy podjednostki lamelli wynosi  $0,9 \times 10^6$ . Wynik ten potwierdzono obliczeniem ciężaru cząsteczkowego z gęstości i objętości kwantasomu: masa cząsteczkowa kwantasomu była 1—2 razy większa od minimalnego ciężaru cząsteczkowego podjednostki lamelli. Autorzy sądzą, że kwantasom jest jednostką morfotyczną, odpowiadającą jednostce fotosyntetycznej.

### III. Składniki chloroplastów i ich rola

Jednym z bardzo ważnych i trudnych do rozwiązania problemów jest określenie stanu, w jakim występuje chlorofil w chloroplaście. Wiele danych świadczy o tym, że istnieje kilka różnych form chlorofilu. K r a s n o w s k i (77—79) zaobserwował przesunięcie maksimum absorpcji chlorofilu w czasie zielenienia etiolowanych liści i równoległą zmianę stabilności fotochemicznej; przypuszcza on, że z trzech form chlorofilu *a*, różniących się zapewne stopniem asocjacji, pierwotnie powstaje forma z maksimum absorpcji 684 nm  $Ca_{684}$ , która przechodzi w  $Ca_{673}$ , a możliwe jest, że i w  $Ca_{677}$ . Butler (25) stwierdził, że w pierwszym okresie 1,5 godz. oświetlenia etiolowanych liści występuje tylko  $Ca_{670}$ , zaś po dwóch godzinach oświetlenia występuje także chlorofil *b*, a równocześnie pojawia się  $Ca_{660}$  i  $Ca_{705}$ .

Briggs i Butler (26) badali wpływ uszkodzenia struktury proplastydów na zmiany spektralne chlorofilu w rosnących w ciemności liściach. Stwierdzili, że zamrożenie do  $-196^{\circ}\text{C}$  i rozmrożenie liści przed naświetleniem powoduje przesunięcie maksimum absorpcji protochlorofilu z 650 do 635 nm, natomiast zamrożenie i rozmrożenie liści bezpośrednio po naświetleniu powoduje przesunięcie maksimum absorpcji świeżo powstałego chlorofilu z 685 do 673 nm. Badania porównawcze wykazały, że proplastydy rosnącej w ciemności *Eugleny* nie zawierają struktur zorganizowanych (na przykład ciał prolamelarnych), występujących w etiolowanych liściach. Okazało się, że w proplastydach bez struktur zorganizowanych nie tworzą się formy protochlorofilu i chlorofilu absorbujące przy dłuższych falach.

Brody i Rabinowitch (20) mierzyli średni czas trwania, a Latimer (82) — wydajność kwantową fluorescencji chlorofilu *in vivo*. Wyniki tych badań skłoniły Rabinowitcha (95) do poglądu, że chlorofil występuje *in vivo* w dwóch formach: 1/4 ogólnej zawartości chlorofilu znajduje się w stanie zdolnym do fluorescencji (z wydajnością około 10%), a pozostała część jest w stanie niefluoryzującym dzięki czemu obserwuje się średnią wydajność fluorescencji około 3%. Frank (41) na podstawie badań kinetycznych fotosyntezy doszedł do podobnych wniosków: przypuszcza on, że fluoryzująca forma chlorofilu znajduje się

w kontakcie z wodą, natomiast niefluoryzująca jest połączona z niepolarnymi związkami lipidowymi.

Najdokładniejszych danych o występowaniu różnych form chlorofilu dostarczyła szczegółowa analiza zwykłych i różnicowych widm preparatów chloroplastów. Tą metodą *Brown i French* (21) stwierdzili, że we wszystkich zielonych roślinach występują formy  $Ca_{670}$  i  $Ca_{680}$ ; małe ilości  $Ca_{695}$  wykryli w szeregu preparatów *Frei* (42) oraz *Brown i French* (22). *Kok* (72) stwierdził występowanie małych ilości  $Ca_{700}$ , który nazwał  $P_{700}$ . Ostatnio *Thomas i wsp.* (117) analizując przegięcia czerwonego pasma absorpcji chlorofilu *a in vivo* doszli do wniosku, że występuje on przynajmniej w 6 formach, przy czym dwoma dodatkowymi są  $Ca_{667}$  i  $Ca_{673}$ . Niektóre formy chlorofilu *a* różnią się szybkością ekstrakowania mieszaniną acetonu i buforu (118), najważniejsze jednak różnice zauważyć można przy badaniu ich funkcji.

Przez długi czas rola różnych barwników w fotosyntezie była zupełnie niewyjaśniona. Pierwszym krokiem w kierunku rozwiązania tego zagadnienia były obserwacje *Emersona* (34—36), że światło czerwone jest mało aktywne w procesie fotosyntezy, a jego aktywność silnie wzrasta, gdy uzupełnić je słabym światłem zielonym. Okazało się, że w różnych roślinach światło uzupełniające odpowiada maksimum absorpcji barwników towarzyszących (chlorofilu *b*, fukoksantolu, fikocyjaniny, fikoerytryny). Stwierdzono również, że światło o różnych długościach fal, chociaż wywołuje tę samą szybkość stacjonarną, wymaga różnych okresów indukcji (15), oraz że różne długości fali światła zmieniają stan oksydo-redukcyjny barwnika  $P_{700}$  (73, 74).

Na tej podstawie zaproponowano mechanizm oparty na założeniu, że proces fotosyntezy zawiera w sobie dwie reakcje fotochemiczne. Zgodnie z propozycją *Duysensa* zespoły barwników sterujące tymi reakcjami, nazwano PS1 i PS2 (ang. *pigment system*). Dotychczas mimo intensywnych badań poznano tylko częściowo ich skład, własności i funkcje obu zespołów.

PS1 — zespół reagujący na światło o długich falach zawiera jako główny, czynny składnik — barwnik  $P_{700}$  (identyczny z  $Ca_{703}$  (103)), o którego charakterze niewiele wiadomo. Ekstrakcja tego barwnika acetonem daje tylko normalny chlorofil *a*. Ze względu na ścisłe sprzężenie widma  $P_{700}$  ze zmianami widma cytochromu przypuszcza się, że  $P_{700}$  jest kompleksem chlorofilu *a* i cytochromu. Z drugiej strony *Brody i Brody* (18) wykazali, że chlorofil *a* w większych stężeniach ( $8 \times 10^{-2} M$ ) daje w różnych rozpuszczalnikach widmo wzbudzenia fluorescencji z maksimum przy 705 nm, co jest cechą charakterystyczną barwnika  $P_{700}$ , barwnik ten może być zatem zasocjowanym czystym chlorofilem. Hipotezę tę częściowo potwierdzili identyfikując przy pomocy widm wzbudzenia fluorescencji i widm fluorescencji agregaty chlorofilu w *Euglena* (19). Stosunek  $P_{700}$  do całkowitej ilości chlorofilu *a* wynosi

1:400. PS1 jest układem dość stabilnym, wytrzymuje bez znacznego rozkładu dłuższe przechowywanie chloroplastów, ogrzewanie i działanie detergentów (102).

Układ PS1, jak wykazali Witt i wsp. (103, 138), jest wzbudzany energią, pochłanianą przez  $Ca_{695}$ ,  $Ca_{682}$  oraz prawdopodobnie  $Cb_{650}$ . Wzbudzenie PS1 powoduje fotochemiczne odbarwienie (fotoredukcję)  $P_{700}$  przy równoczesnym utlenieniu cytochromu. Proces taki zaobserwował Witt (140) w chloroplastach szpinaku. W roślinach wyższych donatorem elektronu jest cytochrom  $f$  (139), w glonach — cytochrom  $c$  o wysokim potencjale oksydoredukcyjnym ( $E'_0 = 0,3$  V). Rolę akceptora elektronu od PS1 pełni ferredoksyna (55). Przeniesienie elektronu na drodze cytochrom  $f$  — PS1 — ferredoksyna jest możliwe tylko dzięki energii promieniowania, ponieważ przebiega przeciw gradientowi potencjału termodynamicznego (dla cytochromu  $f$   $E'_0 = 0,365$  V, a dla ferredoksyny  $E'_0 = -0,420$  V). Kok (73) oznaczył dla  $P_{700}$   $E'_0 = 0,43$  V, zaś Horio i San Pietro (55) otrzymali dla drugiego składnika PS1,  $Ca_{683}$  wartość  $E'_0 = 0,55$  V ( $pH = 8$ ).

Drugi zespół PS2 zawiera chlorofil o maksimum absorpcji w zakresie fal krótkich. Brojde i Brody (23) wyodrębnili z preparatów chlorofilu barwnik, którego maksimum absorpcji (w acetonie) leży przy 675 nm, a maksimum fluorescencji (w acetonie w temp. 77°K) przy 698 nm i nazwali go F698. Fluorescencję jego wygaszają chinony ( $\alpha$ -TQ, UQ10, UQ6 oraz PQ) prawdopodobnie dzięki tworzeniu niefluoryzujących kompleksów. Przypuszcza się, że barwnik o podobnym widmie fluorescencji *in vivo* wchodzi w skład PS2. Barwnik, pełniący rolę centrum fotochemicznego układu PS2 jest związany bezpośrednio z PQ (138).

Układowi PS2 przekazują absorbowaną energię barwniki:  $Cb_{650}$  oraz  $Ca_{674}$  (103, 138). Funkcja układu PS2 nie jest jeszcze znana. Wiadomo tylko, że jest on blisko związany z układem wydzielającym  $O_2$ . Pośrednim donatorem elektronu dla PS2 jest więc zapewne drobina wody, akceptorem zaś — plastochinon. Zespół PS2 z pomocniczymi enzymami, niezbędnymi do wydzielania  $O_2$  jest w technice laboratoryjnej znacznie mniej stabilny od układu PS1 (127).

Jak wynika z powyższego, rolę aktywnego centrum fotochemicznego w PS1 odgrywa  $P_{700}$  — jedna z form chlorofilu  $a$ . Analogiczne centrum zespołu PS2 nie jest jeszcze znane, prawdopodobnie jest to również jedna z form chlorofilu  $a$ . Czym te formy różnią się, czy różnym stopniem zasocjowania, czy wiązaniem z różnymi białkami, czy z innymi składnikami aparatu fotosyntetycznego, nie wiadomo.

Dotychczas podjęto tylko kilka prób rozdzielania obu zespołów. Wessels (133) po działaniu digitoniną na chloroplasty oraz po różnicowym wirowaniu otrzymał dwie frakcje, z których jedna wykazywała aktywność tylko w cyklicznej fosforylacji i fotoredukcji NADP, a więc tylko funkcje układu PS1. Boardman i Anderson (16) stosując



taką samą technikę, rozdzielili materiał na pięć frakcji. Najcięższa frakcja (odwirowania przy 1000 g) zawierała chlorofil *a* i chlorofil *b* w stosunku 2,4 i wykazywała aktywność w fotoredukcji *o*-chlorofenolo-2,6-dwuchloroindofenolu. Natomiast najlżejsza (odwirowana przy 50 000 — 144 000 g) zawierała chlorofil *a* i chlorofil *b* w stosunku 6,2 i była aktywna w procesie fotoredukcji NADP w obecności askorbinianu i *o*-chlorofenolo-2,6-dwuchloroindofenolu jako donatorów elektronów. Ciężka frakcja wykazywała więc funkcje PS2, lekka natomiast — PS1.

Ostatnio nową próbę rozdziału podjęli O g a w a i wsp. (88). Chloroplasty rozpuszczone w siarczanie sodowo-laurylowym poddali oni elektroforezie na żelu poliakryloamidowym i otrzymali trzy frakcje, wszystkie wędrujące w stronę anody. Najszybsza frakcja III zawierała tylko wolne barwniki, przy czym uzyskiwano ich tym więcej, im większe stosowano stężenie detergentu. Pozostałe dwie frakcje zawierały wyłącznie barwniki, związane w kompleksach lipoproteidowych. Frakcja I, najwolniejsza, zawierała dużo chlorofilu *a* (stosunek chlorofilu *a* do chlorofilu *b* równał się 7), chinony oraz więcej  $\beta$ -karotenu niż frakcja II. W frakcji II stwierdzono występowanie chlorofilu *a* i chlorofilu *b* w stosunku 1,9 oraz wioloksantyny i neoksantyny (których nie było w frakcji I), chinonów a także luteiny w ilości większej niż we frakcji I.

Przeprowadzono również badania nad rozdzieleniem funkcji obu układów PS1 i PS2 w całych chloroplastach lub ich fragmentach. Obszerne zestawienie różnych przeciwstawnych funkcji zespołów PS1 i PS2 podali V e r n o n i A v r o n (128). Do omówienia niektórych funkcji tych zespołów powrócimy w następnym rozdziale, a obecnie przedstawimy rolę pozostałych składników aparatu fotosyntetycznego.

Jedną z grup tych składników stanowią cytochromy. Przegląd różnych typów cytochromów, znalezionych w komórkach fotosyntezujących podali P e r i n i, K a m e n i S c h i f f (93). Wykazali oni również (94), że inne cytochromy uczestniczą w transporcie elektronów w fotosyntezie, a inne w oddychaniu. Omówimy tylko cytochromy, uczestniczące w fotosyntezie.

Rośliny zielone zawierają cytochrom *f* (odmianę cytochromu *c*). F o r t i wsp. (40) wydzielili czysty cytochrom *f* z liści pietruszki, oznaczyli jego ciężar cząsteczkowy ( $M = 245\ 000$ ) i widmo formy zredukowanej. W glonach cytochrom ten jest zastąpiony innym, specjalnym cytochromem *c* (61). Oba te cytochromy charakteryzują się wysokim potencjałem oksydoredukcyjnym ( $E_0' > 0,3$  V przy  $pH = 7$ ), występują w komórkach w formie zredukowanej i nie utleniają się samorzutnie. Niższy potencjał oksydoredukcyjny ma cytochrom  $b_6$ . Występuje on tylko w zielonych komórkach roślin (109), w formie utlenionej. W przeciwieństwie do cytochromów *c* oraz *f* utlenia się on tlenem. Cytochromy *f* i  $b_6$  pełnią rolę przenośników elektronów w procesie świetlnym fotosyntezy. Cytochrom *f* jest ściśle związany z barwnikiem  $P_{700}$ , a jego fotoutlenienie obserwuje się nawet w temp.  $77^\circ\text{K}$  (101, 105).

Udział cytochromu  $b_6$  w przenoszeniu elektronów wykazali Olson i Smillie (87). W chloroplastach *Eugleny*, z których usunięto cytochrom 552 (analog cytochromu  $f$ ), zachodzi redukcja cytochromu  $b_6$ . Proces ten można odwrócić w warunkach aerobowych przy słabym oświetleniu. Cytochrom  $b_6$  reaguje na światło, absorbowane zarówno przez PS1 jak i PS2, pośredniczy więc w przeniesieniu elektronów między tymi dwoma zespołami. Jego bezpośredni udział w fotosyntezie udowodnił Rumberg (103). W widmie różnicowym otrzymanym przy przemienym oświetleniu czerwonym krótko- i długofalowym światłem wzbudzającym wyróżnił on trzy składowe wywołane: utlenieniem  $Ca_{703}$ , utlenieniem cytochromu  $f$  oraz redukcją utlenionego cytochromu  $b_6$ . Świadczy to, że cytochrom  $b_6$  jest akceptorem elektronu od zespołu PS2, oraz że przeniesienie elektronu od cytochromu  $b_6$  do utlenionego cytochromu  $f$  jest najwolniejszym stadium na drodze od PS2 do PS1.

Niektóre wyizolowane cytochromy cechują się tak niskimi potencjałami oksydoredukcyjnymi, że nie można im przypisać roli przenośników elektronów między PS2 i PS1. Do nich należy wyizolowany (54) z niebiesko-zielonych glonów *Anacystis nidulans* cytochrom o  $E'_0 = -0,26$  V. Prawdopodobnie uczestniczy on w reakcjach układu PS1, prowadzących do redukcji NADP. Niskim potencjałem ( $E'_0 = 0,01$  V) cechuje się również cytochrom  $c$  wydzielony z *Chromatium* (11). Z *Monostroma nitidum* wydzielono cytochrom  $b$  o potencjale redokсовym  $0 < E'_0 < 0,25$  V (63).

W przenoszeniu elektronów od PS2 do PS1 pośredniczą, prócz cytochromów, plastocyanina i chinony. Plastocyaninę wydzielono z wielu komórek roślinnych (62, 64). Jest to białko, zawierające dwa atomy Cu w cząsteczce i występujące w ilości 1 cząsteczki na 30 drobin chlorofilu. Plastocyanina nie utlenia się bezpośrednio tlenem, może natomiast być utleniona fotochemicznie przez chloroplasty, poddane działaniu digitoniny (75). Chloroplasty takie po dodaniu plastocyaniny utleniają na świetle szybko cytochrom  $c$  lub  $f$ . Okazało się, że plastocyanina stymuluje fotoutlenienie cytochromu  $c$  znacznie silniej, niż cytochrom  $f$ . Fragmenty chloroplastów, otrzymane po działaniu digitoniną i pozbawione plastocyaniny (134) lub otrzymane po działaniu ultradźwiękami (65) tracą zdolność fotoredukcji NADP przez donator askorbinian-DPIP. Tę zdolność regeneruje w obu przypadkach dodanie plastocyaniny. Stan oksydoredukcyjny plastocyaniny w glonach można oznaczać spektrofotometrycznie: naświetlenie promieniowaniem czerwonym krótkofalowym powoduje redukcję, a promieniowaniem czerwonym długofalowym — utlenienie plastocyaniny. Wszystkie te dane świadczą, że plastocyanina pośredniczy w przeniesieniu elektronów od PS2 do PS1 poprzez cytochrom  $f$ .

Chinony są jedną z głównych grup związków, występujących w chloroplastach. W chloroplastach występują cztery związki typu plastochinonu (PQ), trzy tokoferylochinony (TQ) oraz witamina  $K_1$  (31). Threlfall i wsp. (119) wydzielili z liści tytoniu dwa plastochinony,

które oznaczyli jako PQC' i PQD', jednak D a s i wsp. (29) wykazali, że są one identyczne z wcześniej poznanymi plastochinonami PQC i PQD. Metodą spektroskopii masowej stwierdzili oni, że struktura plastochinonów PQB, PQC i PQD jest bardzo podobna do plastochinonu PQA (=PQ9), pochodnej 2,3-dwumetylo-1,4-benzochinonu, zawierającej w położeniu 5 łańcuch złożony z dziewięciu jednostek izoprenowych. M i s i t i i wsp. (84) wydzielili z chloroplastów jeszcze jeden plastochinon, który zidentyfikowali jako PQ3.

Chloroplasty szpinaku zawierają najwięcej PQA (0,079 mg/mg chlorofilu), dość duże ilości PQB i PQC (0,015 i 0,016 mg/mg chlorofilu), a znacznie mniej tokoferylchinonów, szczególnie  $\beta$ -TQ (0,0002 mg/mg chlorofilu) oraz  $\gamma$ -TQ (ślady) (51). Co najmniej 95% całej zawartości PQ i TQ znajduje się w lamellach, a w młodych liściach około 60% całej zawartości TQ występuje w formie zredukowanej (24).

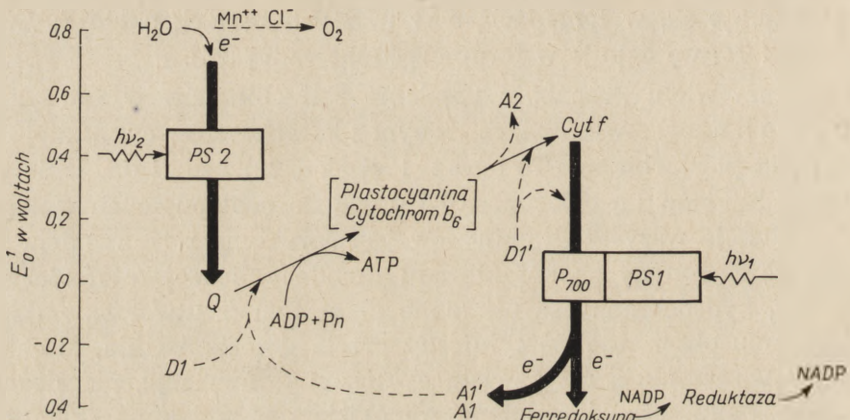
Tematem wielu prac było ustalenie roli chinonów w fotosyntezie. K r o g m a n n (80) stwierdził, że jednym z katalizatorów cyklicznej fosforylacji jest plastochinon. T r e b s t i E c k (122) badali działanie egzogennych chinonów na chloroplasty i doszli do następujących wniosków: 1) fotoredukcja wszystkich chinonów jest sprzężona z tworzeniem ATP, 2) wszystkie chinony są kofaktorami pseudocyklicznej fotofosforylacji, to znaczy, hydrochinony są utleniane przez tlen (z utworzeniem  $H_2O_2$ ), dzięki czemu obserwuje się cykliczny przebieg reakcji Hilla, 3) chinony o  $E'_0 < 0$  V stymulują rzeczywistą cykliczną fosforylację, niezależną od obecności tlenu, prawdopodobnie współdziałając z jakimś składnikiem kompleksu przenoszącego elektrony, o  $E'_0 \approx 0$  V.

B e c k e r, G r o s s i S h e f n e r (12) rozdzielili fragmenty chloroplastów przez wirowanie różnicowe na kilka frakcji i stwierdzili, że aktywność fragmentów w reakcji Hilla rośnie ze wzrostem stosunku molowego Chl/PQ, prawdopodobnie jednak zależy ona również od struktury fragmentów.

H e n n i n g e r i wsp. (51) badali wpływ różnych chinonów na regenerację zdolności ekstrahowanych acetonem chloroplastów, do fotochemicznej redukcji żelazicyjanku. Największą aktywność w tym procesie wykazywał  $\beta$ -TQ, mniejszą PQA i PQB oraz  $\gamma$ -TQ, natomiast PQC i witamina  $K_1$  były inhibitorami. Przy małych stężeniach działania  $\beta$ -TQ i  $\gamma$ -TQ (lub PQA) sumują się, prawdopodobnie więc te dwa chinony działają w dwóch różnych miejscach łańcucha przenoszenia elektronów na żelazicyjanek. D i l l e y i C r a n e (30) stwierdzili, że  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -TQ regenerują również zdolność ekstrahowanych chloroplastów do fotoredukcji cytochromu c. V e r n o n i S h a w (130) badając stymulujący wpływ różnych chinonów na fotoredukcję cytochromu c i działanie inhibitorów na ten proces doszli do wniosku, że zredukowane chinony mogą być donatorami elektronów dla PS1.

#### IV. Schemat fotoindukowanego przepływu elektronów i funkcja aparatu fotosyntetycznego

Badania nad rolą poszczególnych składników aparatu fotosyntetycznego wykorzystano do opracowania schematu przepływu elektronów indukowanego światłem. Większość schematów proponowanych przez różnych autorów jest bardzo podobna do podanego na rysunku 6 schematu w układzie Vernona i Avrona (128). Odbiega od nich znacznie jedynie schemat, proponowany przez Arnona i wsp. (6). Na podstawie badań mechanizmu różnych typów fosforylacji oraz wydajności kwantowej fotosyntezy przyjęli oni istnienie tylko jednego zespołu barwników i tylko jednej reakcji fotochemicznej.



Rys. 6. Schemat przepływu elektronów w chloroplastach wg (128) (objaśnienia w tekście)

W schemacie Vernona i Avrona (rys. 6) strzałki wskazują kierunek przepływu elektronów. Dla termicznych reakcji są one zgodne z kierunkami samorzutnych procesów termodynamicznych (wzrost potencjału oksydoredukcyjnego czyli zmniejszenie potencjału termodynamicznego). W kierunku przeciwnym przebiega przeniesienie elektronów, indukowane światłem, oznaczone na schemacie grubymi strzałkami. Kwant światła, zaabsorbowany przez drobinę chlorofilu powoduje przeniesienie elektronu na singletowy poziom wzbudzony. Jonizacja wzbudzonej drobinę powoduje rozdzielenie ładunku ujemnego (elektronu) i dodatniego („dziury”), przy czym elektron, przeniesiony do układu odpowiednich enzymów, zostaje wykorzystany do redukcji  $\text{CO}_2$ , a „dziura” (w mechanizmie jeszcze nie znanym) — do utlenienia wody do tlenu.

Za przyjęciem tego modelu półprzewodnikowego przemawia foto-przewodnictwo chloroplastów (2), chlorofilu (85, 98, 115) i karotenu (97). Ostatnio do zagadnienia półprzewodnikowego mechanizmu fotosyntezy wrócili Arnold (1) oraz Eley i S nart (32). Własności półprzewodnikowe chlorofilu,  $\beta$ -karotenu oraz ich mieszanin z albuminą oraz  $\beta$ -mety-

lonaftochinonem (związek modelowy dla plastochinonu) wskazują na powstanie określonych kompleksów oraz przemawiają za hipotezą o fotoaktywowanym rozdziale ładunków w poczwórnym kompleksie:  $^+ \text{albumina-chlorofil-}\beta\text{-karoten-}\beta\text{-metylonaftochinon}^-$  (32).

Najmniej poznanym procesem składowym fotosyntezy jest utlenienie wody i wydzielanie tlenu. W procesie wydzielania tlenu uczestniczą mangan (38, 68) i chlorki (5). Niedobór manganu powoduje: 1. zahamowanie fotosyntetycznej fosforylacji, dla której kofaktorem jest FMN (112), 2. wzrost intensywności fluorescencji i obniżenie intensywności fluorescencji długotrwałej (69), 3. zmniejszenie zmian absorpcji, zależnych od temperatury (70), 4. zanik wywoływanych światłem sygnałów EPR (126).

Niedobór manganu nie wpływa natomiast na następujące procesy niezwiązane z wydzielaniem tlenu: 1. fotoredukcję przez adaptowane do wodoru glony, w których układ wydzielający tlen jest nieczynny i zastąpiony reakcją prekursora tlenu z wodorem (68), 2. fotoredukcję NADP z askorbinianem i DPIP jako układem donatorowym, 3. fotosyntetyczną fosforylację katalizowaną przez pyocyaninę (122), 4. zmiany absorpcji, wywołane fotoreakcjami, niewrażliwymi na temperaturę (70).

Mechanizm działania manganu w procesie wydzielania tlenu nie jest znany; możliwe, że działa on katalitycznie w reakcjach nadtlenków, katalizowanych przez peroksydazę.

W procesie wydzielania tlenu, prócz  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Cl}^-$ , uczestniczą też prawdopodobnie hydrochinony o wysokich potencjałach oksydoredukcyjnych (*o*-hydrochinony) (125).

Akceptorem elektronu od zespołu PS2 jest plastochinon. Następnym etapem jest przeniesienie elektronu przez kompleks, zawierający plastocyaninę i cytochrom  $b_6$  do cytochromu  $f$ . Z etapem tym sprzężona jest reakcja tworzenia ATP z ADP i  $P_n$ .

Druga reakcja fotochemiczna powoduje przeniesienie elektronu ze zredukowanej formy cytochromu  $f$  do ferredoksyny za pośrednictwem zespołu PS1. Występowanie, własności i rolę ferredoksyny w fotosyntezie omówił *Toczko* (120) oraz *San Pietro i Black* (108). O wydzielaniu z zielono-niebieskich glonów dwóch białek o aktywności ferredoksyny doniósł ostatnio *Smillie* (111). Ferredoksyna w zredukowanej formie uczestniczy w syntezie  $\text{NADH}_2$ , a pośrednio w syntezie pirogrogrianu z  $\text{CO}_2$ . Przebieg tych reakcji badali *Buchanan i wsp.* (9, 37), a mechanizm redukcji NAD i NADP — *Weaver i wsp.* (132).

W ustaleniu podanego wyżej schematu oraz w poznaniu dokładniejszego mechanizmu działania aparatu fotosyntetycznego istotną rolę odegrały badania prowadzone techniką błyskową (100, 103, 136, 137) oraz badania nad różnymi donatorami i akceptorami elektronów, inhibitorami i związkami o działaniu rozsprężającym.

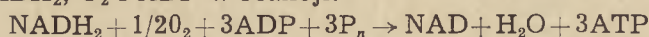
Najdawniej poznaną reakcją fotochemiczną wykazywaną przez chloro-

plasty i ich fragmenty w obecności dodanych akceptorów elektronów, jest reakcja Hilla. Akceptory reakcji Hilla są oznaczone na schemacie (rysunek 6) symbolami A1 i A1'. Jest ona fotochemicznym procesem redukcji akceptorów przy równoczesnym wydzieleniu tlenu z wody. Dokładne miejsce reagowania akceptorów z łańcuchem przenoszenia elektronów aparatu fotosyntetycznego nie jest znane. Prawdopodobnie żelazicyjanek (39, 48, 55) i DPIP (83) są redukowane bezpośrednio przez PS2. Według R u m b e r g a i wsp. (104) akceptorami elektronów od PS2 mogą być też: błękit toluilenowy, tionina i błękit metylenowy. Związki te oznaczono na schemacie (rysunek 6) symbolem A2. Ich redukcja przez PS2 jest sprzężona z fosforylacją.

Natomiast utleniaczami dla PS1 mogą być: żelazicyjanek, *p*-benzochinon, metylosiarczan *N*-metylofenazyny (PMS), karmin indygo, benzyloviologen, metyloviologen i ferredoksyna. Do grupy utleniaczy Hilla należą też: chromiany, azotyny, azotany, FMN i chinony. W przypadku tych ostatnich stwierdzono (47), że reakcja Hilla wykazuje efekt Emersona, uczestniczą w niej więc oba układy PS1 i PS2. Niektóre z utleniaczy cechują się niskim potencjałem oksydoredukcyjnym; są to DPIP, PMS, FMN, witamina K<sub>3</sub>, ferredoksyna i chinony o  $E_0' < 0$  V. Związki te katalizują cykliczną fosforylację. Ich zredukowane formy mogą być donatorami elektronów w miejscu łańcucha położonym poniżej miejsca tworzenia ATP i powodować cykliczny przepływ elektronów przez PS1.

Pewne związki mogą pełnić funkcję donatorów elektronów dla PS1, na przykład DPIP (129, 131), szczególnie w połączeniu z askorbinianem, który utrzymuje DPIP w zredukowanej formie. Te same właściwości wykazuje PMS z askorbinianem (60), zredukowany trójmetylochinon (TMQH<sub>2</sub>) (130) i tetrametylo-*p*-fenylenodwuamina (TMPD) (121). Utlenienie DPIP<sub>2</sub> (w stężeniach większych niż 10<sup>-5</sup> M) jest sprzężone z fosforylacją, zaś przy mniejszych stężeniach przebiega bez tworzenia ATP. Można stąd wnosić, że DPIP<sub>2</sub> może reagować z łańcuchem przenoszenia elektronów w dwóch miejscach. Jedno z nich leży przed miejscem tworzenia ATP, drugie — przed cytochromem *f*. Stwierdzono, że DPIP<sub>2</sub> nie reaguje bezpośrednio z PS1 (66). TMPD i PMSH<sub>2</sub> reagują z PS1 (bezpośrednio lub za pośrednictwem cytochromu *f*) bez tworzenia ATP.

Tworzenie ATP jest jedną z głównych funkcji chloroplastów. Synteza ATP przebiega w chloroplastach w specyficzny sposób, różny od fosforylacji oksydacyjnej, w mitochondriach w tej ostatniej ATP tworzy się kosztem NADH<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> i ADP w reakcji:



Chloroplasty natomiast, zależnie od warunków, mogą syntezować ATP na jednej z trzech dróg. Są to:

1. fotofosforylacja niecykliczna, przebiegająca w obecności dużych stężeń akceptorów elektronów, która prowadzi do równoczesnego powstania trzech produktów: tlenu, zredukowanej formy akceptora i ATP.

Akceptorami elektronów mogą być: żelazocyjanek (7), DPIP (48, 67) oraz NADP (7). Ta ostatnia reakcja jest według Arnona naturalną drogą syntezy NADPH<sub>2</sub> i ATP w chloroplastach przy czym powstają produkty w stosunku: NADPH<sub>2</sub>:ATP:O = 2:2:2. Natomiast Jacobi (58) stwierdził w izolowanych chloroplastach, że stosunki te są równe 2:1:2, przy czym mniejszej ilości ATP nie można przypisać działaniu ATP-azy.

2. fosforylacja pseudocykliczna, przebiegająca w obecności tlenu i katalitycznych stężeń przenośników elektronów. W procesie tym zredukowana forma przenośnika elektronu utlenia się cząsteczkowym tlenem, dzięki czemu produktem reakcji jest tylko ATP (nie obserwuje się tworzenia tlenu, ani zmiany oksydoredukcyjnego stanu układu).

3. fosforylacja cykliczna — przebiegająca w ściśle anaerobowych warunkach, w obecności katalitycznych ilości przenośników elektronów. W procesie tym również obserwuje się tylko syntezę ATP, bez żadnych zmian oksydoredukcyjnego stanu układu oraz bez wydzielania tlenu.

Przenośnikami elektronów, katalizującymi fosforylację pseudocykliczną i cykliczną są: PMS (59, 76), a w odpowiednich warunkach DPIP (48, 123), menadion (123), FMN (5), ferredoksyna (113) i chinony (122).

Różnice między tymi typami fosforylacji występują wyraźnie przy badaniu wpływu inhibitorów. Inhibitorami, które w tym samym stopniu hamują przepływ elektronów i fosforylację, są dla fosforylacji niecyklicznej i pseudocyklicznej — 3-*p*-chlorofenylo-1,1-dwumetylomocznik (CMU), 3,(3,4-dwuchlorofenylo)-1,1-dwumetylomocznik (DCMU) oraz *n*-butylo-3,5-dwujodo-4-hydroksybenzoesan (BDHB). CMU i DCMU są też silnymi inhibitorami reakcji Hilla (135). Hamują one silniej fosforylację niecykliczną i pseudocykliczną, niż cykliczną (60). Hamowaniu foto-redukcji NADP przez CMU i DCMU przeciwdziała dodatek askorbinianu i DPIP (131) lub askorbinianu i PMS (60). Można więc przypuszczać, że inhibitory działają na łańcuch przenoszenia w miejscu położonym między H<sub>2</sub>O i D1. Ciekawych wniosków dostarczyły badania Rubinsteina (99) nad wpływem DCMU na zmiany absorpcji w paśmie 520 nm. W warunkach aerobowych, przy słabym oświetleniu promieniowaniem o  $\lambda > 680$  nm, zmiany te zależą od wzbudzenia krótkofalowym promieniowaniem i są całkowicie hamowane przez DCMU. Natomiast w warunkach anaerobowych zmiany w paśmie 520 nm zależą od wzbudzenia promieniowaniem długofalowym i nie są hamowane przez DCMU. Autor wnioskuje stąd, że zmiany absorpcji w paśmie 520 nm są złożone, wynikają częściowo z działania zespołu PS1, a częściowo PS2. Działanie, podobne do wymienionych wyżej inhibitorów, wykazują: *o*-fenantrolina (59) i *N*-tlenek-2-*n*-nonylo-4-hydroksychinoliny (NQNO) (8). BDHB hamuje fosforylację niecykliczną i pseudocykliczną, ale nie hamuje cyklicznej (110).

Oddzielną grupę inhibitorów stanowią kwasy tłuszczowe i ich estry. Kwasy lipoinowy i kaprylowy oraz ester metylowy kwasu kaprylowego

hamują reakcję karboksylacji w cyklu węglowym, fosforylację oraz przemiany fruktozo-1,6-dwufosforanu w fruktozo-1-fosforan i sedoheptulozo-1,7-dwufosforan w sedoheptulozo-7-fosforan (92).

Związki rozsprzęgające w układzie, w którym przebiega wyłącznie niecykliczna fotofosforylacja, hamują szybkość fosforylacji, nie wpływając na szybkość przepływu elektronów. W tych samych warunkach, lecz przy braku składników potrzebnych do fotofosforylacji ( $Mg^{2+}$ , fosforan lub ADP), stymulują one szybkość przepływu elektronów przynajmniej do wartości otrzymanej po dodaniu brakującego składnika.

Związkami rozsprzęgającymi fotofosforylację są jony amoniowe (81), atebryna (3), chloropromazyna, oktylo-guanidyna i gramicydyna (110), *p*-trójfluorometoksy fenylohydrazon cyjanku karbonylu (*p*-CF<sub>3</sub>O-CCP) (10, 52) oraz TPIP (49), który jest doskonałym akceptorem elektronu w fosforylacji niecyklicznej. Typowe efekty rozsprzężenia powstają też pod wpływem arsenianów (81) i tiofosforanów (46), które zastępując P<sub>n</sub>, tworzą nietrwałe analogi normalnych fosforylowanych związków pośrednich. Efekty rozsprzężenia wywołuje również działanie detergentami (86), które w stężeniach 0,005—0,01% przy pH 7,7 hamują fotofosforylację i stymulują reakcję Hilla.

Badania nad specyficznym działaniem różnych związków rozsprzęgających doprowadziły Avrona i Shavita (110) do wniosku, że w łańcuchu przenoszenia elektronów muszą występować dwa różne miejsca syntezy ATP.

#### LITERATURA

1. Arnold W., *J. Phys. Chem.* **69**, 788 (1965).
2. Arnold W., Sherwood H. K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **43**, 105 (1957).
3. Arnon D. I., *Federation Proc.* **20**, 1012 (1961).
4. Arnon D. I., w *Brookhaven Symposia in Biology*, No 11, tłum. ros. Izd. Inostr. Liter., Moskwa 1962, str. 181.
5. Arnon D. I., Losada M., Whatley F. R., Tsujimoto H. Y., Hall D. O., Horton A. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **9**, 1314 (1961).
6. Arnon D. I., Tsujimoto H. Y., McSwain B. D., *Nature* **207**, 1367 (1965).
7. Arnon D. I., Whatley F. R., Allen M. B., *Science* **127**, 1026 (1958).
8. Avron M., *Biochem. J.* **78**, 745 (1961).
9. Bachofen R., Buchanan B. B., Arnon D. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 690 (1964).
10. Bamberger E. S., Black C. C., Fewson C. A., Gibbs M., *Plant Physiol.* **38**, 483 (1963).
11. Bartsch R. B., Kamen M. D., *J. Biol. Chem.* **235**, 825 (1960).
12. Becker M., Gross J., Shefner A., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 579 (1962).
13. Bergeron J. A., *Brookhaven Symposia in Biology*, No 11, tłum. z ros. Izd. Inostr. Liter., Moskwa 1962, str. 131.
14. Biggins J., US At. Energy Comm. UCRL-11863, 144 (1965), wg *Chem. Abstr.* **63**, 7238 (1965).
15. Blinks L. R., w *Research in Photosynthesis*, Interscience Publisher, New York, 1957, str. 444.



16. Boardman N. K., Anderson J. M., *Nature* **293**, 166 (1964).
17. Bradley D. F., Calvin M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **41**, 563 (1955).
18. Brody S. S., Brody M., *Arch. Biochem. Biophys.* **110**, 583 (1965).
19. Brody S. S., Brody M., *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 54 (1966).
20. Brody S. S., Rabinowitch E., *Science* **125**, 555 (1957).
21. Brown J. S., French C. S., *Plant Physiol.* **34**, 305 (1959).
22. Brown J. S., French C. S., *Biophys. J.* **1**, 539 (1961).
23. Broyde S. B., Brody S. S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 444 (1965).
24. Bucke C., Leech R. M., Hallaway M., Morton R. A., *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 19 (1966).
25. Butler W. L., *Biochim. Biophys. Acta* **102**, 1 (1965).
26. Butler W. L., Briggs W. R., *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 45 (1966).
27. Calvin M., *Angew. Chem.* **68**, 253 (1956).
28. Calvin M., w Brookhaven Symposia in Biology, No 11, tłum. ros. Izd. Inostr. Liter., Moskwa, 1962, str. 161.
29. Das B. C., Lounasmaa M., Tendille C., Lederer E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 318 (1965).
30. Dilley R. A., Crane F. L., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 142 (1963).
31. Dilley R. A., Henninger M. D., Crane F. L., *Nat. Acad. Sci. — Nat. Res. Council Publ.* **1145**, 273 (1963) wg Vernon L. P., Avron M., *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 269 (1965).
32. Eley D. D., Snart R. S., *Biochim. Biophys. Acta* **102**, 379 (1965).
33. Emerson R., Arnold W., *J. Gen. Physiol.* **16**, 191 (1932).
34. Emerson R., Chalmers R., Cederstand C., Brody M., *Science* **123**, 673 (1956).
35. Emerson R., *Science* **125**, 746 (1957).
36. Emerson R., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **9**, 1 (1958).
37. Ewans M. C. W., Buchanan B. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1420 (1965).
38. Eyster H. C., Brown T. E., Tanner H. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **64**, 240 (1956).
39. Fork D. C., *Plant Physiol.* **38**, 323 (1963).
40. Forti G., Bertolè M. L., Zanetti G., *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 33 (1965).
41. Frank J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **44**, 527, 941 (1958).
42. Frei Y. F., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 82 (1962).
43. French C. S., w Brookhaven Symposia in Biology, No 11, tłum. ros. Izd. Inostr. Liter., Moskwa 1962, str. 82.
44. Frey-Wyssling A., Steinmann E., Vierteljahresshu. Naturforsch. Ges. Zürich **98**, 20 (1953), wg Rabinowitch E., Photosynthesis, Interscience Publishers, New York, 1956, II (2), str. 1727.
45. Goedheer J. C., Thesis, Utrecht, 1957.
46. Good N. E., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 502 (1960).
47. Govindjee R., Thomas J. B., Rabinowitch E., *Science* **132**, 421 (1960).
48. Gromet-Elhanan Z., Avron M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 215 (1963).
49. Gromet-Elhanan Z., Avron M., *Biochemistry* **3**, 365 (1964).
50. Gross J. A., Becker M. J., Shefner A. M., *Nature* **203**, 1263 (1964).
51. Henninger M. D., Dilley R. A., Crane F. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 237 (1963).
52. Heytler P. G., *Biochemistry* **2**, 357 (1963).
53. Hill R., Hartree E., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **4**, 115 (1953).
54. Holton R., W., Myers J., *Science* **142**, 234 (1963).
55. Horio T., San Pietro A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1226 (1964).
56. Izawa S., Good N. E., *Biochim. Biophys. Acta* **102**, 20 (1965).

57. Izawa S., Good N. E., *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 372 (1965).
58. Jacobi G., *Z. Naturforsch.* **18b**, 711 (1963).
59. Jagendorf A. T., Avron M., *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 246 (1959).
60. Jagendorf A. T., Margulies M. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **90**, 184 (1960)
61. Katoh S., *Nature* **186**, 138 (1960).
62. Katoh S., *Nature* **186**, 533 (1960).
63. Katoh S., San Pietro A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 406 (1965).
64. Katoh S., Suga I., Shiratori I., Takamiya A., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 136 (1961).
65. Katoh S., Takamiya A., *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 156 (1965).
66. Ke B., *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 297 (1964).
67. Keister D. L., *J. Biol. Chem.* **238**, PC 2590 (1963).
68. Kessler E., *Arch. Biochem. Biophys.* **59**, 527 (1955).
69. Kessler E., Arthur W., Brugger J. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **71**, 326 (1957).
70. Kessler E., Moraw R., Rumberg B., Witt H. T., *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 134 (1960).
71. Kok B., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 245 (1956).
72. Kok B., *Plant Physiol.* **35**, 802 (1960).
73. Kok B., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 527 (1961).
74. Kok B., Proc. V. Intern. Congr. Biochem. 1961, VI, 73.
75. Kok B., Rurainski H. J., Harmon E. A., *Plant Physiol.* **39**, 513 (1964).
76. Krall A. R., Good N. E., Mayne B. C., *Plant Physiol.* **36**, 44 (1961).
77. Krasnowski A. A., Brin G. P., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **62**, 163 (1948).
78. Krasnowski A. A., Kosobuckaja L. M., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **91**, 343 (1953).
79. Krasnowski A. A., Kosobuckaja L. M., Wojanowskaja K. K., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **92**, 1201 (1953).
80. Krogmann D. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 4 (1961).
81. Krogmann D. W., Jagendorf A. T., Avron M., *Plant Physiol.* **34**, 272 (1959).
82. Latimer P., Bannister T. T., Rabinowitch E., *Science* **124**, 585 (1956).
83. Levine P. R., Smillie R. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 417 (1962).
84. Misiti D., Moore H. W., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1402 (1965).
85. Nelson R. C., *J. Chem. Phys.* **27**, 864 (1957).
86. Neumann J., Jagendorf A., *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 382 (1965).
87. Olson J. M., Smillie R. M., *Nat. Acad. Sci. — Nat. Res. Council, Publ.* **1145**, 56 (1963), wg Vernon L. P., Avron M., *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 269 (1965).
88. Osawa T., Obata F., Shibata K., *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 223 (1966).
89. Park R. B., Biggins J., *Science* **144**, 1009 (1964).
90. Park R. B., Pon N. G., *J. Mol. Biol.* **3**, 1 (1961).
91. Park R. B., Pon N. G., *J. Mol. Biol.* **6**, 105 (1963).
92. Pedersen T. A., Kirk M., Bassham J. A., *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 189 (1966).
93. Perini F., Kamen M. D., Schiff J. A., *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 74 (1964).
94. Perini F., Schiff J. A., Kamen M. D., *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 91 (1964).
95. Rabinowitch E., *Discuss. Faraday Soc.* **27**, 161 (1959).
96. Racker E., *Nature* **175**, 249 (1955).
97. Rosenberg B., *J. Chem. Phys.* **31**, 238 (1959); **34** 812 (1961).
98. Rosenberg B., Camiscoli J. F., *J. Chem. Phys.* **35**, 982 (1961).
99. Rubinstein D., *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 41 (1965).
100. Rumberg B., *Nature* **204**, 860 (1964).
101. Rumberg B., *Z. Naturforsch.* **19b**, 707 (1964).

102. Rumberg B., *Nature* **201**, 466 (1964).
103. Rumberg B., *Biochim. Biophys. Acta* **102**, 354 (1965).
104. Rumberg B., Schmidt-Mende P., Weikard J., Witt H. T., *Nat. Acad. Sci. —Nat. Res. Council Publ.* **1145**, 18 1963. wg Vernon L. P., Avron M., *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 269 (1965).
105. Rumberg B., Witt H. T., *Z. Naturforsch.* **19b**, 693 (1964).
106. Sager R., w Brookhaven Symposia in Biology No 11, tłum. ros., Izd. Inostr. Liter., Moskwa, 1962, str. 122.
107. Sager R., Palade G. E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 463 (1957).
108. San Pietro A. S., Black C. C., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **16**, 155 (1965).
109. Sarcione E. J., *Biochemistry* **1**, 1132 (1962).
110. Shavit N., Avron M., *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 317 (1965).
111. Smillie R. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 621 (1965).
112. Spencer D., Possingham J. V., *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 379 (1961).
113. Tagawa K., Tsujimoto H. Y., Aron D. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 544 (1963).
114. Tealle F. W. J., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 69 (1960).
115. Terenin A. N., Putseiko E., Akimow I., *Discuss. Faraday Soc.* **27**, 83 (1959).
116. Thomas J. B., Blaauw O. H., Duysens L. N. M., *Biochim. Biophys. Acta* **10**, 230 (1953).
117. Thomas J. B., Kleinen Hammans J. W., Arnolds W. J., *Biochim. Biophys. Acta* **102**, 324 (1965).
118. Thomas J. B., Vander Wal U. P., *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 490 (1964).
119. Threfall D. R., Griffiths W. T., Goodwin T. W., *Biochim. Biophys. Acta* **102**, 614 (1965).
120. Toczko K., *Post. Biochem.* **10**, 325 (1964).
121. Trebst A., *Z. Naturforsch.* **19b**, 418 (1964).
122. Trebst A., Eck H., *Z. Naturforsch.* **16b**, 44 (1961).
123. Trebst A., Eck H., *Z. Naturforsch.* **16b**, 455 (1961).
124. Trebst A., Tsujimoto H. Y., Aron D. I., *Nature* **182**, 351 (1958).
125. Trebst A., Wagner S., *Z. Naturforsch.* **17b**, 396 (1962).
126. Treharne R. W., Brown T. E., Eyster H. C., Tanner H. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 119 (1960).
127. Vernon L. P., *Aerospace Med. Res. Lab. TDR No AMRL-TDR-62* **116**, 131 (1962), wg Vernon L. P., Avron M., *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 269 (1965).
128. Vernon L. P., Avron M., *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 269 (1965).
129. Vernon L. P., Kamen M. D., *Arch. Biochem. Biophys.* **51**, 122 (1954).
130. Vernon L. P., Shaw E. R., *Biochemistry* **4**, 132 (1965).
131. Vernon L. P., Zaugg W. S., *J. Biol. Chem.* **235**, 2728 (1960).
132. Weaver P., Tinker K., Valentine R. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 195 (1965).
133. Wessels J. S. C., *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 561 (1962).
134. Wessels J. S. C., *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 614 (1965).
135. Wessels J. S. C., Vander Wenn R., *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 548 (1956).
136. Witt H. T., *Ber. Bunsenges. Physik. Chem.* **68**, 727 (1964).
137. Witt H. T., Müller A., Rumberg B., *Nature* **191**, 194 (1961).
138. Witt H. T., Müller A., Rumberg B., *Nature* **197**, 987 (1963).
139. Witt H. T., *Proc. Roy. Soc. London B* **160**, 13 (1964).
140. Witt H. T., Müller A., Rumberg B., *Nature* **192**, 967 (1961).
141. Wolken J. J., *J. Cellular Comp. Physiol.* **48**, 349 (1956).
142. Wolken J. J., Schwertz F. A., *J. Gen. Physiol.* **37**, 111 (1953).
143. Wolken J. J., Mellon A. D., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 267 (1957).



DANUTA FRĄCKOWIAK\*

## Fizyczne badania procesu fotosyntezy

### The Physical Research in Photosynthesis

The physical methods of investigation of photosynthesis are reviewed.

W badaniach procesu fotosyntezy fizyka odgrywa niepoślednią rolę: z jednej strony proponuje ona cały szereg mechanizmów do wytłumaczenia procesów zachodzących na poziomie molekularnym w komórkach fotosyntetyzujących, z drugiej — dostarcza wiele niezastąpionych wprost metod do śledzenia nie tylko tych procesów, ale i takich, które zalicza się zwykle do zakresu biochemii lub biologii. W badaniach procesu fotosyntezy, jak zwykle zresztą w badaniach organizmów żywych na poziomie molekularnym podział na specjalności jest raczej zwyczajowy, toteż jeśli jakiś typ rozważań występuje również w dziedzinach uprawianych w naszym kraju przez fizyków (na przykład o optyce atomowo-molekularnej lub fizyce ciała stałego) będą tego typu rozważania kwalifikować jako fizyczne.

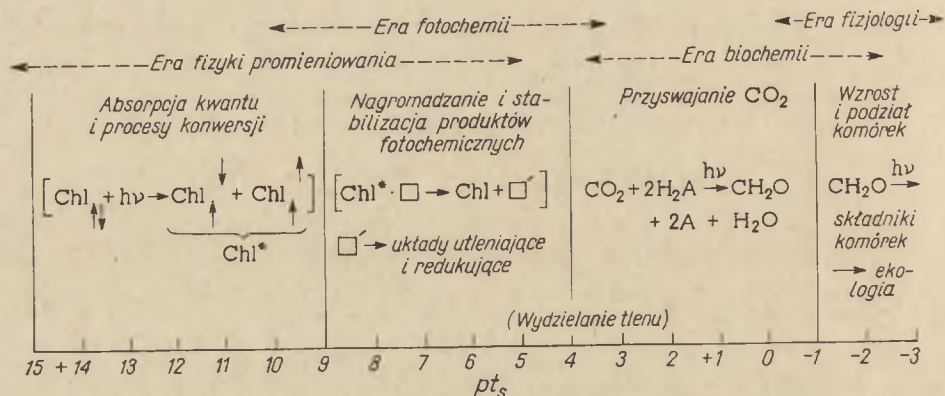
### I. Procesy fizyczne w fotosyntezie

K a m e n (52) w swej książce o pierwotnych procesach w fotosyntezie proponuje podział zjawisk zachodzących w komórkach żywych na zjawiska fizyczne, fotochemiczne i biologiczne na podstawie ich czasu trwania (rysunek 1). Czasy trwania zjawisk występujących w procesie fotosyntezy różnią się między sobą o wiele rzędów wielkości. Autor wprowadza więc dla wygody jednostkę „pt<sub>s</sub>”, zdefiniowaną jako logarytm odwrotności wyrażonego w sekundach czasu trwania danego procesu. Zjawiska zachodzące w zakresie od +15 do +9 pt<sub>s</sub> uważane są za fizyczne. W tym zakresie czasów następuje absorpcja kwantu wzbudzenia przez drobinę chlorofilu lub inne drobinę barwników organizmu. Należą do tego zakresu czasów również dalsze losy energii wzbudzenia aż do chwili,

\* Doc. dr, kierownik Katedry Fizyki Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu.

Wykaz stosowanych skrótów: S — poziom singletowy, T — poziom tripletowy, n — elektrony niewiążące, π — elektrony wiążące, o rzucie momentu pędu na kierunek wiązania = 1; σ — elektrony o tym rzucie = 0.

gdy zajdzie pierwsza reakcja fotochemiczna. Średni czas życia wzbudzonej drobinny chlorofilu *in vivo* jest rzędu  $10^{-9}$  s, toteż proces fotochemiczny musi zajść przed upływem tego czasu, jeśli ma skutecznie konkurować z reemisją kwantu wzbudzenia w postaci światła fluorescencji. Procesom



Rys. 1. Czas przebiegu różnego typu procesów wg (52).

fotochemicznym, biochemicznym i fizjologicznym odpowiadają odpowiednio coraz dłuższe czasy trwania. Na wykresie nie zamieszczono jeszcze dłuższych czasów odpowiadających procesom ekologicznym i biologicznym. Taki podział procesów z pewnością jest nieco sztywny i dowolny. Bardzo słuszne jest natomiast twierdzenie autora, że najmniej znanym zakresem czasowym jest pogranicze pomiędzy obszarem procesów fizycznych i fotochemicznych, pogranicze, na którym występują oba typy procesów: zarówno konwersja kwantu wzbudzenia należąca według systematyki (rysunek 1) do fizyki promieniowania, jak i proces nagromadzenia i stabilizacji produktów fotochemicznych. Nic więc dziwnego, że właśnie ten typ procesów, który zwykle się określać jako magazynowanie energii wzbudzenia na potrzeby reakcji fotochemicznych, jest obecnie intensywnie badany zarówno w układach żywych, jak i na modelach (40).

### 1. Schemat procesu fotosyntezy

Potocznie za fotosyntezę uważa się proces zachodzący w żywych organizmach, w których przy pomocy światła i chlorofilu powstają węglowodany i tlen drobinowy z dwutlenku węgla i wody. Rzadziej zwraca się uwagę na fakt, że powstawanie tlenu drobinowego jest w tym procesie reakcją uboczną i że w niektórych bakteriach synteza węglowodanów odbywa się przy pomocy innego niż woda donatora wodoru, bez wydzielania tlenu, na przykład według:



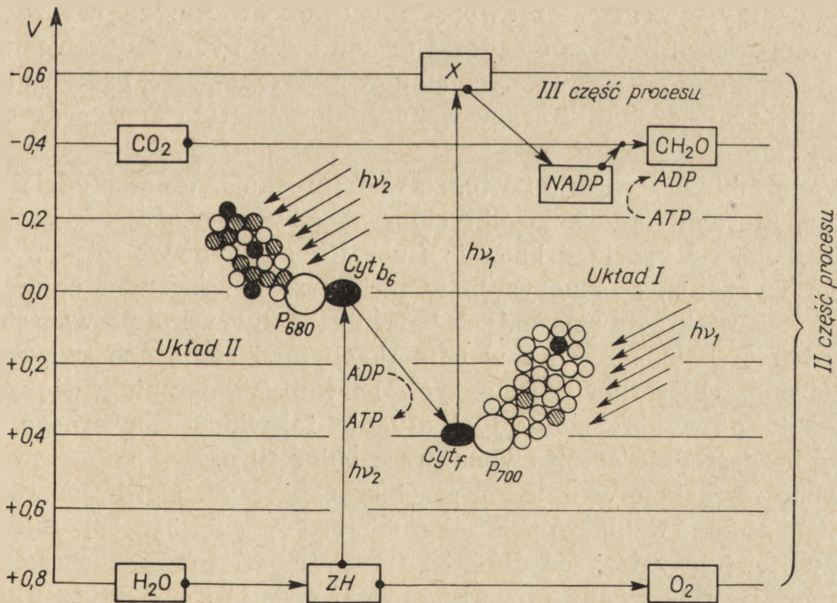
Proces fotosyntezy można podzielić na trzy części:

1. Odłączenie wodoru od donatora wodoru. Jest to cała seria przemian z udziałem wielu enzymów. Według schematu K a m e n a (rysunek 1) reakcje te należą do obszarów biochemii i częściowo fotochemii. W roślinach zielonych następuje w tej części procesu wydzielanie tlenu molekularnego.

2. Przekazanie wodoru od donatora z pierwszej części procesu do akceptora w trzeciej części procesu. Według schematu Kamena — procesy odpowiedzialne za to przekazanie leżą na styku obszaru zjawisk fizycznych i fotochemicznych. W tej części procesu następuje przekazywanie energii wzbudzenia do centrów reakcji fotochemicznych i magazynowanie tej energii na potrzeby reakcji fotochemicznych. Światło absorbowane przez barwniki aparatu fotosyntetyzującego organizmu, dostarcza energii na przeprowadzenie atomu wodoru z trwałego połączenia w wodzie do mniej trwałego — w organicznych związkach.

3. Wytwarzanie węglowodanów z  $\text{CO}_2$  i wodoru dostarczonego poprzez drugą część procesu. Ta część procesu fotosyntezy jest dzięki pracom C a l v i n a i jego współpracowników najlepiej zbadana. Są to reakcje czysto biochemiczne, zachodzące bez udziału światła, choć przy wykorzystaniu energii chemicznej powstałej na jego koszt.

Wszystkie trzy części procesu zaznaczone są na bardzo uproszczonym schemacie przedstawiającym fotosyntezę z wydzielaniem tlenu (rysunek 2).



Rys. 2. Uproszczony schemat fotosyntezy.

X — akceptor wodoru,  $\text{P}_{700}$ ,  $\text{P}_{680}$  — pułapki, C — cytochromy, białe kółka — chlorofil a, zakreskowane — inne barwniki. Na osi rzędnych — potencjały elektrochemiczne w voltach. Strzałki pionowe odpowiadają reakcjom świetlnym.

Widać, że dostarczenie energii świetlnej następuje w dwóch porcjach, zachodzą dwie różne reakcje fotochemiczne, których współdziałanie jest konieczne do zajścia całego procesu. Dwa rodzaje kwantów światła są absorbowane przez dwa różne układy barwników (tak zwany układ I i II). W skład każdego z układów oprócz innych barwników wchodzi chlorofil  $\alpha$ , który jednak, w zależności od przynależności do I lub II układu, wykazuje różne własności optyczne i fotochemiczne (do sprawy tej powrócimy w dalszej części artykułu). Każdy z układów ma własne centra reakcji, zwane często na podstawie analogii zaczerpniętej z modelu pasmowego ciała stałego, pułapkami. W centrach, które stanowią nieliczną część drobin wchodzących w skład układu, zachodzą reakcje fotochemiczne po dostarczeniu do nich energii absorbowanej przez pozostałe drobinę barwników. Centrum układu I zawiera oprócz barwnika  $P_{700}$ , który przypuszczalnie jest odmianą chlorofilu  $a$  — cytochromy  $f$ , a centrum układu II oprócz barwnika  $P_{680}$  — cytochromy  $b_6$ .

Schemat przedstawiony na rysunku 2 jest obecnie prawie ogólnie przyjęty dla fotosyntezy zachodzącej w roślinach zielonych. Wprawdzie szkoła *Arnona* (8) proponuje inny schemat, w którym wystarcza jeden rodzaj reakcji fotochemicznej do przetransportowania wodoru z wody do trzeciej części procesu, ale jest to pogląd raczej odosobniony.

## 2. Dwa typy chlorofilu $a$

Jeśli przyjąć schemat z dwoma reakcjami świetlnymi nasuwają się dwie możliwości: bądź jeden rodzaj drobin może być wzbudzany na dwa różne sposoby (do dwóch różnych stanów elektronowych), bądź też istnieją dwa rodzaje drobin, których wzbudzenie dostarcza energii do dwóch reakcji.

Wiele faktów wskazuje na to, że w obu reakcjach bierze udział chlorofil  $a$ , któremu inne barwniki chloroplastów przekazują swą energię wzbudzenia. Na przykład badania fluorescencji komórek fotosyntetyzujących wykazują, że fluoryzuje w nich przede wszystkim chlorofil  $a$ , aczkolwiek większość pozostałych barwników fluoryzuje po wyosobieniu ich z komórek (29). A więc w komórkach przekazują one swą energię wzbudzenia chlorofilowi. Rola tych barwników ogranicza się przede wszystkim do wykorzystania tych długości fal widma słonecznego, które nie są bezpośrednio absorbowane przez chlorofil  $a$ .

Mimo to reakcje wydają się przebiegać przy udziale dwóch różnych odmian drobin wzbudzonych. Wyniki badań (15, 31, 33) zależności wydajności fotosyntezy od długości fal dwóch wiązek monochromatycznego światła (tak zwany efekt Emersona) wydają się wykluczać możliwość, że światło absorbowane przez jeden rodzaj drobin jest następnie przekazywane do dwóch różnych centrów reakcji. W badaniach tych okazało się, że wydajność fotosyntezy nie zależy od długości fali użytego



światła dla prawie całego obszaru widma widzialnego, ale gwałtownie spada w obszarze czerwieni (przy 680 nm dla roślin zielonych). Dostarczenie dodatkowo światła o krótszej fali pozwala lepiej wykorzystać wzbudzenie, nawet jeśli światło krótkofalowe zostanie dostarczone nieco później (11). Mamy więc do czynienia z współdziałaniem wzbudzeń o różnych długościach fal, przy czym produkty powstałe w wyniku wzbudzenia układu I są stosunkowo długo żyjące.

Wyjaśnienie w jaki sposób chlorofil *a* bierze udział w obu reakcjach wymaga poznania jego własności widmowych i fotochemicznych w komórkach i roztworach. Chlorofil *a*, wyosobniony chromatograficznie z wyciągów z roślin, występuje w roztworach w jednej postaci. Natomiast w organizmach występuje w dwóch odmianach o nieco innym widmie absorpcji, innej wydajności fluorescencji itp. (tak zwany chlorofil  $a_1$  i  $a_2$ ).

Nie rozstrzygnięto jeszcze co warunkuje różne zachowanie się drobin chlorofilu *a* w komórkach: różne sąsiedztwo innych drobin, inny sposób ułożenia, czy też może inny sposób agregacji tych drobin między sobą. W celu wyjaśnienia tego problemu bada się układy modelowe konstruowane w różny sposób, z chlorofilem, lub drobinami do niego podobnymi (40).

Wiele wątpliwości nasuwa też budowa i działanie samych centrów reakcji. Wchodząc w ich skład barwniki  $P_{700}$  i  $P_{680}$  stanowią małą część odpowiedzialnych za absorpcję odmian chlorofilu  $a_1$  i  $a_2$ . Wysuwano szereg hipotez tłumaczących osobliwą sytuację drobin centrum. W czasie, gdy w rozważaniach pierwotnego stadium fotosyntezy królował pasmowy model ciała stałego, wielu autorów jako istotną przyczynę tej osobliwości proponowało odchylenia od regularności kryształu dwuwymiarowego utworzonego przez resztę drobin chlorofilu. Obecnie są wskazówki, że drobinę centrum wykazują nawet wyższy stopień uporządkowania niż reszta drobin chlorofilu *in vivo*. Toteż bardziej popularny jest pogląd Francka (38), że osobliwe zachowanie się drobin centrów reakcji spowodowane jest ich bezpośrednim sąsiedztwem. W ostatnich latach zwrócono też uwagę na rolę cytochromów w procesach redukcji i utlenienia chlorofilu, w wyniku których powstają wolne rodniki potrzebne do dalszych reakcji biochemicznych.

### 3. Jednostki fotosyntetyczne

Badanie tak zwanych krzywych natężeń, to jest zależności wydajności fotosyntezy od natężenia światła, naprowadziło Emersona (32) na trop istnienia jednostek fotosyntetycznych — najmniejszych elementów, w których może przebiegać proces fotosyntezy. Gdy oświetlamy układ fotosyntetyzujący wydajność fotosyntezy początkowo rośnie (okres indukcji), przy dalszym oświetleniu zaś ustala się na stałym poziomie.

W tym stanie równowagi wydajność zależy od natężenia światła. Zwiększając je, nadspodziewanie łatwo osiągamy nasycenie — dalszy wzrost natężenia światła nie powoduje wzrostu wydajności fotosyntezy. Z prostych oszacowań wynika, że nasycenie następuje przy natężeniu światła, które wzbudza średnio jedną na kilkaset obecnych w preparacie drobin chlorofilu *a*. Dziwny ten fakt można wyjaśnić zakładając, że kilkaset drobin chlorofilu *a* współpracuje ze sobą w dostarczeniu energii wzbudzenia do jednego centrum reakcji; jeśli jedna z nich dostarczy już kwant wzbudzenia, centrum jest przez jakiś czas zajęte jego zużyciem tak, że wzbudzenie w tym czasie następnych drobin nie powoduje wzrostu wydajności fotosyntezy.

Przyjęcie dwóch rodzajów reakcji świetlnych wymaga wprowadzenia dwóch typów układów składających się z dużej ilości drobin absorbujących i centrum, w którym absorbowana energia jest wykorzystywana. Dopiero dwa takie układy (I i II z rysunku 2) tworzą jednostkę fotosyntetyczną. (Nie zakładamy nic jeszcze o wzajemnym przestrzennym ułożeniu obu układów).

Wiele niezależnych faktów popiera hipotezę jednostek fotosyntetycznych. Rozdrabnianie fragmentów komórek doprowadza do zaniku ich zdolności fotosyntetycznych zawsze przy przekroczeniu ich pewnego minimalnego wymiaru. Fragmenty te zawierają około 300 drobin chlorofilu — jeśli rozdrabniamy rośliny zielone lub algi i około 40 drobin bakteriochlorofilu w przypadku fotosyntetyzujących bakterii (23, 53, 80). Również z badań mikroskopii elektronowej wynika istnienie pewnej ultrastruktury, którą można wiązać z jednostkami fotosyntetycznymi (74).

Przekazywanie energii wzbudzenia wewnątrz jednostek fotosyntetycznych — to problem naprawdę frapujący fizyka. By go jednak rozwiązać trzeba znać nie tylko własności widmowe drobin biorących udział w absorpcji i przekazywaniu energii, ale i ich wzajemne ułożenie, a więc strukturę chloroplastów na poziomie molekularnym. Pomimo olbrzymiego rozwoju techniki nie jest to sprawa łatwa, choćby dlatego, że wiele metod badania narusza znacznie badaną strukturę. Badania przy pomocy mikroskopu elektronowego dostarczają przede wszystkim informacji o warstwowym — lamellarnym ułożeniu białek i lipidów w chloroplastach i o występowaniu na tle tych warstw tworów mogących wiązać się z jednostkami fotosyntetycznymi. Informacji o wzajemnych odległościach warstw dostarczają badania rentgenograficzne (61). O sposobie ułożenia, interesujących nas z punktu widzenia przekazywania energii, drobin barwnika możemy sądzić jedynie z pomiarów optycznych: dwójłomności, anizotropii absorpcji i polaryzacji fluorescencji (46, 60, 71).

#### 4. Kwantowa wydajność procesu fotosyntezy

Świadomie pominęłam dotychczas zagadnienie kwantowej wydajności procesu fotosyntezy (zwanego często zapotrzebowaniem kwantowym), aby nie rozpoczynać tego z konieczności bardzo uproszczonego przeglądu sytuacji w badaniach fotosyntetycznych od referowania zadawnionego sporu pomiędzy szkołą Warburga (84) i szkołą Emersona (24, 29), lub słuszniej — prawie całą resztą specjalistów z tej dziedziny. Z większości pomiarów wydajności kwantowej wynika, że jest ona zawsze większa niż 8 kwantów światła na jedną zsyntetyzowaną grupę  $\text{CH}_2\text{O}$ . Wyjątek stanowią pomiary szkoły Warburga, z których wynika minimalne zapotrzebowanie kwantowe około dwukrotnie niższe. Na redukcję jednej drobiny  $\text{CO}_2$  do  $\text{CH}_2\text{O}$  trzeba dostarczyć 4,8 eV energii, przeniesienie jednego atomu wodoru (lub elektronu, co w warunkach panujących w komórkach, w których jest pod dostatkiem jonów wodorowych jest właściwie równoważne) ze stadium I do III (rysunek 2) wymaga 1,2 eV. A więc, aby nazbierać wystarczającą do redukcji ilość energii trzeba „przepompować” z I części procesu do III, aż cztery atomy wodoru. Z założenia współdziałania dwóch reakcji fotochemicznych, wynika więc minimalne zapotrzebowanie kwantowe równe 8 kwantów na jedną  $\text{CH}_2\text{O}$ . Zwolennicy występowania jednego typu reakcji fotochemicznej, będą oczywiście popierali dane świadczące o dwukrotnie niższej wydajności kwantowej fotosyntezy. Sprawa nie jest łatwa do ostatecznego rozstrzygnięcia, ponieważ poszczególne laboratoria otrzymują dość różne wyniki, co nie sprzyja zakończeniu sporu.

## II. Rola badań fizycznych procesu fotosyntezy

Ten uproszczony przegląd nasuwa pewne wnioski co do roli fizyka w badaniach procesu fotosyntezy:

1. Szczególnym zainteresowaniem fizyka cieszą się procesy przekazywania energii w aparacie fotosyntetyzującym. W tej dziedzinie nie tylko metody badań doświadczalnych są fizyczne, ale w celu wyjaśnienia obserwowanych zjawisk konieczne jest proponowanie mechanizmów poznanych w optyce molekularnej i fizyce ciała stałego.

2. By wyjaśnić procesy przekazywania energii fizyk musi wpięrcz poznać możliwie dokładnie układ oraz charakter poziomów energetycznych drobin biorących udział w tych procesach. Poznaje je przez systematyczne badania widma i porównanie wyników tych badań z rachunkami chemii kwantowej.

3. Istotny wpływ na procesy przekazywania energii ma wzajemne położenie drobin. Trzeba więc poznać ultrastrukturę aparatu fotosynte-

tyzującego stosując metody, z których większość zwyczajowo uważana jest za fizyczne. Hipotetyczne struktury sprawdza się też tworząc podobne do nich układy modelowe.

### 1. Procesy przekazywania energii

Problem w jaki sposób energia wzbudzenia dostarczana jest wewnątrz jednostek fotosyntetycznych do centrum reakcji rozważało wielu autorów (24, 29, 40).

Wobec dużych stężeń chlorofilu w jednostkach fotosyntetycznych trudno rozpatrywać kolejne przekazywanie pomiędzy drobinami zlokalizowanej w nich energii wzbudzenia. Trzeba raczej stosować teorię zdelokalizowanego ekscytonu (26, 45, 77). Szczególnie ciekawe wyniki otrzymał K a s h a i wsp. (53) rozważając wzbudzenia silnie ze sobą oddziaływujących drobin w polimerach. Położenie i rozszczepienie poziomów wzbudzonych takiego polimeru zależy w istotny sposób od ustawienia względem siebie dipoli przejść elektronowych drobin, które wchodzi w jego skład. Proponowany przez Kashę mechanizm można stosować, jeśli oddziaływanie pomiędzy drobinami jest silne, to jest gdy sąsiednie drobin są ułożone blisko i ich dipole przejść nie są wzajemnie prostopadłe. Aczkolwiek energia wzbudzenia przynależy w tym przypadku do całej grupy drobin mieszczącej się w obszarze małym w porównaniu z długością fali światła wzbudzającego, to jednak czasem wygodnie jest myśleć o przekazywaniu ekscytonu od drobin do drobin. Dla przypadku silnego sprzężenia stopień delokalizacji energii wzbudzenia odpowiada  $10^{12}$  do  $10^{16}$  „przekazywań” na sekundę (37). Jest to wystarczająco dużo, aby energia wzbudzenia dotarła do centrum reakcji w okresie średniego czasu życia w stanie wzbudzonym drobin chlorofilu *in vivo* (jest on rzędu  $10^{-19}$  s). Dla silnego sprzężenia efektywność przekazywania energii jest proporcjonalna do powierzchni pasma absorpcji i do  $r^{-3}$  (gdzie  $r$  jest odległością pomiędzy sąsiednimi dipolami przejść). Nie zależy natomiast od temperatury. Konkurencyjnym mechanizmem do opisanego powyżej jest wprowadzenie tak zwanego przekazywania rezonansowego, pochodzącego z rozważania nad roztworami drobin fluoryzujących. W roztworach takich oddziaływanie pomiędzy najbliższymi dipolami przejść drobin jest zwykle słabe, a przy założeniu słabego oddziaływania efektywność przekazywania jest proporcjonalna do  $r^{-6}$  i do powierzchni pokrywania się pasm absorpcji i fluorescencji.

Wydaje się, że w przypadku jednostek fotosyntetycznych należy przyjąć oddziaływanie pośrednie pomiędzy tymi dwoma skrajnymi przypadkami (37).

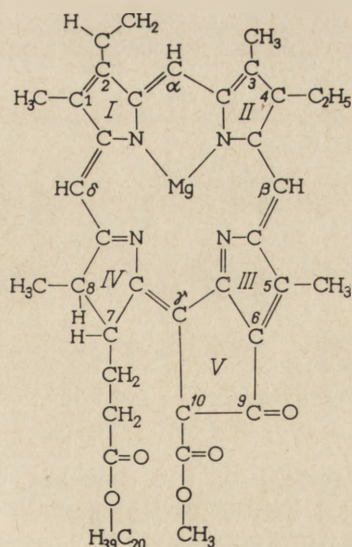
Wspomnieć trzeba, że są też zwolennicy teorii wytwarzania przez energię wzbudzenia chlorofilu nośników ładunku i ich przemieszczania się wewnątrz jednostek fotosyntetycznych (3). Wolne rodniki byłyby

wytwarzane przez te nośniki, które trafiły do pułapek. Pogląd ten był dość popularny kilka lat temu, gdy Calvin (19) proponował fotojonizację za pośrednictwem energii wzbudzenia chlorofilu. Wprawdzie Calvin w dalszych swych pracach odstąpił od tak bezpośredniego stosowania modelu pasmowego ciała krystalicznego do fotosyntezy (21), trzeba jednak przyznać, że zwolennicy stosowania półprzewodnikowego mechanizmu mają cały szereg argumentów na poparcie swego punktu widzenia. Są to: występowanie opóźnionego świecenia i termoluminescencji po oświetleniu suchych chloroplastów, zmiany pod wpływem światła stałej dielektrycznej filmów z chromatoforów (4, 6) oraz wyniki badania wolnych rodników metodą elektronowego rezonansu spinowego. Pomimo tych bezspornych dowodów istnienia charakteru półprzewodnikowego komórek fotosyntetyzujących, wydaje się, że przekazywanie energii do centrum następuje w przeważającej części poprzez migrację ekscytonu, a nie poprzez fotojonizację i wędrówkę oddzielonych elektronów i „dziur”.

Rozstrzygnięcie pomiędzy proponowanymi mechanizmami będzie możliwe dopiero po poznaniu własności spektralnych chlorofilu, jego reakcji fotochemicznych, oddziaływania z sąsiadami i po dokładnym poznaniu ośrodka, w którym jest on rozmieszczony *in vivo*.

## 2. Własności optyczne drobin chlorofilu

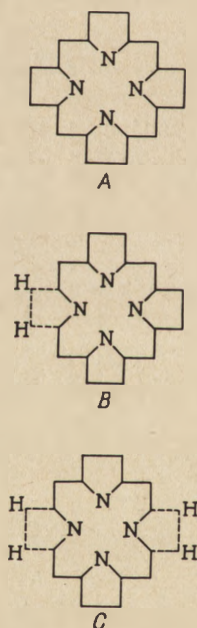
Każdy organizm fotosyntetyzujący zawiera przynajmniej jedną z odmian chlorofilu. W roślinach zielonych najważniejszą rolę gra chlorofil *a* (rysunek 3).



Rys. 3. Cząsteczka chlorofilu *a*.

Cząsteczka chlorofilu ma długi układ wiązań sprzężonych oraz atomy N i O, na których występują elektrony niewiążące ( $n$ ). Chlorofil ma zatem singletowy i tripletowy układ poziomów elektronowych związanych z wzbudzeniem elektronów  $\pi$ , oprócz których występować mogą układy poziomów związane odpowiednio z obu typami elektronów  $n$ . Wszelkie zmiany długości i kształtu układu wiązań sprzężonych mają dużo większy wpływ na własności widm tej drobiny, niż przyłączenie, lub odłączenie dużych nawet grup, nie zmieniających układu wiązań sprzężonych. (Podobne są na przykład własności widm chlorofilu i chlorofilidu, choć ten ostatni pozbawiony jest grupy fitolowej, a dość różne — protochlorofilu i chlorofilu  $a$ , choć protochlorofil różni się jedynie dwoma wodorami w pozycjach 7 i 8).

Chlorofil jest pochodną dwuhydroporfiny. Występujące w porfinie pomiędzy pozycją 7 i 8 półizolowane wiązanie podwójne jest w nim nasycone przez przyłączenie dwóch wodorów. Bakteriochlorofil jest pochodną tetrahydroporfiny, powstałej z porfiny przez przyłączenie dalszych dwóch atomów wodoru w pozycjach 3 i 4. Kształt układu wiązań protochlorofilu, chlorofilu i bakteriochlorofilu przedstawia rysunek 4.



Rys. 4. Układ wiązań sprzężonych dla: A. protochlorofilu, B. chlorofilu, C. bakteriochlorofilu.

Cząsteczka protochlorofilu ma symetrię  $D_{4h}$ , cząsteczka bakteriochlorofilu —  $D_{2h}$ , a najmniej regularny jest kształt układu wiązań sprzężonych chlorofilu. Z położenia maksimum absorpcyjnych odpowiadających poszczególnym przejściom elektronowym można wnioskować, że własności

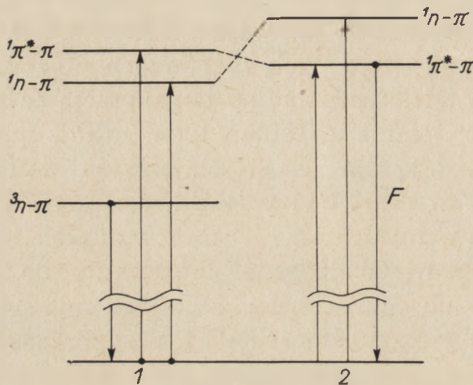
widm chlorofilu są pośrednie pomiędzy własnościami dwóch pozostałych drobin.

Z teoretycznych prac dotyczących widm porfiryn wymienić trzeba przede wszystkim prace *Platta* i *wsp.* (67, 72) oraz *Goutermana* (47, 48). Z rachunków przeprowadzonych metodami chemii kwantowej wynika, że oba pasma absorpcyjne chlorofilu (pasma *Soreta* i pasmo leżące w czerwieni) składają się z przyczynków od dwóch przejść elektronowych o wzajemnie prostopadłych kierunkach polaryzacji. Co prawda już na podstawie rysunku 4, opierając się na najprostszym modelu elektronów swobodnych zamkniętych w pudłach potencjału o kształcie wiązań, można przewidzieć, że każde przejście elektronowe typu  $\pi-\pi^*$  dla porfiry (protochlorofilu) będzie podwójnie zdegenerowane, bo obu składowym o wzajemnie prostopadłych kierunkach polaryzacji odpowiada ta sama energia. Dla tetrahydroporfiry degeneracja ta znosi się, drganiom wzdłuż dwóch wzajemnie prostopadłych boków prostokątnego pudła potencjału odpowiadają inne częstości. Wszyscy autorzy zgodnie przyznają, że położone w czerwieni pasmo absorpcyjne chlorofilu związane jest z singletowym wzbudzeniem elektronów  $\pi$ ; podobny charakter ma też pasmo *Soreta*, odpowiada jedynie wzbudzeniu do wyższego poziomu elektronowego. Co do charakteru pozostałych maksimów absorpcyjnych nie ma już takiej jednomyślności. Aby przyporządkować obserwowane maksima przejściom elektronowym lub oscylacyjnym *Sevčenko* i *wsp.* (76) podjęli systematyczne badania widmowych własności porfiryn. Autorzy ci opierając się jedynie na wynikach pomiarów (w szczególności pomiarów stopni polaryzacji fluorescencji) oraz na własnościach symetrii badanych drobin, dochodzą do wniosku, że dla porfiryn o symetrii  $D_{4h}$  pierwsze od strony długofalowej pasmo absorpcji odpowiada podwójnie zdegenerowanemu przejściu elektronowemu ze stanu podstawowego do wzbudzonego, drugie pasmo — nałożeniu oscylacji na stan wzbudzony (stany oscylacyjne). W widmie fluorescencji długofalowe maksimum powstaje przez nałożenie oscylacji na stan podstawowy. Dla porfiryn o niższej symetrii ( $D_{2h}$ ) charakter czysto elektronowy mają pierwsze i trzecie pasma absorpcji, oscylacyjny zaś — drugie i czwarte. W podobny sposób otrzymano też (56, 57) informacje o lokalizacji wodorów przy odwracalnej redukcji chlorofilu (reakcji *Krasnowskiego*).

Badania tego typu dają możliwość zlokalizowania w drobinie oscylatora absorpcji lub emisji światła, co częściowo pozwala również wyciągnąć wnioski o charakterze przejścia elektronowego, któremu odpowiada dany oscylator.

O charakterze przejścia elektronowego ( $\pi-\pi^*$  czy  $n-\pi^*$ ) wnioskować można również z przesunięć maksimów absorpcji przy zmianie polarności rozpuszczalnika. Położenie poziomu metatrawałego chlorofilu i jego wpływ na luminescencję silnie zależy od polarności ośrodka. W miarę wzrostu polarności przejścia  $\pi-\pi^*$  przesuwiają się w stronę fal dłużych, podczas

gdy przejście typu  $n-\pi^*$  jeszcze silniej w stronę fal krótkich. Według Francka (38, 39) w ośrodkach polarnych singletowy poziom  ${}^1n-\pi^*$  jest nieco wyżej położony niż  ${}^1\pi-\pi^*$  i następuje z dużą wydajnością konwersja z  ${}^1n-\pi^*$  na  ${}^1\pi-\pi^*$ , z którego obserwujemy fluorescencję. Natomiast w rozpuszczalnikach niepolarnych poziom  ${}^1n-\pi^*$  leży poniżej  ${}^1\pi-\pi^*$ , tak że następuje niepromieniste przejście z  ${}^1\pi-\pi^*$  na  ${}^1n-\pi^*$  i dalej z dużym prawdopodobieństwem konwersja na  ${}^3n-\pi^*$ . W wyniku nie obserwujemy fluorescencji, a jedynie w sprzyjających warunkach (na przykład w niskich temperaturach) możemy zaobserwować długotrwałe świecenie pochodzące z poziomu tripletowego (rysunek 5) (36).



Rys. 5. Zmiana położenia poziomów chlorofilu, ze zmianą polarności ośrodka (wg 38).  
1 — ośrodek niepolarny, 2 — ośrodek polarny, F — fluorescencja

Schemat z rysunku 5, choć bardzo często cytowany, ma swoich przeciwników. Otrzymanie długotrwałego świecenia wymaga niezwyklej wprost suchości wszystkich rozpuszczalników i nie we wszystkich laboratoriach udało się je uzyskać. Nie udało się też niestety zaobserwować przejścia w absorpcji  $S \rightarrow T$ , które powinno leżeć w bliskiej podczerwieni. Wprawdzie Krasnowski (58), zaobserwował absorpcję w obszarze 720—850 nm, ale przypisuje ją raczej zagregowanej postaci barwnika niż przejściu  $S \rightarrow T$ . Zwraca on też uwagę, że niepolarne rozpuszczalniki sprzyjają agregacji barwnika, więc pasma przypisywane przejściom  $n-\pi^*$  mogą być związane z absorpcją na przykład dimerów (59).

Dużo ciekawych informacji o układzie poziomów tripletowych chlorofilu dostarczyły badania metodą analizy błyskowej, której twórcą jest Porter. Przy pomocy błysku o dużym natężeniu można przeprowadzić około 90% drobin chlorofilu do stanu tripletowego (65). Badanie absorpcji po wzbudzeniu błyskowym daje więc odległość pomiędzy niższymi poziomami tripletowymi.

W pracowni Terenina badano świecenie wysyłane przez roztwór chlorofilu naświetlany wiązką laserową. Przy wzbudzeniu laserowym obserwowano w kierunku prostopadłym do wiązki wzbudzającej świecenie o maksimum około 480 nm. Autorzy rozpatrując szereg możliwych me-



chanizmów odpowiedzialnych za powstanie tego świecenia najbardziej skłaniają się do poglądu, że jest to przejście  $S_2 \rightarrow S_1$ . Przy wzbudzeniu mniej intensywnym, przejścia tego typu obserwowane są tylko dla barwników nie wykazujących fluorescencji z  $S_1$ , gdyż są o parę rzędów wielkości mniej prawdopodobne niż  $S_1 \rightarrow S_0$ . Ze względu na długość użytej fali nie wydaje się, aby tak efektywne wzbudzenie do poziomu  $S_2$  następowało za pośrednictwem  $S_1$ . Autorzy wysuwają hipotezę, że przy wzbudzeniu laserowym bardzo dużo drobin chlorofilu zostaje wzbudzonych do poziomu tripletowego i że przy dezaktywacji dwóch takich drobin powstaje energia wystarczająca do wzbudzenia do  $S_2$ .

Informacje o stanach tripletowych otrzymuje się również z pomiarów wygaszania — po dodaniu wygaszacza czas życia w stanie tripletowym skraca się (66).

Cały szereg prac zajmuje się przekazywaniem energii wzbudzenia w układach składających się z trzech typów drobin absorbujących, z których jednym jest chlorofil. Są to na przykład badania uczulonej przez chlorofil fluorescencji (59).

Tylko wyjątkowo kapryśnym własnościom cząsteczki chlorofilu (łatwe uleganie przemianom fotochemicznym, agregacji itp.) trzeba przypisać fakt, że mimo bardzo obszernej literatury dotyczącej jej własności w roztworach i badania tych własności wieloma nowoczesnymi metodami nie udało się dotychczas wyjaśnić wszystkich wątpliwości dotyczących charakteru poszczególnych pasm.

### 3. Chlorofil *in vivo*

Jeszcze bardziej zawiła jest sprawa własności chlorofilu *in vivo*. W komórkach towarzyszą mu liczne barwniki absorbujące światło w podobnym zakresie widma i również emitujące światło fluorescencji. Ośrodek naturalny nie jest dogodny do badań optycznych, ponieważ rozprasza światło. W komórkach pod wpływem światła zachodzi wiele reakcji, niektóre w bardzo krótkim czasie. Wspomniane już dwójakie własności chlorofilu *in vivo*, mogą być spowodowane całym szeregiem przyczyn. Rozdzielenie przyczynków pochodzących od każdego z układów barwnikowych (I i II) jest możliwe po zahamowaniu jednej z części procesu (30). Celowe wydaje się prześledzenie metod obecnie używanych w tych badaniach i poinformowanie jakich wiadomości dostarczyć może dany typ pomiaru.

### III. Metody fizyczne stosowane w badaniach *in vivo*

Wśród fizycznych metod badania procesu fotosyntezy, na pierwszym miejscu wymienić trzeba metody optyczne. Większość barwników odpowiedzialnych za absorpcję światła na potrzeby fotosyntezy fluoryzuje.

Badania absorpcji światła przez organizmy fotosyntetyzujące lub ich fragmenty i własności wysyłanego przez nie światła fluorescencji stanowią od lat źródło cennych informacji.

### 1. Absorpcja światła

W badaniach *in vivo* zjawisko rozproszenia światła oraz nierównomierne rozłożenie barwników zniekształcają widmo absorpcji i utrudniają identyfikację poszczególnych absorbentów. Trudno na przykład rozstrzygnąć, czy obserwowany efekt przesunięcia i rozszerzenia pasma chlorofilu *a in vivo*, jest spowodowany specyficzną sytuacją barwnika w organizmie, czy po prostu jest wynikiem rozprożeń. Wprowadzenie teoretyczne poprawek na rozproszenie nie jest proste, w tym celu trzeba znać wymiary cząstek rozpraszających, ich współczynnik załamania itp. W sąsiedztwie pasma absorpcyjnego, w obszarze anomalnej dyspersji, zmiana współczynnika załamania z długością fali jest na przykład funkcją kształtu i natężenia pasma absorpcyjnego (zob. np. (1, 29) itp.). Toteż efekt rozprożeń usuwa się częściej przez stosowanie urządzeń pozwalających zbierać światło z dużego kąta bryłowego (płytki opalizujące, rozwiązania pomocnicze rozpraszające, kule całkujące itp. zob. np. (1)), niż przez poprawki rachunkowe.

### 2. Pomiary szybkich zmian absorpcji

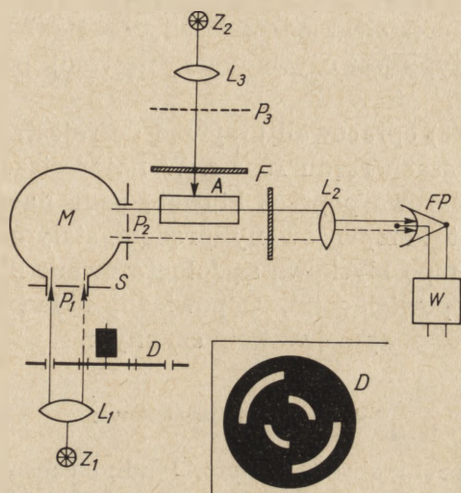
Dużą trudność w badaniach absorpcji układów fotosyntetyzujących stanowi szybki przebieg występujących w nich reakcji fotochemicznych. Przebieg reakcji fotochemicznej można badać bezpośrednio śledząc jakiś parametr fizyczny ulegający zmianie w czasie jej przebiegu; bardzo często jest to absorpcja światła. Do badania szybkich zmian absorpcji stosuje się przede wszystkim wspomniane już metody analizy błyskowej. Stężenie cząstek podlegających fotoreakcji są małe (oczekujemy zmian absorpcji rzędu 0,1%), toteż metody pomiaru muszą być nie tylko szybkie, ale i czułe. Stosuje się zarówno metodę jednego błysku, po którym mierzy się absorpcję w możliwie krótkim czasie, jak i periodyczne błyski światła wywołujące reakcję, przy czym pomiar następuje w znanym krótkim czasie po przerwaniu oświetlenia (86).

### 3. Absorpcja różnicowa

Absorpcja różnicowa pozwala mierzyć małe zmiany absorpcji. Dzieli się ją na dwa typy: przy użyciu wiązki rozszczepionej (27, 28), przy użyciu podwójnej wiązki światła (22).

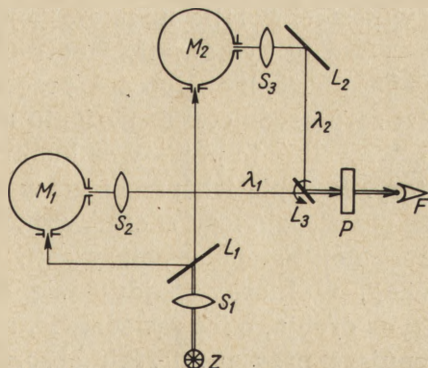
W pierwszym przypadku (rysunek 6) światło wychodzące z monochro-

matora jest podzielone przez wirujące lustro lub dysk z odpowiednimi wycięciami, na dwie wiązki zmodulowane w fazach przesuniętych względem siebie o  $180^\circ$



Rys. 6. Zestaw aparatury do pomiaru zmian absorpcji z wiązką rozdzieloną.  
 $Z_1$ ,  $Z_2$  — źródła światła, D — sektor wirujący, M — monochromator, A — preparat, F — filtry,  
 FP — fotopowielacz.

Jedna z wiązek (pomiarowa), przechodzi przez kiuwetę z zawiesziną fotosyntetyzującą, druga jest wiązką kompensacyjną. Obie padają na ten sam fotopowielacz połączony z samopisem, powodując przeciwne wychylenia samopisu. Wychylenia te kompensuje się przez osłabienie wiązki kompensacyjnej. Zmiany absorpcji wywołane przez trzecią niezmodulowaną wiązkę, są rejestrowane na samopisie. Bada się na przykład zmiany absorpcji dla ustalonej długości fali wiązek zmodulowanych w zależności od długości fali wiązki niezmodulowanej. Druga metoda przedstawiona jest na rysunku 7.



Rys. 7. Aparatura dwuwiazkowa do pomiaru zmian absorpcji.  
 $M_1$ ,  $M_2$  — monochromatory,  $L_1$  — lustro półprzezroczyste,  $L_2$  — lustro wirujące, P — preparat,  
 F — fotopowielacz.

Stosuje się w niej światło chemicznie czynne w postaci wiązki zmodulowanej. Samopis zapisuje zmianę absorpcji przed i po błysku (średnią wartość z pomiarów na przykład w ciągu minuty). W ten sposób można rejestrować szybkie i szybko zanikające zmiany absorpcji. Duże natężenia wiązki pomiarowej często zakłócają doświadczenie. Nieco zmodyfikowany przyrząd (55) tego typu jest używany do rejestracji powolniejszych zmian absorpcji.

Witt i wsp. (85) opracowali przyrząd do rejestracji zmian absorpcji zachodzących w czasach rzędu  $10^{-4}$  s. W najprostszej wersji tego przyrządu wiązka pomiarowa poprzez kiuwetę pada na fotopowielacz. Prąd fotopowielacza jest kompensowany prądem stałym. Zmiany absorpcji wywołane przez lampę błyskową są fotografowane z ekranu oscylografu połączonego z fotopowielaczem. Odpowiedni układ filtrów osłania powielacz przed rozproszonym światłem czynnym.

#### 4. Fotometria różniczkowa

Dla szerokich pasm absorpcyjnych trudno często rozstrzygnąć, czy składają się one z przyczynków od dwóch przejść elektronowych czy od jednego. Często mogą też być superpozycją przyczynków od różnych odmian barwnika. W celu analizowania tego typu pasm F r e n c h wprowadził spektrofotometrię różniczkową (43). Przyrząd kreśli od razu pochodne przepuszczalności względem długości fali dla różnych długości fal. Z kształtu tych krzywych łatwiej niż z widm absorpcji wnioskować można o ilości nałożonych na siebie pasm składowych. Tą właśnie metodą udało się F r e n c h o w i zdobyć przekonujące argumenty o istnieniu dwóch odmian chlorofilu w organizmach (44).

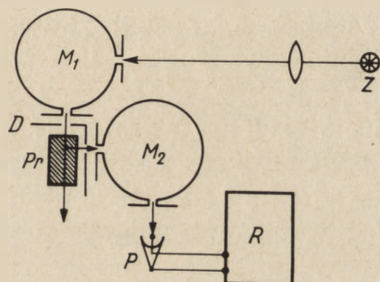
#### 5. Badania luminescencji

Energia absorbowana przez barwniki organizmów fotosyntetyzujących może być wysyłana w postaci światła luminescencji. Zgodnie ze schematem Jabłońskiego — może to być światło fluorescencji jeśli proces zachodzi bez udziału energii cieplnej, lub też proces fosforescencji, jeśli wyświecanie zachodzi za pośrednictwem poziomu metatrwałego z udziałem energii cieplnej. Wszystkie te procesy są konkurencyjne w stosunku do procesu fotosyntezy. Badanie ich przebiegu w zależności od szeregu parametrów pozwala prześledzić losy energii wzbudzenia. Badanie własności światła fluorescencji (stopnia polaryzacji, wydajności) pozwala wnioskować o sytuacji, w której znajduje się drobina luminezująca (o uporządkowaniu tych drobin, o ich sąsiedztwie, agregacji itp.).

Trudności występujące przy pomiarach absorpcji układów żywych potęgują się jeszcze przy pomiarach ich widm fluorescencji. Małe stężenia substancji powodują małe natężenia światła fluorescencji, nakładanie się

przyczynków od szeregu drobin fluoryzujących utrudnia identyfikację pasm, a zjawiska rozproszenia światła i reabsorpcji powodują konieczność wprowadzania kłopotliwych poprawek.

Najbardziej użytecznym typem aparatury do badań widm fluorescencji są zestawy składające się z dwóch ruchomych monochromatorów siatkowych, jednego w wiązce wzbudzającej, drugiego w wiązce światła fluorescencji. Za szczeliną tego drugiego monochromatora ustawia się czuły fotopowielacz połączony z samopisem (rysunek 8).



Rys. 8. Aparatura do rejestracji widm fluorescencji i widm wzbudzenia.  
 $M_1$ ,  $M_2$  — monochromatory, Pr — preparat, P — powielacz, R — samopis.

Aparatura taka pozwala mierzyć zarówno widmo fluorescencji przy ustalonej długości fali światła wzbudzającego, jak i tak zwane widmo wzbudzenia (działania) przy ustalonym przedziale widma luminescencji, o zmiennych długościach fal wzbudzających. Całość aparatury musi być wycechowana: 1. na rozkład energii w wiązce wzbudzającej, 2. na charakterystykę spektralną odbiornika światła.

Dla preparatów żywych stosuje się przeważnie wzbudzenie „od czoła” kiuwety (z tej samej strony, z której następuje obserwacja) i to wzbudzenie wiązką zbieżną, w celu uzyskania większych natężeń fluorescencji. Powoduje to jednak szereg dodatkowych trudności (przenikanie części światła wzbudzającego do powielacza, kłopotliwe poprawki na reabsorpcję i wtórną fluorescencję, niemożność stosowania takich ustawień do pomiarów anizotropii emisji itp.). Toteż na rysunku 8 przedstawione jest dogodniejsze prostopadłe ustawienie wiązki wzbudzającej i kierunku obserwacji.

## 6. Anizotropia emisji i absorpcji. Dwójłomność

W wielu teoriach fotosyntezy zakłada się dwuwymiarowe uporządkowanie cząsteczek chlorofilu w warstwach białkowych i lipidowych. Spół sposób tego uporządkowania jest istotny w procesie przekazywania energii. Jak wspomniano (14, 69) wysoki stopień uporządkowania wykazuje nie tyle większość drobin chlorofilu odpowiedzialna za absorpcję, ile nieliczne znajdujące się w centrach reakcji. Informacje o stanie uporządko-

wania otrzymuje się z pomiarów stopnia polaryzacji światła fluorescencji

( $p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$ , gdzie  $I_{\perp}$  i  $I_{\parallel}$  są odpowiednio natężeniami dwóch wzajemnie prostopadłych składowych światła fluorescencji). Pomiaru takie prowadzi się dla organizmów fotosyntetyzujących, ich fragmentów lub też sztucznie uporządkowanych drobin chlorofilu (42, 46, 82). Oprócz prostych przyrządów polegających na uzupełnieniu schematu z rysunku 8 polaryzatorem i analizatorem (46, 63) konstruowane są specjalne precyzyjne przyrządy, pozwalające dokładnie mierzyć małe stopnie polaryzacji (9, 87).

Pomiary zależności stopnia polaryzacji od długości fali światła wzbudzającego pozwalają wnioskować o charakterze poszczególnych pasm absorpcji (41).

W tym samym celu mierzy się też zależność dwójłomności preparatów żywych i modelowych od długości fali i to zarówno w obszarze normalnej jak i anomalnej dyspersji (46, 71). Z pomiarów podwójnego załamania wynika również warstwowe uporządkowanie w chloroplastach (46, 68).

#### 7. Pomiaru średnich czasów życia w stanie wzbudzonym

W badaniach mechanizmu przekazywania energii w chloroplastach istotne jest ustalenie czasu życia drobin chlorofilu w stanie wzbudzonym. Pomiaru takie prowadzili liczni autorzy (17, 18, 81). Ustalono, że czas życia chlorofilu *in vivo* wynosi około  $1,5 \times 10^{-9}$  s (17, 81). Stawia to pewne wymagania w stosunku do teorii, która ma wytłumaczyć przekazywanie energii wewnątrz jednostek fotosyntetycznych. Proces przekazywania musi być krótkotrwały w porównaniu z czasem życia w stanie wzbudzonym, jeśli w grupie kilkuset drobin energia wzbudzenia z dużą wydajnością przekazywana do centrum reakcji. W przeciwnym razie emisja kwantu fluorescencji stanowiłaby groźną konkurencję dla procesu fotochemicznego. Badanie czasów życia wskazują również na występowanie *in vivo* dwóch odmian chlorofilu.

Są dwa typy aparatów do pomiarów czasu życia. Pierwszy pochodzi od klasycznego już fluorometru G a v i o l i (73). Istotną jego część stanowią układy modulujące światło w takt przyłożonego do nich napięcia. Jeśliby emisja światła następowała natychmiastowo, to przy równej odległości obu układów od kiuwety światło wzbudzające i światło fluorescencji trafiałoby na tą samą fazę modulacji. Skończony czas życia fluorescencji powoduje konieczność przesunięcia drugiego układu modulującego, tak by światło fluorescencji przez niego się przedostawało. Teorię fluorometru opracował S z y m a n o w s k i (73), a współczesne rozwiązanie tego typu przyrządu przedstawiali B a u e r i R o z w a d o w s k i (10).

Inny typ przyrządu opracowali niezależnie od siebie B r o d y (17) i B i r k s (13). Opiera się on na wykorzystaniu bardzo krótkotrwałych

błysków światła. Natężenie światła fluorescencji po błysku fotografowane jest na ekranie oscylografu. Metoda ta wymaga wprawdzie niezwykle precyzyjnej aparatury (na przykład fotopowielacza o specjalnie krótkim czasie przebiegu elektronów), ale jest wygodniejsza w użyciu. Metodą błyskową wykonano większość prac nad chlorofilem w komórkach. Były również próby określania czasów życia stanów wzbudzonych przy pomocy laserów impulsowych (49).

### 8. Pomiary przewodnictwa

W procesie fotosyntezy chlorofil podlega redukcji i utlenieniu. Ciekawie jest więc śledzenie powstawania nośników elektrycznych metodami elektrometrycznymi. Prace takie prowadzono dla układów modelowych zbudowanych z warstw barwnika naniesionych na elektrody zanurzone w roztworze elektrolitu. Badanie zmian przewodnictwa takich układów, po oświetleniu jednej z elektrod, lub też pomiar potencjału jednej z elektrod, dostarcza informacji o zachodzących w układzie reakcjach fotoredukcji i fotoutlenienia. Obszerny przegląd tego typu badań ogłosił *Evstignejev* (35). Autor ten lansuje pogląd, że chlorofil, zależnie od ośrodka, w którym się znajduje, zachowuje się jako uczulacz reakcji utlenienia bądź też redukcji. Dwa typy chlorofilu *in vivo* powstają według niego poprzez rozłożenie chlorofilu w dwóch sąsiednich warstwach — jednej sąsiadującej z donatorem, drugiej z akceptorem elektronów, a różne sąsiedztwo powoduje różne własności fotochemiczne.

*Calvin* (19) mierzył przewodnictwo modelowych komórek, w których rolę donatora elektronów pełniła warstwa cząsteczek podobnych nieco do chlorofilu (ftalocjanina) i stwierdził, że po oświetleniu przewodnictwo rosło o wiele rzędów ( $10^7$  razy). Inni autorzy (5, 51) obserwowali *in vivo* zmiany przewodnictwa po oświetleniu.

### 9. Rezonans elektronowy (ESR)

Według sugestii wielu autorów (7, 19, 64) przy zamianie energii świetlnej na chemiczną w procesie fotosyntezy następuje oderwanie od drobiny chlorofilu uprzednio wzbudzonego elektronu. To oderwanie powoduje wytworzenie wolnych rodników. Chlorofil nabiera własności paramagnetycznych, których nie posiadał poprzednio, gdy sparowane spiny wzajemnie się kompensowały. Własności paramagnetyczne mają też drobiny wzbudzone do stanów tripletowych, w których mamy dwa niesparowane spiny. Niesparowane elektrony mogą orientować się równolegle lub przeciwnolegle do silnego zewnętrznego pola magnetycznego. Tym dwóm ustawieniom odpowiadają nieco różne energie, a różnica energii wynosi:

$$E = g \mu H$$

gdzie  $\mu$  — magnetyczny moment elektronu,  $g$  — stała Landego,  $H$  — natężenie pola magnetycznego. Z powodu oddziaływania spinowego momentu magnetycznego elektronu z orbitalnym momentem magnetycznym elektronu i magnetycznymi momentami jąder wartości  $g$  dla wolnego rodnika jest inna niż dla swobodnego elektronu. Dostarczenie kwantu o energii równej odległości pomiędzy dwoma spinowymi poziomami niesparowanego elektronu powoduje przejście pomiędzy poziomami (rezonans). Zwykle do stałej częstości mikrofalowej dopasowuje się odległość poziomów przez zmianę pola  $H$  i rejestruje się pierwszą pochodną absorpcji energii mikrofalowej jako funkcję natężenia pola magnetycznego  $H$ . Wystąpienie sygnału ESR świadczy o obecności wolnych rodników. Po odpowiednim wykalibrowaniu aparatury można na podstawie wysokości sygnału otrzymać informacje o ilości rodników. Informacje o ich charakterze uzyskuje się z badania nadsubtelnej struktury linii rezonansowej. Wolny spin elektronu rodnika oddziałuje nie tylko z polem zewnętrznym, ale i z polami momentów magnetycznych jąder wchodzących w skład danej drobin. Stąd powstaje nadsubtelna struktura, z której wnioskujemy o sąsiedztwie niesparowanego elektronu. Bardziej skomplikowaną sytuację otrzymuje się dla podwójnych rodników (na przykład drobin wzbudzonych do stanów tripletowych). Obserwacja stanów tripletowych w preparatach organicznych przy pomocy ESR jest doświadczalnie trudna i nie łatwa do zinterpretowania.

Dla materiału fotosyntetyzującego większość doświadczeń polega na pomiarze sygnału preparatu nieoświetlonego i oświetlonego. Wzrost sygnału świadczy o powstaniu wolnych rodników. Commoner (25) wyróżnia dla zawiesiny chloroplastów szpinaku dwie składowe sygnały ESR: powolną (S) i prędką (R). Stosunkowo mało poznany powolny sygnał występuje nawet pociemku, lecz wzrasta po oświetleniu. Z jego nadsubtelnej budowy wynika, że pochodzi od elektronów, w których sąsiedztwie znajdują się dwa chemicznie równoważne atomy azotu. Po przerwaniu oświetlenia znika on powoli przez kilka sekund. Brak go w układach nie wydzielających tlenu, występuje w zielonych bakteriach i roślinach. Pochodzenie tego sygnału związane jest często z plastochinonem.

Więcej informacji mamy o sygnale R. Pochodzi on od niesparowanych elektronów nie oddziaływujących z jądrami w swym sąsiedztwie. Zwykle przypisuje się go kompleksom chlorofilu z białkami, przy czym elektron pochodzący z tych kompleksów jest przypuszczalnie użyty w dalszych ciemnych reakcjach, którym zawdzięczamy sygnał S. O związku sygnału R z chlorofilem świadczą następujące obserwacje: pozbawione chlorofilu mutanty i liście hodowane w ciemności nie wykazują tego sygnału (12); sygnał typu R obserwuje się w roztworach chlorofilu (20), jego kryształach (18) i suszonych chloroplastach, a także udało się go otrzymać dla roztworu chlorofilu *b* w niskiej temperaturze (75) (w tym przypadku autorzy przyporządkowują go częściowo stanowi tripletowemu). Maksy-



num widma działania dla sygnału R przypada w okolicy pasma absorpcyjnego chlorofilu.

Podobne dwa typy sygnału obserwowali też inni autorzy (2, 78), nie ma jednak jednomyślności co do ich interpretacji. Są na przykład sugestie, że sygnał R jest związany nie ze wszystkimi, a tylko z nielicznymi drobinami chlorofilu należącymi do centrów reakcji. Inni autorzy twierdzą, że możliwe jest otrzymanie prawie wszystkich drobin chlorofilu w preparacie w postaci rodników paramagnetycznych. Brody wiąże sygnał R z dimerami chlorofilu (16), Allen (2) z chlorofilem b. Z badań kinetyki sygnału R wynika zresztą, że składają się na niego niesparowane elektrony powstające poprzez kilka różnych mechanizmów.

Wynik badań ESR zależy od wieku i przygotowania materiału doświadczalnego, natężenia światła itp. Toteż pomimo bezspornej konieczności kontynuowania tych badań dotychczasowe wyniki nie są jeszcze zbyt pewne.

Celem tego artykułu było zasygnalizowanie ogromnego „ufizycznienia” badań biologicznych w dziedzinie fotosyntezy oraz krótkie przedstawienie przeglądu metod badawczych. Warto podkreślić, że informacje otrzymane tak różnymi metodami zaczynają się pomału układać w coraz jaśniejszą całość.

#### LITERATURA

1. Allen M. B., Absorption Spectra, Spectrophotometry and Action Spectra, w Photophysiology, tom I, wyd. A. C. Giese, New York, 1964.
2. Allen M. B., Piette L. H., Murchio J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 539 (1962).
3. Arnold W., *J. Phys. Chem.* **69**, 788 (1965).
4. Arnold W., Clayton R. K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 769 (1960).
5. Arnold W., Maclay H. K., w Photochemical Apparatus Brookhaven Symp. Biol. **11**, 1 (1957).
6. Arnold W., Sherwood H. K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **43**, 105 (1957).
7. Arnon D. I., w Light and Life, wyd. W. D. Mc Elroy, Baltimore, 1961.
8. Arnon D. I., Tsujimoto H. Y., Mc Swain B. D., *Nature* **207**, 1367 (1965).
9. Bauer R., Rozwadowski M., *Optik* **18**, 37 (1961).
10. Bauer R., Rozwadowski M., *Biuletyn PAN, seria Mat. Fiz. Astr.* **7**, 365 (1959).
11. Blinks, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 327 (1960).
12. Blios M. S., Weaver J. R., Weaver E. C., w Photophysiology, tom I, wyd. A. C. Giese, New York, 1964.
13. Birks J. B., Dyson D. J., *J. Sci. Instr.* **38**, 282 (1961).
14. Brody S. S., *Science* **128**, 838 (1958).
15. Brody M., Emerson R., *J. Gen. Physiol.* **43**, 251 (1959).
16. Brody S. S., Newell G., Castner T., *J. Phys. Chem.* **64**, 554 (1960).
17. Brody S. S., Rabinowitch E., *Science* **125**, 555 (1957).
18. Butler W. L., Norris K. H., *Biochim. Biophys. Acta* **66**, 72 (1963).
19. Calvin M., *Rev. Mod. Phys.* **31**, 157 (1959).

20. Calvin M., w *Light and Life*, wyd. W. D. Mc Elroy, Baltimore 1961.
21. Calvin M., *J. Theoret. Biol.* **1**, 258 (1961).
22. Chance B., *J. Biol. Chem.* **202**, 383 (1953).
23. Clayton R. K., *Photochem. Photobiol.* **1**, 201 (1962).
24. Clayton R. K., w *Photophysiology*, wyd. A. C. Giese, tom I, New York, 1964.
25. Commoner B., Heise J., Lippincott B. B., Norberg R. E., Passonneau J. V., Townusend J., *Science* **126**, 57 (1957).
26. Davydow A. S., *J. Exper. Theoret. Phys. (USSR)* **18**, 210 (1948).
27. Duysens L. M. N., *Arch. Biol.* **76**, 251 (1965).
28. Duysens L. M. N., w *Research in Photosynthesis*, wyd. H. Gaffron, New York, 1957.
29. Duysens L.M. N., *Progress in Biophys. and Mol. Biol.* **14**, 1 (1964).
30. Duysens L. M. N., *Arch. Biol.* **76**, 251 (1965).
31. Emerson R., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **9**, 1 (1958).
32. Emerson R., Arnold W., *J. Gen. Physiol.* **16**, 191 (1932).
33. Emerson R., Lewis C. M., *Am. J. Botany* **30**, 165 (1943).
34. Evstigneev V. B., *Photochem. Photobiol.* **4**, 171 (1965).
35. Evstigneev V. B., w *Elementarnyje procesy w molekulach*, Moskwa, 1966.
36. Fernandez J., Becker R. S., *J. Chem. Phys.* **31**, 467 (1959).
37. Foerster T., w *Comparative Effects of Radiation*, wyd. M. Burton, New York, 1960.
38. Franck J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **44**, 527 (1958).
39. Franck J., Rosenberg J. L., Weiss C., w *Luminescence of Organic and Inorganic Materials*, wyd. Kallman H. P., Spruch G. New York, 1962.
40. Frąckowiak D., *Postępy Fizyki* **17**, 383 (1966).
41. Frąckowiak D., Kojro Z., Intern. Conf. on Luminescence, Budapest 1966.
42. Frąckowiak D., Kozłowski S., w przygotowaniu do druku.
43. French C. S., Proc. of I.S.A. Instrumentation and Control Symposium, Berkeley, 1957.
44. French C. S., *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, tom 5, Berlin, 1960.
45. Frenckel J., *Phys. Rev.* **37**, 17 (1931), **37**, 1276 (1931).
46. Goedheer, Teza doktorska, Utrecht 1957.
47. Gouterman M., Styer L., *J. Chem. Phys.* **37**, 2260 (1962).
48. Gouterman M., Wagniere G. H., Snyder L. C., *J. Mol. Spectr.* **11**, 108 (1963).
49. Harrison S. E., Konocky W. F., Intern. Conf. of Luminescence, Budapest, 1966.
50. Haxo F. T., Blinks L. R., *J. Gen. Physiol.* **33**, 389 (1950).
51. Ichimura S., *Biophys. J.*, **1**, 99 (1960).
52. Kamen M. D., *Primary Processes in Photosynthesis*, New York, 1963.
53. Kasha M., El-Bayoumi M. A., Rhodes W. J., *Chim. Phys.* **58**, 916 (1961).
54. Kok B., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 527 (1961).
55. Kok B., *Plant Physiol.* **34**, 184 (1959).
56. Krasnowskij A. A., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **60**, 421 (1948).
57. Krasnowskij A. A., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **11**, 363 (1960).
58. Krasnowskij A. A., *Žurn. Fiz. Chim.* **30**, 968 (1956).
59. Krasnowskij A. A., w *Elementarnyje processy w molekulach*, Moskwa, 1966.
60. Kreutz W., *Z. Naturforsch.* **18b**, 1098 (1963).
61. Kreutz W., Menke W., *Z. Naturforsch.* **15b**, 402 (1960), **15b**, 483 (1960).
62. Lalin G. H., Kobyshev G. I., Terenin A. N., Intern. Conf. on Luminescence, Budapest 1966.
63. Lavorel J., *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 20 (1964).
64. Levitt L. S., *Science* **118**, 696 (1953).

65. Linschitz K., Sarkanen K., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4826 (1958).
66. Livigston R., w *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, tom 5, Berlin 1960, str. 830.
67. Longuet-Higgins H. C., Rector W. C., Platt J. R., *J. Chem. Phys.* **18**, 1174 (1950).
68. Menke W., *Kolloid Z.*, **85**, 256 (1938).
69. Olson J. M., *Science* **135**, 100 (1962).
70. Olson J. M., Chance B., *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 26 (1960), **88**, 40 (1960).
71. Olson R. A., Butler W. L., Jennings W. H., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 144 (1960).
72. Platt J. R., *J. Chem. Phys.* **18**, 1183 (1950).
73. Pringsheim P., *Fluorescence and Phosphorescence*, New York, 1949.
74. Rabinowitch E., Govindjee, *Sci. Am.* **213**, 74 (1965).
75. Rikhireva G. T., Gribova Z. P., Kaiushin L. P., Umrikhina A. V., Krasnovskii A. A., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **159**, 196 (1964).
76. Sevčenko A. N., *Izviestia A.N. SSSR* **26**, 53 (1962).
77. Simpson W. T., Peterson D. L., *J. Chem. Phys.* **26**, 588 (1957).
78. Sogo P. B., Cartner L. A., Calvin M., w *Free Radicals in Biological Systems*, wyd. M. S. Blios, New York, 1961.
79. Thomas J. B., *Primary Photoprocesses in Biology*, Amsterdam, 1965.
80. Thomas J. B., Blaauw O. H., Duysens L. N. M., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 527 (1961).
81. Tomita G., Rabinovitch W., *Science* **125**, 555 (1957).
82. Tweet A. G., Gaines G. L., Bellamy J. R., Bellamy W. D., *J. Chem. Phys.* **41**, 1008 (1964), **40**, 2506 (1964).
83. Van Niel C. B., *Advances in Enzymol.* **1**, 263 (1941).
84. Warburg O., Ostendorf P., *Z. Naturforsch.* **18b**, 933 (1963).
85. Witt H. T., Moraw R., Muller A., *Z. Physik. Chem. N.F.* **20**, 193 (1959).
86. Witt H. T., Ruppel H., Bultemann V., *Ber. Buns. Phys. Chem.* **68**, 340 (1964).
87. Weber G., Bablouzian B., *J. Biol. Chem.* **241**, 2558 (1966).



WOJCIECH TURSKI\*, MARIA GROSS\*\*

## Kwasy nukleinowe i biosynteza białka w mitochondriach

### Nucleic Acids and Protein Biosynthesis in Mitochondria

The content of both DNA and RNA, their properties and metabolism in mitochondria are described. The role of these nucleic acids in protein biosynthesis is discussed.

Stwierdzenie w mitochondriach komórek zwierzęcych i roślinnych obecności kwasu dezoksyrybonukleinowego, różniącego się własnościami od DNA chromatyny jądrowej, wywołało żywe zainteresowanie, połączone z dużą dozą sceptycyzmu. Przypomniało ono znane od szeregu lat spostrzeżenie o biosyntezie białka w tych organellach. Spostrzeżenia te zmuszają do zastanowienia się nad koncepcją genów cytoplazmatycznych (10), nad zagadnieniami pochodzenia mitochondriów i ich autonomii (107) oraz istnienia i heterogenności ich RNA, a także nad sprawą źródeł energii potrzebnej do syntezy białek. Obok procesów egzoergicznych w mitochondriach przebiegają też procesy związane z wykorzystywaniem energii (136), a wśród nich określone miejsce znaleźć może również biosynteza białka zależna od mitochondrialnego DNA i RNA.

Pewną zbieżność dostrzec można między biosyntezą białka w mitochondriach a podobnym procesem w chloroplastach komórek roślinnych (150, 160), a także w bogatej w lipidy frakcji błon u bakterii (17, 22, 56) i drożdży (58).

Mimo, że doniesienia na temat kwasów nukleinowych i biosyntezy białka w mitochondriach spotykają się ze sceptycyzmem, a często są kontrowersyjne, powszechność tych zjawisk i duża liczba nagromadzonych faktów skłaniają do rozpatrzenia tego zagadnienia.

### I. Kwas dezoksyrybonukleinowy mitochondriów

Zagadnienie to było przedmiotem osobnego artykułu w poprzednim tomie *Postępów Biochemii*, ograniczymy się zatem do podkreślenia od-

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

\*\* Dr med., adiunkt Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Łodzi

rębności DNA mitochondriów od DNA jądrowego, jak również jego roli w kierowaniu biosyntezą RNA i białka.

W 1961 roku Novikoff (107) w artykule przeglądowym poświęconym mitochondriom pisał, że nie zawierają one DNA. Hogeboom i wsp. (62) stwierdzili, że frakcja mitochondrialna zawiera 12% fosforu DNA wątroby (około 5  $\mu\text{g}$  DNA/mg białka) uważali jednak to za zanieczyszczenie jądrowym DNA. Martin i Morton (95) wykazali w mitochondriach wielu roślin obecność DNA nie dającego się usunąć przez płukanie, uznali to jednak także za zanieczyszczenie. Doniesienie Branda i wsp. (13) o istnieniu w mitochondriach trzydniowego embrionu kurzego aż 34,5% całego DNA komórki wydaje się nieprawdopodobne, mimo że sposób ich wyodrębniania nie naruszał jąder, a DNA oznaczano czterema różnymi metodami. Autorzy nie wykluczają wprawdzie zanieczyszczenia jądrowym DNA, lecz podkreślają także możliwość innego rozmieszczenia DNA w tkankach embrjonalnych. Według Rutmana i wsp. (132) w mitochondriach wątroby szczurów w czasie kancerogenezy znajduje się około 10% całego DNA komórki, zaś Neubert (104) stwierdził, że w guzach litych zawartość mitochondrialnego DNA była wyższa niż w tkankach zdrowych, zwraca jednak uwagę, że z tkanki nowotworowej trudno jest otrzymać mitochondria nie zanieczyszczone jądrami.

Obecność DNA w mitochondriach stwierdzono metodami mikroskopii elektronowej, chemicznymi i autoradiograficznymi (wbudowywanie  $^3\text{H}$ -tymidyny) u pleśni (44, 92), drożdży (30, 68, 138), glonów (40) i pierwotniaków (157), u roślin wyższych (157) oraz w embrjonalnych i dojrzałych tkankach ptaków i ssaków (101, 102). Nass i Nass (101, 102) zaobserwowali w mikroskopie elektronowym w mitochondriach embriónów włókna bardzo zbliżone wyglądem do DNA, a znikające po traktowaniu preparatów DN-azą. Wykazali oni obecność DNA w mitochondriach również metodami chemicznymi (103). Za pochodzeniem tego DNA z mitochondriów przemawiają następujące argumenty:

1. jądra osadzono przy 2500 g (zwykle 700 do 1000 g), aby tracąc nawet dużą część mitochondriów, pozbyć się jąder.
2. przemywanie mitochondriów nie zmieniało zawartości DNA,
3. wysokopolimeryzowany DNA dodany do zawiesiny mitochondriów nie absorbował się na ich powierzchni.
4. ilość DNA pochodzącego z zanieczyszczeń jądrowych, obliczona na podstawie liczenia jąder wybarwionych metodą Feulgena, stanowić mogła mniej niż jeden procent DNA znalezionej w mitochondriach.

Posługiwanie się metodą Feulgena może nasuwać wątpliwości. Chevremont (26) tą właśnie metodą obok metod radiograficznych wykazał obecność DNA w mitochondriach fibroblastów kurczenia, zaś Pollister (113) stwierdził brak powinowactwa barwników zasadowych do olbrzymich mitochondriów spermatydów i tę obserwację oraz brak

absorpcji w ultrafiolecie uznał za dowód, iż nie zawierają one DNA ani RNA.

Według Nassów DNA mitochondriów różni się od jądrowego przede wszystkim znacznie większą opornością na działanie DN-azy dodanej do zawiesiny mitochondriów. Podatność wobec DN-azy wzrasta po rozbiciu mitochondriów ultradźwiękami, zamrożeniu i rozmrożeniu lub traktowaniu mocznikiem, jednakże DNA wyodrębniony metodą Schmidta—Thannhausera jest rozkładany tylko w 30%. Ta oporność jest w pewnej mierze sprzeczna ze znikaniem pod wpływem DN-azy włókien DNA-podobnych z preparatów mitochondriów embrionalnych. Nass i Nass (103) podkreślają, że włókna te są dużo lepiej widoczne w mitochondriach embrionalnych, co można kojarzyć z wynikami badań Branda i wsp. (13). Być może w mitochondriach embrionalnych jest więcej DNA i jest on łatwiej rozkładany przez DN-azę. Oporność wewnątrzmitochondrialnego DNA na DN-azę pozwala na oczyszczenie mitochondriów od DNA jądrowego przez ich inkubację z DN-azą (25., 114). Ten sam skutek co działanie DN-azą daje kilkakrotne przemywanie mitochondriów (25). Oporność DNA wobec DN-azy w nietkniętych mitochondriach tłumaczy Kroon (85) barierą przepuszczalności, która nie pozwala enzymowi na dotarcie do substratu. Częściowa oporność na DN-azę wyodrębnionego z mitochondriów DNA nie jest cechą ogólną ponieważ DNA z mitochondriów roślin trawi się DN-azą całkowicie (25). Oporność ta nie jest prawdopodobnie związana z obecnością białek mitochondrialnych, wiadomo bowiem, że DNA jądrowy wobec znacznego ich nadmiaru jest całkowicie trawiony (103), może ona natomiast wynikać z odrębności drugorzędowej struktury tego DNA. Badania w mikroskopie elektronowym wykazały, że mitochondrialny DNA z wątroby kurczęcia i myszy oraz z serca wołu, zawiera głównie cząsteczki silnie skręcone i zamknięte w koło (19). Przypomina to „replikacyjną” formę DNA wirusów i fagów (152).

Zawartość DNA w mitochondriach określano metodą Schmidta—Thannhausera—Schneidera (57, 85). Ilości DNA w mitochondriach wątroby szczura podawane przez Nassów (103) oraz Schatza i wsp. (138) (0,4—0,8 µg/mg białka) są najmniejszymi z cytowanych w dostępnej nam literaturze. Schatz i wsp. (138) oczyszczali mitochondria z drożdży przez wirowanie w gradiencie gęstości sacharozy, jednak aby DNA był skupiony tylko w paśmie oczyszczonych mitochondriów wyodrębniali je przez tzw. flotację z zastosowaniem gradientu stężeń urografiny (*N,N*-dwuacetylo-3,5-dwuamino-2,4,6-trójjodobenzoenu) i stwierdzili, że mitochondria te zawierają 1,1—4,3 µg DNA na mg białka. DNA z mitochondriów wyizolowano za pomocą metody detergentowej (19, 25, 30, 44, 114).

Ostatnio w pracowni Marmura oczyszczono mitochondria z drożdży, serca i wątroby za pomocą nieciągnącego gradientu fikolu (Ficoll) i wyodrębniono z nich DNA, który następnie oczyszczano z RNA przez trakto-

wanie RN-azą (30). DNA z oczyszczonych mitochondriów wątroby otrzymali także Borst i Ruttenberg (19), a z pleśni *Physarum polycephalum* — Evans (44).

W celu stwierdzenia odrębności DNA mitochondrialnego od DNA jądrowego porównywano zależność absorpcji w ultrafiolecie od temperatury, a także rozdział przez wirowanie w gradiencie gęstości CsCl. Okazało się, że gęstość pozorna (ang. *buoyant density*) mitochondrialnego DNA z serca embrionu kurzego (1,707) jest wyższa niż jądrowego DNA (1,698). Wskazuje to na większą zawartość guaniny i cytozyny w DNA mitochondrialnym (47,5%) niż w DNA jądrowym (40%) i wiąże się z wyższą temperaturą przejścia ( $T_m$ ) (66°C dla DNA mitochondrialnego i 61°C dla DNA jądrowego). Podobne dane uzyskano w pracowni Marmura (30): gęstość pozorna dla DNA z mitochondriów serca owcy wynosi 1,714 (dla DNA jądrowego 1,704) a z wątroby kurczęcia 1,707 (dla jądrowego 1,701). Dowodzenie odrębności DNA na podstawie gęstości pozornej nie jest wolne od pewnych zastrzeżeń. Jednym z nich jest występowanie tak zwanego satelitarnego DNA (ang. *satelite DNA*). Frakcja ta o gęstości pozornej wyższej niż DNA jądrowy pojawia się przy rozdziale DNA całych komórek w gradiencie chlorku cezu. Satelitarny DNA występuje jednak również w preparatach z oczyszczonych jąder, a ponadto nie ulega „wzbogaceniu” we frakcji mitochondrialnego DNA. Być może jest to zdenaturowany DNA jądrowy, jakkolwiek jego gęstość pozorna (1,718) jest bliska wartości dla zdenaturowanego mitochondrialnego DNA (1,721). Rabinowitz (114), Corneo i wsp. (30) oraz Borst i wsp. (19) nie uzyskali w ogóle DNA satelitarnego z wysoce oczyszczonych mitochondriów. Drugie zastrzeżenie wiąże się z tym, że DNA mitochondrialny u pewnych gatunków ssaków ma tę samą gęstość pozorną co jądrowy, zaś DNA z mitochondriów drożdży i pleśni ma mniejszą gęstość pozorną niż jądrowy (30). Należy dodać, że DNA z mitochondriów różnych organizmów (za wyjątkiem pierwotniaków) mają bardzo podobną gęstość pozorną (17). Corneo (30) sugeruje, że różnice w gęstości pozornej mogą wynikać nie tylko z innej proporcji guaniny i cytozyny, ale i z różnej zawartości nietypowych metylowanych zasad, na przykład DNA z chloroplastów *Euglena gracilis* zawiera mniej metylocytozyny niż jądrowy DNA (117).

Czy wobec tego ta sama gęstość pozorna mitochondrialnego i jądrowego DNA nie świadczy o braku odrębności? Na to pytanie odpowiedziały badania, w których wykazano (16, 18, 19, 30), że DNA mitochondrialny zdenaturowany alkaliom i renaturowany przez dwugodzinne ogrzewanie zubożonego roztworu w 70°C odzyskuje prawie całkowicie pierwotną gęstość pozorną. Ta zdolność do renaturacji różni DNA mitochondrialny od DNA jądrowego, a także od DNA bakteryjnego, nawet jeżeli ich pierwotne gęstości pozorne są jednakowe.

Stała sedymentacji DNA mitochondrialnego wynosi 39—42  $S_{20w}$ , znaleziono jednak również składnik o  $S_{20w}$  od 27 do 29 stanowiący, być może,



połówkę dwułańcuchowej spirali (19). DNA mitochondriów siewek grochu ma stałą sedymentacji równą  $14 S_{20}$  (25).

DNA mitochondriów jest syntetyzowany w tych organellach na co wskazuje znakowanie trytowaną tymidyną *in vivo* i *in vitro*. Podkreślić należy pewne odrębności tej syntezy:

1. Aktywność właściwa DNA z mitochondriów zwierzęcych jest do 30 razy większa niż DNA jądrowego (6, 103), u *Physarum polycephalum* zaś — 80 razy.

2. Wbudowywanie tymidyny w DNA mitochondriów zwierzęcych nie jest równoległe do podziałów komórkowych (6) jak w przypadku DNA jądrowego. U *Physarum polycephalum* DNA wewnątrz mitochondriów syntetyzuje się w fazie  $G_2$ , podczas gdy DNA jądrowy jest całkowicie syntetyzowany w fazie S, w ciągu 2—3 pierwszych godzin interfazy (44). Synteza DNA w mitochondriach *Tetrahymena pyriformis* odbywa się w fazie  $G_1$  i  $G_2$  (109, 134).

3. Okres połowicznego rozpadu biologicznego, mierzony przez retencję tymidyny, wynosi dla DNA mitochondriów zwierzęcych około 9 dni, natomiast dla DNA jąder przewyższa 100 dni (6).

Ciekawe są prace (1) nad nisko spolimeryzowanym DNA, bardzo silnie związanym z cytochromem  $b_2$  u drożdży. Wiązanie to jest tak silne, że cały kompleks ten krystalizuje, a jeżeli DNA zostanie zniszczony trzustkową DN-azą, to cytochromu  $b_2$  nie można wykrystalizować. S y m o n s (158) badał trwałość połączeń tego DNA z flawohemoproteidem i sugeruje obecność słabych wiązań, gdyż ulegają one rozerwaniu przy eluowaniu z DEAE-celulozy liniowym gradientem NaCl (pH 7), a częściowo i przy wirowaniu w gradiencie gęstości sacharozy. Ten DNA różni się drastycznie składem nukleotydowym od całkowitego DNA drożdży. Jest on dwułańcuchowy a jego masa cząsteczkowa wynosi około 100 000. Jest to DNA o najniższej masie cząsteczkowej z dotąd poznanych, znacznie niższej od wartości dla „małego” jednołańcuchowego DNA faga  $\Phi X 174$  ( $1,7 \times 10^6$ ) (148), jeżeli nie brać pod uwagę wzmianki o DNA z kiełków żyta o masie cząsteczkowej 200—300 tysięcy (136). Nisko spolimeryzowany DNA z drożdży jest prawdopodobnie heterogenny i może służyć jako „primer” dla polimerazy DNA z *E. coli* (67). A p p l e b y i M o r t o n (2) sugerują iż jest on w jakiś sposób związany z syntezą cytochromu  $b_2$ .

Zawartość DNA wszystkich mitochondriów komórki (w większości tkanek) wynosi średnio  $1 \times 10^{-16}$  g, a więc jest w przybliżeniu równa zawartości DNA przypadającej na jeden chloroplast (103). Sumaryczna ilość informacji genetycznej „niesionej” przez mitochondria stanowiłaby zatem 0,5 do 1% informacji genetycznej jądra (patrz także (64)). Biorąc pod uwagę, że DNA mitochondriów syntetyzuje się dużo szybciej niż jądrowy oraz zakładając, że większa część łańcucha jest niezablokowana, nie można pominąć jego udziału w przekazywaniu informacji genetycznej.

Być może wystarcza on do kierowania autonomiczną syntezą przynajmniej części składników łańcucha oddechowego (66, 100).

## II. Kwas rybonukleinowy mitochondriów

Obecność RNA w mitochondriach sugerował Claude (28) w 1946 roku. Hogeboom i Schneider (61) w artykule przeglądowym z 1951 roku podali, że mitochondria zawierają 18,4  $\mu\text{g}$  P-RNA na miligram azotu białkowego, co stanowi 16,8% P-RNA pełnego homogenatu. Próby usunięcia tego RNA przez powtórny sedymentację mitochondriów nie dawały rezultatów (43), rosła natomiast ilość doniesień o obecności RNA w tych organellach. RNA we frakcji mitochondrialnej stwierdzili między innymi Siekewitz i Watson (142) oraz Rendi i wsp. (121), a McLean i wsp. (98) znaleźli 10  $\mu\text{g}$  RNA na mg białka mitochondriów. Rutman i wsp. (131) stwierdzili, że w czasie kancerogenezy u szczurów maleje zawartość RNA i białka we frakcji mitochondrialnej, osiągając najniższe wartości dla dojrzałej hepatomy.

Richter (122) zaobserwował, że przy eksperymentalnym zatruciu  $\text{CCl}_4$  myszy zawartość RNA we frakcji mitochondrialnej wątroby maleje z 4,47% do 2,1% RNA pełnego homogenatu. Obniżenie zawartości RNA (z 15,6 do 10% RNA homogenatu) występowało również we frakcji, którą sądząc z szybkości sedymentacji, można uważać zgodnie z danymi szkoły DeDuve (37) za tak zwane lekkie mitochondria, to znaczy frakcję bogatą w lizosomy (107). Borkowski i wsp. (14) znaleźli RNA w mitochondriach z poszczególnych odcinków centralnego układu nerwowego u szczurów. Zdaniem Szabadasza (159) ilość RNA mitochondrialnego jest charakterystyczna dla poszczególnych rodzajów tkanek.

Z drugiej strony Novikoff (107) w 1961 roku próbował zebrać dowody, iż większość (jeżeli nie cały) RNA mitochondriów pochodzi z zanieczyszczeń mikrosomami. Według jego własnych badań przemywanie mitochondriów z wątroby zmniejsza tak ilość RNA, jak i aktywność esterazy, przyjętej za wskaźnik obecności mikrosomów. Cytuje on również innych autorów (99, 113, 130), którzy badając absorpcję światła ultrafioletowego i powinowactwo mitochondriów do barwników zasadowych doszli do wniosku, że stężenie RNA (jeżeli jest on wogóle) wynosić może zaledwie 0,1%. Birbeck i Reid (12) otrzymali podfrakcję mitochondriów zawierającą 8—9% RNA homogenatu, ale i tyleż procent aktywności glukozy-6-fosfatazy, a ponadto w mikroskopie elektronowym wykazano obecność granulek rybonukleoproteidowych, co wskazuje na zanieczyszczenie mikrosomami. Kuff i Dalton (87) oznaczali w mitochondriach pozbawionych tych granulek 5% całkowitego RNA. Paigen (108) frakcjonując mitochondria zaobserwował, że zawartość fosforu RNA (6—20  $\mu\text{g}$  P na mg azotu) wzrasta odwrotnie proporcjonalnie do rozmiaru

cząsteczek (167), mimo iż nie zmienia się aktywność oksydaz cytochromowej i bursztynianowej, ani też fosfor lipidowy i białkowy. Kuff i Schneider (86) stwierdzili, że frakcja mitochondriów najbogatsza w dehydrogenazę bursztynianową zawiera najmniej RNA.

Martin i Morton (95) badali mitochondria roślin i znaleźli w niepłukanych mitochondriach bulw ziemniaka 136—207  $\mu\text{g}$  P-RNA na mg całkowitego azotu (w mikrosomach 198—243), a w płukanych mitochondriach łodyg buraka i kielków żyta 6,8—9,5  $\mu\text{g}$  P-RNA na mg N białkowego. Stwierdzili też, że płukanie mitochondriów z siewek grochu obniża zawartość RNA z 27 do 10,5  $\mu\text{g}$  P-RNA/mg N białkowego. Kontrolersyjna wydaje się praca Branda i wsp. (13) którzy znaleźli u trzydniowego embrionu kurzego 48,1% całego RNA komórki w mitochondriach, 40% w jądrach, a tylko 3,3% w mikrosomach. Być może przyczyną takich wyników było wstępne wirowanie mitochondriów przy znacznej sile odśrodkowej (30 000 g, 10 minut).

Wyniki badań wielu autorów wskazują jednak, że RNA we frakcji mitochondrialnej nie pochodzi z zanieczyszczeń mikrosomami. Staranne frakcjonowanie homogenatów komórek nie prowadzi do uzyskania mitochondriów wolnych od RNA (117). Obecność RNA stwierdzono w mitochondriach wielokrotnie przemytych (127), oczyszczonych za pomocą wirowania w gradiencie gęstości sacharozy (35) lub flotacji w urografinie (138, 172). W mitochondriach inkubowanych z rybonukleazą trzustkową również znaleziono RNA (82, 115), co wynika zapewne stąd, że enzym ten nie jest w stanie dotrzeć do substratu znajdującego się wewnątrz organelli (71, 83, 124).

Inną grupą dowodów na to, że RNA jest integralną częścią mitochondriów stanowi stwierdzenie jego obecności we fragmentach submitochondrialnych. Już w 1957 roku Harel i wsp. (57) wykazali, że jeśli mitochondria wątroby szczura zamrożone i następnie rozmrożone wirować przez 30 minut przy 40 000 g, to w supernatancie nie ma ani RNA, ani lipidów, natomiast osad zawierający RNA wykazuje obecność fosfolipidów i dehydrogenazy bursztynianowej. Roodyn i wsp. (123) rozbijali pięciokrotnie przemyte mitochondria wątroby szczura *Tritonem* X-100 i stwierdzili, że frakcja otrzymana przez 1-godzinne wirowanie przy 105 000 g zawierająca najwięcej RNA i fosfolipidów, wykazuje też największą aktywność oksydazy bursztynianowej. Stosunek RNA do białka i fosfolipidów w osadzie wynosił 5 : 100 : 32, co nie odpowiada składowi ani pełnej frakcji mikrosomowej ani rybosomów cytoplazmatycznych. Podobne obserwacje poczynił Kroon (80, 85) dla fragmentów uzyskanych przez działanie digitoniny z mitochondriów serca wołu uprzednio inkubowanych z RN-azą. Wyniki te są zgodne z obserwacją Schatza (138), że frakcja mitochondriów oczyszczana przez flotację w urografinie wzbogaca się zarówno w kwasy nukleinowe jak i w enzymy mitochondrialne.

Sprawa heterogenności RNA w mitochondriach, występowania w nich

rybosomów i ich odrębności w stosunku do rybosomów cytoplazmatycznych jest sporna. W 1959 R e n d i (120) sugerował, że mitochondria zawierają rybosomy, ale struktur tych nie dostrzeżono za pomocą mikroskopii elektronowej (142). K r o o n (84) próbował uzyskać wysokopolimeryzowany RNA z mitochondriów metodą fenolową dodając siarczanu dodecyłu i bentonitu (inhibitora RN-azy). W temperaturze 0 do 5 stopni większość RNA uległa ekstrakcji, przy czym jego stała sedymentacji była podobna do wartości dla rozpuszczalnego RNA z cytoplazmy (4S), a nie znaleziono typowych RNA rybosomowych o 16S i 23S. R o o d y n (129) również twierdzi, że w mitochondriach nie daje się wykryć ani rybosomów, ani polisomów. Jego zdaniem większość RNA ekstrahuje się z trudem i jest związana z błonami mitochondriów, natomiast poziom rozpuszczalnego RNA jest bardzo niski (do 1  $\mu$ g/mg białka). T r u m a n i K o r n e r (162) działając dezoksychohanem na oczyszczone mitochondria otrzymali zawierające do 15% RNA fragmenty o stałej sedymentacji 77S (obok małych ilości cząsteczek 120S i 45S). Wyodrębniony z nich RNA charakteryzował się stałą sedymentacji 8,39, a więc pośrednią między wartościami dla rozpuszczalnego i rybosomowego RNA. T r u m a n (166) frakcjonując mitochondria różnymi stężeniami etanolu otrzymał cząstki wzbogacone w RNA, fosfolipidy, oksydazę bursztynianową i NADH<sub>2</sub>-dehydrogenazę, przy czym, w przeciwieństwie do rybosomów, trwałość tych fragmentów nie zależała od stężenia jonów magnezu. W i n t e r s b e r g e r i T u p p y (173) stosując metodę fenolowo-detergentową H i a t t a (60), uzyskali z mitochondriów drożdży RNA składający się z trzech frakcji 4S, 16S i 23S, co potwierdzałoby sugestie R e n d i e g o (120) o istnieniu w mitochondriach wszystkich frakcji RNA niezbędnych do biosyntezy białka. Jednakże RNA 4S z mitochondriów w porównaniu z cytoplazmatycznym miał znikomą zdolność do łączenia się z aminokwasami. Ostatnio w oczyszczonych mitochondriach preinkubowanych z RN-azą i, według danych mikroskopii elektronowej wolnych od mikrosomów, R a b i n o w i t z i w s p. (115) stwierdzili obecność rybosomów. Miały one identyczną stałą sedymentacji i skład nukleotydowy RNA jak rybosomy cytoplazmatyczne i były aktywne w procesie biosyntezy białka. Również E l a e v (42) znalazł rybosomy w oczyszczonych mitochondriach serca wołu i szczura. Z mitochondriów tych zhomogenizowanych w 1,25—1,5% dezoksychohanie sodu przy stężeniu magnezu 0,01M uzyskał on przez wirowanie przy 110 000 g przez 1,5 godziny w tym samym medium cząstki o stałej sedymentacji 83S i 63S, zawierające około 35—40% RNA. Droga wirowania przez 3 godziny przy 135 000 g uzyskał cząstki o stałej sedymentacji 46S, które przez powtórne wirowanie oczyścił częściowo od osadzających się razem białek balastowych. Zdaniem Elaeva rybosomy mitochondrialne mają stałą sedymentacji 83S i składają się z podjednostek 63S i 46S, natomiast frakcja błon mitochondriów zawiera jedynie 4% RNA tych organelli i nie ma nic wspólnego z ich rybosomami. Elaev stwierdził,

że 80—90% całego RNA mitochondriów przypada na rybosomy mitochondrialne, a reszta — na niskopolimeryzowany RNA, być może o właściwościach RNA przenoszącego. Rybosomy w mitochondriach stanowią 1—1,4%, we frakcji mikrosomów zaś 18 do 32% suchej masy.

Na temat składu nukleotydowego RNA mitochondrialnego nie wiele wiadomo. Z dawniejszych danych, dotyczących składu nukleotydowego RNA izolowanego metodą Schmidta—Tannhausera z mitochondriów nieoczyszczonych wspomnieć można wyniki Crosbiego (32), który twierdził, że skład nukleotydowy RNA frakcji mitochondrialnej zasadniczo nie różni się RNA mikrosomów oraz Elsona i Chargaffa (43), którzy zanotowali pewne różnice w składzie nukleotydowym. Z nowszych prac wymienić należy badania Borkowskiego (15) nad RNA mitochondriów z centralnego układu nerwowego szczura. Skład nukleotydowy RNA mitochondriów pochodzących z różnych odcinków tego układu był prawie jednakowy i dla RNA kory mózgowej przedstawiał się następująco: kwas cytydylowy 36,6%, adenylowy 14,9%, guanylowy 28,1%, urydylowy 20,4%. Stosunek puryn do pirymidyn wahający się od 0,8 do 0,9 z wybitną przewagą typu GC i kolejność nukleotydów według malejącego udziału (C G U A) wskazują na podobieństwo tego RNA do RNA rybosomów z tym, że cechuje go szczególnie niska zawartość kwasu adenylowego.

Wiele przemawia za tym, że RNA mitochondrialny jest syntetyzowany *in situ* na matrycy mitochondrialnego DNA. Z obserwacji Schneidera (140), że w mitochondriach, inkubowanych *in vitro* wobec jąder, znakowanych *in vivo* kwasem 6-<sup>14</sup>C orotowym, odnaleźć można tylko bardzo mało radioaktywnego RNA, wynikałoby iż RNA, zsyntetyzowany w jądrze, nie wnika do struktur mitochondrialnych. Szybkie wbudowywanie znakowanych prekursorów w RNA mitochondriów, hamowane przez aktynomycynę, zaobserwowano u *Neurospora crassa* (92) u drożdży i w wątrobie szczura (172), a także w innych komórkach ssaków (105). Wintersberger (172) wykazał, że wbudowywanie trytowanej urydyny *in vitro* do mitochondriów wątroby szczura jest hamowane przez aktynomycynę D, co wskazuje na występowanie w tych organellach zależnej od DNA polimerazy RNA (174). Donosi on też (174) o wbudowywaniu trytowanego ATP i UTP do mitochondriów drożdży *in vitro*. Szybkie wbudowywanie prekursorów, proporcjonalne do ilości białka mitochondrialnego i czasu, uwarunkowane było obecnością wszystkich czterech 5'-nukleozydotrójfosforanów oraz jonów magnezu, a obecność ATP i układu regenerującego ATP wzmagala wbudowywanie. Natomiast Roodyn (129) sugeruje, że ilość mRNA, jeżeli w ogóle jest on w mitochondriach, jest znikomo mała i maskowana przez pozostałe frakcje RNA. Stymulując hormonem tarczycy wbudowywanie aminokwasów do białka w mitochondriach nie stwierdził on jakichkolwiek zmian w zawartości RNA lub w jego absorpcji w ultrafioletcie w środowisku kwaśnym i zasa-

dowym. Działanie tego hormonu sprowadza się do wpływu na ilość mRNA poprzez stymulację zależnej od DNA polimerazy RNA (115). Nie wydaje się jednak, aby synteza mRNA musiała pociągać za sobą takie zmiany w obrazie całkowitego RNA jakich spodziewał się Roodyn. Kroon (84) również nie zdołał wykryć mRNA, aczkolwiek wnioskuje on o jego obecności z dowodów pośrednich, związanych z biosyntezą białka. Zdaniem Lucka i Reicha (92) biosynteza RNA, śledzona przez wbudowywanie trytowanego GMP, nie zależy od RN-azy i DN-azy i osiąga maksimum już po 5 minutach. Trudno jest wobec tego zrozumieć liniową zależność wbudowywania aminokwasów od czasu, utrzymującą się przez 1—3 godzin *in vitro*, jeżeli by synteza białka w mitochondriach wymagała nie trwałego mRNA ale mRNA ciągle powstającego na matrycy DNA. Tymczasem za tą drugą ewentualnością przemawia hamowanie przez aktynowycynę biosyntezy nie tylko RNA ale i białka.

Według Neuberta i wsp. (105) zależna od DNA polimeraza RNA mitochondrialna różni się tym od jądrowej, że ma niższą stałą Michaelisa w stosunku do substratów i znajduje się wewnątrz bariery przepuszczalności mitochondriów. Wbudowuje ona w łańcuch RNA (a nie na jego końcu) tylko 5'-trójfosforany nukleozydów, przy czym muszą być obecne pochodne wszystkich czterech zasad. Reakcja hamowana jest przez aktynowycyny C i D, cinerubinę A, proflawinę, akryflawinę i pirofosforan. Aktynowycyna C *in vivo* hamuje tylko jądrową polimerazę RNA, a cyklofosfoamid przy krótkim czasie działania hamuje tylko zależną od DNA polimerazę RNA mitochondriów. Zdaniem Neuberta (154) rozdział na frakcje w gradiencie sacharozy jak i rozłożenie radioaktywności w tych frakcjach są inne dla mitochondrialnego RNA (izolowanego metodą fenolowo-detergentową (139)) niż dla RNA rybosomowego i cytoplazmatycznego. Synteza RNA o wysokiej aktywności właściwej, uzależniona od DNA czystych mitochondriów, i to RNA stymulującego wbudowywanie aminokwasów do białka w układzie rybosomów (105), świadczy, iż ma on pewne właściwości mRNA.

Obserwacje, że mitochondrialny RNA hybrydyzuje zarówno z DNA mitochondrialnym jak i z DNA jądrowym (66), nie wyjaśnia, który z nich służy jako matryca, tym bardziej, że na przykład rybosomowy RNA z cytoplazmy hepatomy hybrydyzuje z DNA jąder zarówno hepatomy jak i zdrowej wątroby (70). Gieorgiew i wsp. (50a) wykazali, że aktynowycyny C i D, podane w małych ilościach, blokują przede wszystkim syntezę RNA typu rybosomowego a nie typu informacyjnego, to też w obecności małych dawek aktynowycyny syntetyzuje się głównie mRNA. Samarina (135) zaś stwierdziła, że *in vivo* w mitochondriach wątroby szczura skład nowopowstającego RNA zmienia się w zależności od dawki aktynowycyny i przy małej dawce zwiększa się synteza RNA o składzie podobnym do DNA jądrowego. Maksymalny udział tego RNA sięga 44% całego nowopowstającego RNA mitochondriów. Być może aktynowycyna

blokuje syntezę rybosomowego RNA mitochondriów na matrycy ich DNA. Można tu rozważać, że: a) część mRNA mitochondrialnego pochodzi z jądra, b) skład nukleotydowy odcinków DNA, na których syntetyzuje się mRNA w jądrach i mitochondriach jest taki sam. Należałoby zatem porównać skład nowopowstającego RNA w mitochondriach ze składem mitochondrialnego DNA.

Pewne dane wskazują na istnienie w mitochondriach małej ilości hybrydu DNA i RNA. Według danych Nass i Nass (103) we frakcji DNA z mitochondriów znajduje się prawie tyle RNA (0,53  $\mu\text{g}/\text{mg}$  białka) co DNA (0,65  $\mu\text{g}/\text{mg}$  białka). Stanowi to około 6% całego RNA mitochondriów. Ten RNA jest oporny na alkalia, tylko w niewielkim stopniu uwalnia się pod wpływem RN-azy, czy DN-azy i daje nieco inną reakcję barwną z cysteiną i  $\text{H}_2\text{SO}_4$  niż wzorcowy RNA. Chatterjee i wsp. (25) stwierdzili, że również w siewkach grochu nie można usunąć około 5% RNA z preparatów DNA działaniem RN-azy.

Wpływ hormonów na biosyntezę RNA mitochondrialnego jest bardzo mało zbadany. Tata i wsp. (161) stwierdzili, że *in vivo* trójiodotyronina zwiększa o około 40% znakowanie RNA mitochondrialnego kwasem  $^{14}\text{C}$  orotowym, jednakże aktywność właściwa tego szybko znakującego się RNA była około trzech razy niższa niż RNA rybosomów i supernatantu, a blisko 100 razy niższa niż RNA jądrowego. Wbudowanie  $^{32}\text{P}$  pod wpływem tego hormonu zwiększa się o prawie 100% w mitochondriach, ale w innych frakcjach (szczególnie w jądrach) wzrost ten jest dużo wyższy. Ostatnio Civen i wsp. (27) stwierdzili zwiększone wbudowywanie  $^{14}\text{C}$  urydyny do RNA skrawków jajnika królika pod wpływem hormonu luteinizującego, stymulacja była jednak mniejsza w mitochondriach niż w jądrach i we frakcji „pomitochondrialnej”. Lowe i wsp. (89) zaobserwowali, że duże dawki kortyzonu powodują w mitochondriach szczura obok innych zmian, całkowity zanik RNA dającego się wytrącić alkoholem (prawdopodobnie wysoko spolimeryzowanego). Feigelson i wsp. (47) stwierdzili wyraźny wzrost włączania  $^{32}\text{P}$  do mitochondrialnego RNA pod wpływem małej pojedynczej dawki kortyzonu. Wzrost ten był szybszy niż dla frakcji mikrosomowej, a nawet jądrowej. Po podaniu kortyzonu szybkość syntezy mitochondrialnego RNA była większa i wzrastała szybciej w wątrobie regenerującej niż w wątrobie normalnej. Według dawniejszych prac, między innymi Smellie (151), szybkość włączania prekursorów do mitochondrialnego RNA jest równa lub nawet wyższa (76) od wartości dla RNA mikrosomów, niższa niż dla RNA supernatantu cytoplazmatycznego, a dużo niższa niż dla RNA jądrowego. Należy dodać, że według Werkhuisera (171) mitochondria są nieprzepuszczalne dla nukleotydów. Tata i Widnell (161) doszli do wniosku, że wyniki badań nad wpływem hormonu wzrostu na włączanie prekursorów do RNA mitochondriów wątroby u szczurów z usuniętą przysadką są niejednoznaczne. Badania wykonane w naszej pracowni (4) wskazują, że hormon

wzrostu działając przez bardzo krótki okres czasu wywołuje prawie całkowite zahamowanie włączania  $^{32}\text{P}$ -ortofosforanu do mitochondrialnego RNA, przy jednoczesnym obniżeniu aktywności właściwej RNA jądrowego do połowy. Przy dłuższym działaniu hormonu zaobserwowano wzrost aktywności właściwej RNA mitochondrialnego. RNA wyodrębniono metodą fenolowo-detergentową (170) i oczyszczono z niskopolimeryzowanych związków fosforowych przez wytrącenie cetavlonem (116).

### III. Biosynteza białka w mitochondriach

Już od roku 1950 wiadano, że w mitochondriach może zachodzić zużywająca ATP synteza związków mających wiązanie peptydowe na przykład kwasu hippurowego (88) i *p*-amino-hippurowego (77). W 1952 roku Siekiewitz (141) doniósł o znikomym włączaniu  $^{14}\text{C}$ -alaniny do izolowanych mitochondriów wątroby. W mieszaninie mitochondriów z mikrosomami włączanie było znacznie intensywniejsze, a rodzaj czynników hamujących tę reakcję wskazywał, że mitochondria były tu przede wszystkim (jeżeli nie jedynie) źródłem energii niezbędnej do syntezy białka w mikrosomach.

Według Kellera i wsp. (75) włączanie  $^{14}\text{C}$ -leucyny do mitochondriów wątroby szczura *in vivo* było o 25% niższe niż do frakcji mikrosomowej. Potwierdzili to Simpson i wsp. (143), którzy zaobserwowali jednak, że mitochondria mięśni szczura *in vivo* włączały  $^{14}\text{C}$ -leucynę i fenyloalaninę niewiele słabiej niż mikrosomy. Autorzy ci podkreślili jednak możliwość niewielkich zanieczyszczeń mikrosomami. McLean i Simpson (97) donieśli, że wbudowywanie aminokwasów do izolowanych mitochondriów jest niewrażliwe na działanie RN-azy. Pracę Simpsona i wsp. (144) o włączaniu *in vitro* leucyny do białek mitochondriów z mięśni można uważać za początek właściwych badań nad biosyntezą białka w tych organellach. W badanym układzie włączanie  $^{14}\text{C}$  leucyny do mitochondriów osiągało 20% wartości dla frakcji mikrosomowej. Inkubacja nieznakowanych mitochondriów z mikrosomami znakowanymi uprzednio  $^{14}\text{C}$  aminokwasami nie prowadziła do pojawienia się piętna w mitochondriach, co wskazywało, że znakowane białka, zsyntetyzowane na podłożu rybosomów nie są przenoszone do mitochondriów. Jest to sprzeczne z poglądami Penna (111, 112) o katabolizowaniu przez mitochondria egzogennej albuminy surowicy bez udziału frakcji mikrosomów, przy czym powstające aktywne pośredniki (peptydy?) mogą być używane do syntezy białka w mitochondriach. Jak wiadomo jednak (37) katepsyna, powodująca rozkład białek, występuje nie w mitochondriach, lecz w lizosomach, które zapewne znajdowały się we frakcji mitochondrialnej badanej przez Penna (112). Simpson i wsp. (144) zaobser-



wowali ponadto, że rybonukleaza, która całkowicie hamuje włączanie aminokwasów do białka mikrosomów, w mitochondriach nie tylko nie hamuje, lecz nawet stymuluje ten proces. W roku 1958 Frazer i Gutfreund (48) stwierdzili, że szybkość włączania aminokwasów do frakcji mitochondrialnej i mikrosomowej gruczołu mlecznego była jednakowa.

Wyniki badań nad mitochondriami zależą w dużej mierze od doboru materiału. Na przykład w wątrobie szczura włączanie aminokwasów do białka w mikrosomach, determinowane przez DNA chromosomów, dominuje, nad układem mitochondrialnym. Dogodniejsze są mięśnie, gdzie siateczka endoplazmatyczna nie jest tak rozbudowana, a ilość RNA i aktywność enzymów utleniających są w przeliczeniu na białko sarkosomów większe niż w wątrobie (65).

Prace nad włączaniem aminokwasów *in vitro* do mitochondriów zwierzęcych kontynuowali Truman i Korner (79, 162, 163, 164, 165, 166), zespół z laboratorium Mill Hill w Anglii (2, 123, 124, 125, 126, 127), Reis i wsp. (118, 119) Suttie (156), a później Freeman i Tata (49, 50, 128), zespół Simpsona (7, 8, 9, 31, 71, 72, 73, 74, 98, 145), Greengard i Campbell (53, 54, 55), Rendi (120, 121), Feigelson (46), a ostatnio, bardzo aktywnie, badacz holenderski Kroon (80, 81, 82, 83, 84, 85).

Wbudowywanie aminokwasów do mitochondriów roślin wyższych stwierdził w roku 1954 Webster (168), ale właściwe badania zapoczątkowali w 1961 roku Das i Roy (33), wykazując, że mitochondria siewek grochu aktywniej niż mikrosomy włączają kwas glutaminowy. Zagadnienia te badano u roślin (110, 149), pierwotniaków (93) oraz drożdży (29, 58). Obecnie wybijają się na plan pierwszy prace grupy Roodyna oraz Kroona nad mitochondriami komórek zwierzęcych oraz badaczy hinduskich (Chatterjee, Das i Roy (25, 33, 34, 35)) nad mitochondriami roślin. Badania nad problemem rybosomów mitochondrialnych prowadzą ośrodek Rabinowitza w USA (115) oraz radziecki badacz Elaev (41, 42), który wstępne prace z tej dziedziny wykonał w laboratorium Sorma w Pradze.

Wykazano, że włączanie aminokwasów zachodzi istotnie w mitochondriach, a nie w zanieczyszczających je mikrosomach (98, 118, 124, 163), że wbudowywane aminokwasy tworzą wiązania peptydowe (98, 124, 126) oraz że proces wbudowywania w mitochondria w odróżnieniu od mikrosomów (146) nie wymaga sRNA, ani frakcji enzymów pH 5 z supernatantu cytoplazmatycznego i nie jest hamowany przez RN-azę. Dalsze badania podkreślały rolę mitochondrialnego RNA w tym procesie, a Rendi (120) po wykryciu mitochondrialnych fragmentów, bogatych w RNA, wręcz nazwał je rybosomami mitochondrialnymi.

Pewne załamanie się tych poglądów, co podkreślił Roodyn (129) na sympozjum w Bari nastąpiło w związku z zagadnieniem roli tej syntezy w komórce. Po doniesieniach (7, 8, 9) o włączaniu znakowanych amino-

kwasów do charakterystycznego białka łańcucha oddechowego — cytochromu c, nastąpiły dalsze wykazujące, że ani cytochrom c (126, 145), ani dehydrogenaza jabłczanowa i katalaza (126) nie ulegają znakowaniu. Powstało więc pytanie, jakie znaczenie może mieć biosynteza białka w mitochondriach zwłaszcza, gdy R o o d y n (124, 126) stwierdził, że aminokwasy wbudowywane są przede wszystkim do nierozpuszczalnych lipoproteidów błon mitochondrialnych. Powszechność zjawiska wbudowywania aminokwasów do mitochondriów zwierzęcych i roślinnych (128) nie ulega jednak wątpliwości.

Ostatnio bada się biosyntezę białka w mitochondriach z punktu widzenia: 1) wpływu fosforylacji oksydacyjnej, 2) udziału mitochondrialnych RNA, 3) wpływu substratów utleniających się, 4) wpływu hormonów tarczycy i przysadki, 5) odrębności i mechanizmu działania tej syntezy oraz 6) jej lokalizacji we frakcjach submitochondrialnych.

Wyjaśnienia wymaga też sprawa, czy biosynteza białka w mitochondriach nie jest wynikiem zanieczyszczeń bakteriami z zewnątrz lub wewnątrz tych organelli, na co zwrócili uwagę badacze szwedzcy (137, 175), którzy wręcz negują istnienie syntezy białka w sterylnie otrzymanych mitochondriach i podkreślają podobieństwo między syntezą białka w mitochondriach i rybosomach bakteryjnych (wpływ chloramfenikolu).

Schemat mechanizmu syntezy białka w mitochondriach nie jest znany, toteż można jedynie opisywać go na podstawie wpływu różnych czynników na proces syntezy.

**Nukleazy.** RN-azy i DN-azy nie wpływają, lub nawet słabo stymulują biosyntezę białka w mitochondriach (34, 54, 73, 125, 144, 145, 164). T r u m a n i K o r n e r (163) donoszą o znacznej stymulacji wbudowywania aminokwasów w mitochondriach wątroby szczura przez preinkubowanie z RN-azą. Inni autorzy obserwowali niewielką stymulację (54, 98), przy czym jeśli mitochondria inkubowano bez soku komórkowego RN-aza stymulowała, natomiast z jego dodatkiem — hamowała wbudowywanie aminokwasów (54). R o o d y n i wsp. (124) nie zauważyli wpływu RN-azy na ten proces mimo, iż degradowała ona część mitochondrialnego RNA. W ocenie wpływu rybonukleazy na biosyntezę białka we fragmentach mitochondrialnych obserwujemy pewne rozbieżności. K r o o n nie zaobserwował wpływu RN-azy (nawet w dość dużym stężeniu) na wbudowywanie aminokwasów do białka przez fragmenty uzyskane z mitochondriów przez działanie digitoniną (85) lub ultradźwiękami (81). Natomiast R e n d i (120) doniósł o hamowaniu przez RN-azę tego procesu w cząstkach submitochondrialnych uzyskanych przez działanie lubrolu i dezoksycholenu. Podobne działanie zaobserwowali K a l f i S i m p s o n (71) dla rozpuszczalnego układu z mitochondriów serca wołu. DN-aza nie wpływa na biosyntezę białka w mitochondriach (73, 85).

**Antybiotyki.** Aktynomycyna D hamuje włączanie aminokwasów do białka mitochondrialnego *in vitro*. K r o n (80, 85) doniósł, że nawet

w stężeniu 80  $\mu\text{g}$  na ml hamuje ona najwyżej w 50% ten proces mitochondriach serca wołu i wątroby szczura i ich fragmentach uzyskanych przez działanie digitoniną. Kalf (74) natomiast stwierdził przy takim stężeniu zahamowanie 25% włączania (fenyloalaniny), a przy stężeniu 150  $\mu\text{g}$  na ml — 80% (proliny i leucyny). Włączanie aminokwasów do sarkosomów muchy domowej jest hamowane w 50% przez dużo mniejsze stężenia (10  $\mu\text{g}$  na ml) aktynomycyny D, która hamuje również biosyntezę białka w mitochondriach tarczycy owcy (147) i roślin (25, 35).

Chloramfenikol całkowicie hamuje wbudowywanie aminokwasów do białka nietkniętych mitochondriów zwierzęcych i ich fragmentów (73, 81, 83, 85, 120), a także do mitochondriów roślin (34, 35) i pierwotniaków (93). Jednakże Truman i Korner (163) podali że chloramfenikol w stężeniu 18  $\mu\text{g}$  na ml nie hamuje tego procesu w mitochondriach wątroby szczura, co uznali za dowód, że włączania aminokwasów nie powodują bakterie, ponieważ synteza białka w rybosomach bakteryjnych jest wrażliwa na chloramfenikol. Mager (93) stwierdził u *Tetrahymena pyriformis*, że w obecności chloramfenikolu leucyna jest wbudowywana do związków, które ekstrahują się kwasem trójchlorooctowym na gorąco (wg Schneidera). Być może w mitochondriach pierwotniaków antybiotyk ten nie hamuje *in vitro* biosyntezy białek zasadowych towarzyszących frakcji kwasów nukleinowych. Chlorotetracyklina daje ten sam efekt co chloramfenikol (93).

Puromycyna w stężeniu 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hamuje o około 50% wbudowywanie aminokwasów do nietkniętych mitochondriów (82) z serca wołu i wątroby szczura i do fragmentów submitochondrialnych uzyskanych działaniem digitoniny (85). Natomiast w komórkach roślinnych puromycyna nie ma żadnego wpływu, nawet w pięciokrotnie wyższym stężeniu (25).

Penicylina nie ma żadnego wpływu na wbudowywanie aminokwasów do białek mitochondrialnych (35, 73, 83, 124, 163).

Streptomycyna nie ma żadnego wpływu na biosyntezę białek w mitochondriach zwierzęcych *in vitro* (73, 124). Natomiast w mitochondriach grochu siarczan streptomycyny znacznie hamuje wbudowywanie aminokwasów do białka, a także łączenie się aminokwasów z mitochondrialnym RNA, z którym tworzy kompleks (34).

Mitomycyna C hamuje o prawie 80% wbudowywanie aminokwasów do białka mitochondriów roślinnych (25). Warto też dodać, że akryflawina, która jak wykazał Neubert i wsp. (105) jest inhibitorem mitochondrialnej polimerazy RNA zależnej od DNA, a jednocześnie silnie hamuje adaptację anaerobowych drożdży do warunków tlenowych, hamuje też w tych komórkach *in vivo* biosyntezę cytochromów *a* i *b*, nie wpływa natomiast na biosyntezę cytochromu *c* (159).

*Składniki środowiska potrzebne dla syntezy białka mitochondrialnego in vitro.* Rodyn (127, 129) za niezbędne uważa jedynie fosforan, jony

$Mg^{2+}$  i AMP, przy czym wpływ tych czynników ma swoje optimum przy odpowiednim ich stężeniu. Zaobserwował on brak wpływu merkaptoetanolu, albuminy surowicy wołu, cytochromu c oraz nukleozydotrójfosforanów, bardzo niewielki wpływ amidu kwasu nikotynowego (124) oraz stymulujące działanie EDTA, które jest mało powtarzalne. Nie stwierdził również konieczności dodawania NAD prawdopodobnie z uwagi na obecność endogennego NAD (127).

Według Kroona (82) pominięcie jonów  $Mg^{2+}$ , KCl lub kompletu aminokwasów obniża wbudowywanie  $^{14}C$  leucyny o 40 do 50%, brak fosforanu wywołuje obniżenie tylko o około 10%, a brak ADP nie ma wpływu.

Kalf (37) stwierdził dla sarkosomów szczura, że pominięcie kompletu L-aminokwasów hamuje wbudowywanie w 20%, natomiast jony  $Ca^{2+}$  — prawie w 60%, brak NAD praktycznie nie ma wpływu. ADP w obecności  $\alpha$ -ketoglutaranu jako źródła energii może być zastąpiony przez AMP, ale nie przez ATP. Truman i Korner (163) potwierdzili hamujące działanie jonów  $Ca^{2+}$  i zauważyli, że warunkiem maksymalnego włączania aminokwasów jest 9-krotnie wyższe stężenie jonów  $K^+$  niż jonów  $Na^+$ , że ze wszystkich nukleotydów adeninowych największą stymulację przy optymalnym stężeniu jonów  $Mg^{2+}$  wywołuje AMP, a jony  $Mg^{2+}$  działają hamująco w obecności ATP, a stymulująco w obecności AMP. Kroon (85) zaobserwował, że dodatek UTP, GTP i CTP nie wpływa na wbudowywanie aminokwasów do mitochondriów serca wołu i wątroby szczura, natomiast w sarkosomach muchy domowej ma on niewielkie, ale powtarzalne działanie stymulujące. Mager (93) u *Tetrahymena pyriformis* stwierdził zahamowanie o około 75% przy pominięciu wszystkich czterech nukleozydotrójfosforanów, a Truman i wsp. (164) w mitochondriach zwierzęcych — działanie stymulujące GTP i brak wpływu CTP i UTP.

Pobudzający wpływ albuminy surowiczej jest największy (do 80% stymulacji), jeśli bada się świeże mitochondria, dla mitochondriów preinkubowanych w 37°C przez 30 minut jest on daleko mniejszy, a nie obserwuje się go wcale dla mitochondriów przechowywanych w 0°C (163).

Nieco inaczej zachowują się mitochondria z siewek grochu. Usunięcie jonów  $Mg^{2+}$  lub ATP nie ma żadnego wpływu, podczas gdy usunięcie kompletu aminokwasów wywołuje nawet stymulację o 25%. Jeżeli mitochondria uprzednio dializowano, wówczas usunięcie kompletu aminokwasów, ATP i jonów  $Mg^{2+}$  hamuje biosyntezę białka o 12—30%. Optymalny układ stosowany przez tych badaczy odznacza się wysokim stężeniem sacharozy (0,4M) a także białka mitochondrialnego (do 16 mg białka/ml).

Ogólne warunki biosyntezy *in vitro* zwłaszcza temperatura, pH i stężenie białka mitochondrialnego w większości prac było podobne, stosowano natomiast dość różne czasy inkubacji i stężenia aminokwasów. Według Roodyna (127) na szybkość biosyntezy białka *in vitro* mają

wpływ nawet takie czynniki jak kształt naczyń (127), wysokość słupa cieczy w naczyniu oraz szybkość przepuszczania tlenu. Najlepsze rezultaty osiąga się w naczyniach płaskodennych, kiedy wysokość słupa cieczy nie przekracza 3 mm. R o o d y n (129) podaje, że optymalne  $pH$  wynosi 7,2, ale różnica  $pH$  o 0,2 a nawet o 0,4 nie wywiera prawie żadnego wpływu. Inni autorzy stosowali jako optymalne  $pH$  7,4 (73, 74, 82, 83, 84, 93, 163)  $pH$  7,0 (34, 81) lub  $pH$  7,8 (53). Temperatura w większości przypadków wynosiła 37°C. Jednakże R o o d y n (129) utrzymuje, że optymalna temperatura wynosi 30°C i dodaje, że nawet w 15°C mitochondria zachowują 75—85% aktywności. Zwiększenie stężenia białka mitochondrialnego obniża włączanie aminokwasów (73). Większość autorów uważa za optymalne stężenie 4—6 mg białka na 1 ml., jednakże D a s i wsp. (35) stosują 16 mg na ml.

Do białka mitochondriów wybudowywane są jedynie L-aminokwasy, natomiast D-aminokwasy hamują włączanie L-aminokwasów. Zwrócili na to uwagę D a s i wsp. (34) w doświadczeniach z kwasem glutaminowym. Stosunki ilościowe dodawanych aminokwasów różnie wpływają na wbudowywanie poszczególnych aminokwasów. Jeżeli zwiększy się ilość dodawanej waliny, ale ogólna ilość dodawanych aminokwasów pozostanie bez zmian, to jej włączanie nie zmienia się. Gdy natomiast zwiększy się ogólna ilość aminokwasów w mieszaninie — przy stałej ilości waliny — wówczas szybkość jej wbudowywania wzrasta. Dla leucyny natomiast obserwuje się wzrost wbudowywania wraz ze wzrostem jej ilości mimo stałej ogólnej ilości dodawanych aminokwasów (129). Tego rodzaju obserwacje skierowały uwagę na endogenną pulę aminokwasów w mitochondriach. Według badań D a s a i wsp. (35) zawierają one znaczne ilości wolnych aminokwasów, na przykład w mitochondriach siewek grochu znaleziono: kwasu glutaminowego — 30,1, argininy — 15,3, alaniny — 15,7 tryptofanu — 1,5 i metioniny — 1,0  $\mu M$ /mg białka.

Charakterystyczną dla układu biosyntetyzującego białka w mitochondriach *in vitro* jest jego trwałość i możliwość działania przez dłuższy okres czasu w porównaniu z układem mikrosomowym. Według T r u m a n a i K o r n e r a (163) wbudowywanie  $^{14}C$  leucyny zwiększa się przez 1,5 godziny, po czym szybkość procesu ustala się. D a s (33) obserwował liniowość do 5 godzin, a nawet dłużej. K r o o n (85) stwierdził liniowy wzrost włączania przez 3 godziny zarówno dla nietkniętych mitochondriów wątroby szczura i serca wołu, jak i dla fragmentów uzyskanych działaniem digitoniny. B a t e s i S i m p s o n (7) otrzymywali liniowy wzrost włączania  $^{14}C$  waliny do sarkosomów wołu aż przez 12 godzin. R o o d y n i wsp. (123) stwierdzili, że po jednogodzinnej inkubacji pożądana jest zmiana środowiska i wówczas można zachować liniowy przebieg włączania w czasie przez 4 godziny.

Wbudowywanie aminokwasów do mitochondriów jest sprzężone z oksydacyjną fosforylacją, która w miarę upływu czasu staje się *in vitro*

coraz mniej intensywna, zatem im dłużej trwa preinkubacja mitochondriów z bursztynianem, jako „źródłem” energii, tym mniejsze jest potem wbudowywanie aminokwasów (127).

Według R o o d y n a (127) homogenizacja mitochondriów w homogenizatorze nożowym, lub przez kilkakrotne zamrażanie i rozmrażanie, a także inkubacja mitochondriów z niejonowym detergentem *Triton X-100* prawie całkowicie hamują biosyntezę białka. T r u m a n i K o r n e r (163) natomiast donoszą, że silna homogenizacja nie ma żadnego wpływu na wbudowywanie aminokwasów. Wielokrotne przemywanie mitochondriów nie wpływa na poziom włączania aminokwasów, a nawet nieco go podwyższa (35, 163). Dializa mitochondriów także lekko wzmacnia ten proces (35). Przechowywanie mitochondriów przez 24 godziny w 0° nie powoduje żadnej straty aktywności włączania aminokwasów (129).

Badając zakres sił odśrodkowych, przy których opadają cząstki mitochondrialne aktywne w procesie biosyntezy białka, R o o d y n (127) zaobserwował, że 50% aktywności przechodzi do osadu po 10 min. wirowania przy 4 000 g. Największą aktywność mają cząstki opadające w ciągu 10 min. przy 3 000 g, pewną aktywność mają też cząstki lżejsze (do 20 000 g (35)). R o o d y n (127) nie stwierdził różnic w aktywności mitochondriów wątroby w zależności od płci zwierząt. Wydaje się, że aktywność mitochondriów zwierząt głodzonych przez 24 godziny jest mniejsza, ale wyniki te nie były powtarzalne. Zdolność włączania aminokwasów w mitochondriach noworodków szczurzych była dwa razy większa niż u dorosłych zwierząt, jednakże od 6 tygodni do jednego roku życia wiek zwierzęcia nie ma już żadnego wpływu. Szybkość wbudowywania aminokwasów w mitochondria wątroby była u kijanki prawie cztery razy wyższa niż u żaby.

*Środki hamujące oddychanie i rozkojarzające fosforylację* wpływają wybitnie hamująco na włączanie aminokwasów do mitochondrialnego białka. Stwierdzają to wszyscy badacze tego zagadnienia poczynając od S i m p s o n a i wsp.(144). Wymienić tu należy KCN, CO, azydek sodu, a ze środków rozkojarzających utlenianie substratów od fosforylacji — dwunitrofenol, oligomycynę, arsenin sodu, a także antymycynę, rotenon i dwukumarol. W atmosferze azotu, czy też azotu z dwutlenkiem węgla, włączanie jest również prawie całkowicie zahamowane. Fakty te wskazują na ścisły związek syntezy białka w mitochondriach z utlenianiem i fosforylacją ADP. Znikomą zdolność hamowania ma oligomycyna, która jest silnym inhibitorem ATP-azy indukowanej przez dwunitrofenol. Oligomycyna nie ma jednak żadnego wpływu na hamowanie wywoływane przez 2,4-dwunitrofenol, co wskazuje, że nie polega ono na indukowaniu aktywności ATP-azowej.

Środowiska stosowane w doświadczeniach nad biosyntezą białka w mitochondriach można podzielić w zależności od użytego źródła energii na dwa rodzaje. Jedne z nich zawierają jeden z substratów utleniania tkankowego

na przykład bursztynian, niezależnie od tego, czy jednocześnie stosuje się ATP i układ regenerujący ATP, czy też nie. W środowiskach drugiego rodzaju jedynym źródłem energii jest endogeny ATP w obecności układu regenerującego; środowiska te stosowano w warunkach beztlenowych (53, 54, 55) i tlenowych (93), przy czym w tych ostatnich usunięcie układu regenerującego ATP zmniejszało włączanie aminokwasów o 90%.

Wszelkie układy wbudowujące aminokwasy bez dodania substratu utleniania tkankowego są mało wydajne, a jednocześnie znacznie mniej trwałe, na przykład w obecności fosfokreatyny i kreatynofosfokinazy oraz ATP bez dodatku bursztynianu stwierdzono bardzo niewielkie włączanie aminokwasów, zachowujące przebieg liniowy tylko przez 15 minut (163). Jako źródło energii dla procesu wbudowywania aminokwasów może służyć zarówno bursztynian jak i glutaminian (73, 163), który jest jednak mniej wydajny; według Trumana i Kornera (163) układ utleniania glutaminianu jest bardziej podatny na zniszczenie podczas otrzymywania mitochondriów. Zredukowany NAD jest również mało wydajnym źródłem energii dla tego procesu (73).

Rolę oksydacyjnej fosforylacji dla wbudowywania aminokwasów w mitochondriach *in vitro* podkreślali liczni autorzy (20, 38, 73, 85, 118). Kroon (85) stwierdził, że warunki optymalne dla przebiegu procesu oksydacyjnej fosforylacji nie są niezbędne dla optymalnego wbudowywania aminokwasów. Dodanie dawców elektronów na przykład  $\alpha$ -ketoglutaranu,  $\beta$ -hydroksymaślanu, glutaminianu, pirogronianu z jabłczanem, bursztynianu oraz izocytrynianu hamuje włączanie aminokwasów o 30—65%, mimo że ilość ATP jaka powstaje podczas inkubacji z tymi substratami jest znaczna. Kroon (85) uważa, że energia dostarczana jest częściowo przez ATP, a w głównej mierze — przez wysokoenergetyczne pośredniki. Sugeruje on, że synteza białka przebiega najlepiej w warunkach optymalnych dla odwrócenia łańcucha utleniania tkankowego, bowiem dodanie amoniaku (szczególnie w mitochondriach wątroby szczura) znosi zahamowania wywołane przez  $\alpha$ -ketoglutaran, co pozwala przypuszczać, że bardzo aktywna w mitochondriach dehydrogenaza glutaminianowa katalizuje przebiegający ze zużyciem energii proces redukcyjnej aminacji ketoglutaranu do glutaminianu. Jednakże biosynteza białka w mitochondriach nie wymaga prawdopodobnie tak dużych ilości energii, aby mogło to doprowadzić do odwrócenia łańcucha utleniania tkankowego. Prawdopodobnie jest ono wywołane innymi przyczynami, a tylko wtórnie sprzyja biosyntezie białka. Kroon (85) doszedł do wniosku, że dla włączania aminokwasów optymalne są warunki, w których stosunek stężeń NADP do NADPH jest wysoki. Zdaniem Bronka (20) ATP wogóle nie jest potrzebny do przebiegu biosyntezy białka, a dawcą energii są jedynie wysokoenergetyczne pośredniki tlenowej fosforylacji.

Wbrew wynikom Kroona (85) oraz Trumana i Löw (165), a częściowo zgodnie z danymi innych autorów (73, 144, 168) Roodyn

(127) uważa, że obecność utlenionego substratu jest niezbędna, jednakże dla każdego nieomal substratu istnieje optymalne stężenie, po przekroczeniu którego następuje ostry spadek lub prawie płaski przebieg krzywej włączania aminokwasów. Źródłami energii w procesie biosyntezy białka mogą być metabolity cyklu Krebsa, kwasy  $\beta$ -hydroksymasłowy i pirogronowy, glicero-1-fosforan, kwas kapronowy, a nawet same aminokwasy. Największe wbudowywanie aminokwasów obserwował Roodyn w obecności szczawiooctanu i jabłczanu w stężeniu 5—7 mM. Przy stężeniu 10 mM substratu względne szybkości włączania aminokwasów w optymalnych warunkach były następujące: dla bursztynianu 1,0, dla  $\alpha$ -ketoglutaranu 0,99, dla glutaminy 1,21, dla pirogronianu 0,23, seryny 0,44 i dla  $\beta$ -hydroksymaślanu 0,19. A z z o n e (3) podkreśla brak zbieżności między pobudzaniem włączania aminokwasów, a łatwością utleniania substratu w mitochondriach.

*Supernatant cytoplazmatyczny.* Frakcja ta i pochodzące z niej enzymy pH 5, niezbędne do biosyntezy białka w mikrosomach cytoplazmatycznych (a także i w jądrach), nie są potrzebne do syntezy białka w mitochondriach (21, 73, 83, 124, 163). O aktywacji włączania aminokwasów przez sok komórkowy donosili w 1957 r. Simpson i wsp. (144). Ho a g l a n d (63) przypuszczał, że pewną stymulację wywołuje sRNA, który podczas inkubacji mitochondriów z supernatantem cytoplazmatycznym może wnikać do ich wnętrza. Truman i Korner (163) uzyskali pewną stymulację pod wpływem supernatantu komórkowego, otrzymanego przez wirowanie homogenatu przy 105 000 g przez godzinę, jednak przy optymalnym stężeniu jonów, w obecności NAD i amidu kwasu nikotynowego efekt ten zanikał. R o o d y n i wsp. (124) przypuszczają, że stymulację biosyntezy białka wywołują zawarte w soku komórkowym wolne aminokwasy, a nie enzymy pH 5 lub sRNA, bowiem takie same wyniki osiąga się dodając sok cytoplazmatyczny świeży, preinkubowany z RN-azą lub zagotowany, a także otrzymane z niego wolne aminokwasy.

M a g e r (93) stwierdził dla *Tetrahymena pyriformis*, że ominięcie soku komórkowego obniża włączanie aminokwasów do mitochondriów tylko o 15% zaś do mikrosomów aż o 85%. Według badaczy hinduskich (35) dodatek soku komórkowego, frakcji enzymów pH 5, mikrosomów lub mieszaniny mikrosomów i soku komórkowego nie tylko nie pobudza lecz nawet hamuje o blisko 50% włączanie aminokwasów do mitochondriów. G r e e n g a r d (53) stwierdził, że ich włączenie bez dodania soku i po dodaniu zagotowanego soku jest wyższe w mitochondriach niż w mikrosomach (w warunkach beztlenowych, wobec ATP i układu regenerującego). Dodanie soku wzmacnia włączanie w mitochondriach o 120—150%, w mikrosomach zaś — 15-krotnie. Frakcja enzymów pH 5 jest dla mikrosomów tak samo aktywna jak cały sok, natomiast dla mitochondriów stymulacja wynosi jedynie 30—50%. Świadczyło by to,



że dla optymalnego włączania w mitochondriach konieczne są inne składniki soku poza frakcją enzymów pH 5.

*Hormony.* Freeman i wsp. (49) oraz Roodyn i wsp. (128) stwierdzili pobudzanie włączania aminokwasów *in vitro* przez hormon tarczycy podany zwierzęciu *in vivo*. Optymalna stymulacja następowała wcześniej niż wzrost podstawowej przemiany materii. Wzrost włączania  $^{14}\text{C}$  waliny (49) (o przeszło 100%) do mitochondriów był tego samego rzędu co i we frakcji mikrosomowej i występował w tym samym czasie (39 godzin od podania hormonu). Jednakże ilość RNA mikrosomów rosła o około 40%, podczas gdy ilość RNA w mitochondriach nie ulegała zmianom. Kortyzon stymuluje nieznacznie włączanie glicyny do białka mitochondrialnego *in vivo* (podobnie jak do mikrosomów), wywołuje natomiast wzrost włączania prekursorów do RNA w mitochondriach (47). Pewien wpływ wywierał także hormon wzrostu (STH) (79) i hormon luteinizujący (27).

Między mikrosomowym i mitochondrialnym układem wbudowywania aminokwasów *in vitro* występują znaczne różnice:

1) RN-aza, która całkowicie blokuje biosyntezę białka w mikrosomach nie wpływa na przebieg tego procesu w mitochondriach. Za przyczynę tego uważa się fakt, że enzym ten nie jest w stanie wnikać do wnętrza nietkniętych mitochondriów (73, 83, 124), ani też do działających w procesie oksydacyjnej fosforylacji fragmentów submitochondrialnych (85).

2) Aktynomycyna D nie hamuje syntezy białka w mikrosomach *in vitro*, jeżeli środowisko zawiera aktywne polisomy lub jeżeli wprowadzi się sztuczny mRNA, na przykład poli U. Hamowanie (aczkolwiek niecałkowite) biosyntezy mitochondrialnego białka *in vitro* przez ten antybiotyk i przez mitomycynę wskazuje na ścisłą zależność tego procesu od mitochondrialnego DNA, przy czym synteza mRNA na tym DNA jest ciągła, a „obrót” mRNA szybki.

3) Chloramfenikol hamuje biosyntezę białka w mitochondriach, a nie wpływa wcale na ten proces w mikrosomach komórek zwierzęcych. A zatem układ mitochondrialny wykazuje pewne podobieństwo do rybosomów bakteryjnych. Przypuszcza się, że ten antybiotyk uniemożliwia łącznie się mRNA z rybosomami (69). Jeżeli jednak zachodzi ciągła synteza nowego mRNA (indukowana na przykład przez ACTH w komórkach nadnerczy), wówczas chloramfenikol hamuje biosyntezę białka (45). Antybiotyk ten nie działa na rybosomy komórek zwierzęcych już związane z poli U, natomiast hamuje jeśli poli U wprowadza się po dodaniu chloramfenikolu (169). Być może chloramfenikol hamuje te układy biosyntezy białka, które charakteryzują się ciągłym dopływem syntetyzującego się mRNA.

4) Obecność supernatantu cytoplazmatycznego, frakcji enzymów

pH 5, sRNA i GTP niezbędnych do syntezy białka w mikrosomach, nie jest konieczna do biosyntezy białka w mitochondriach. Układ mikrosomów czerpie energię z dodanego ATP i układu regenerującego ATP, natomiast w mitochondriach to źródło energii jest jednym z najuboższych (przy pominięciu substratu utleniania tkankowego).

5) Układ mitochondrialny *in vitro* jest dużo bardziej trwały niż układ zawierający rybosomy cytoplazmatyczne, co pozwala na dłuższe trwające inkubacje. Dlatego według Mattha ei (96) szczególną wagę będą miały dalsze prace porównawcze nad mitochondriami i nad rybosomami pozbawionymi aktywności RN-azowej.

Odnosić należy też różnice między biosyntezą białka w mitochondriach komórek zwierzęcych i roślinnych. Biosynteza białka w tych ostatnich nie jest hamowana (34) przez puromycynę i nie wymaga obecności jonów magnezu, natomiast hamuje ją streptomycyna, podobnie jak biosyntezę białka w rybosomach bakterii i komórek zwierzęcych. Dodanie glukozy i heksokinazy hamuje biosyntezę białka w mikrosomach wskutek zużywania ATP, podczas gdy na mitochondrialny proces wydaje się mieć niewielki wpływ (123). To samo można powiedzieć o wpływie oligomycyny jako czynnika hamującego aktywność ATP-azową (85).

Duże perspektywy mają badania nad rybosomami mitochondrialnymi. Rabinowitz i wsp. (114) stwierdzili niezwykle ważny fakt, że różnice pomiędzy układami biosyntezy białka w mitochondriach i w mikrosomach są znacznie mniejsze, jeżeli porównuje się przebieg tej biosyntezy w rybosomach mitochondrialnych i cytoplazmatycznych. I tak biosynteza białka w rybosomach mitochondrialnych jest wrażliwa na RN-azę, zależy od soku komórkowego i poli U, nie jest hamowana przez chloramfenikol, a  $^{14}\text{C}$ -fenyloalanylo-sRNA jest włączany. Zdaniem Elae va (43) główną różnicą między rybosomami cytoplazmatycznymi a mitochondrialnymi jest brak wpływu jonów  $\text{Mg}^{2+}$  na trwałość tych ostatnich. Autor ten porównał aktywność rybosomów mitochondrialnych, cytoplazmatycznych i jądrowych w obecności supernatantów (105 000 g) i frakcji pH 5 różnych frakcji subkomórkowych i doszedł do wniosku, że rybosomy mitochondrialne są bardziej podobne do jądrowych niż do cytoplazmatycznych.

Obecność enzymów aktywujących aminokwasy stwierdzono w mitochondriach zwierzęcych (34, 36, 31, 119). Craddock i Simpson (31) badając aktywność tych enzymów w mitochondriach wątroby szczura stwierdzili, że leucyna i tryptofan szczególnie aktywnie stymulują wymianę pomiędzy ATP i pirofosforanem i wykazali, że wymiana ta nie jest artefaktem. Das i wsp. (34) potwierdzili te obserwacje w warunkach wykluczających nie tylko udział ATP-azy ale i wychwytywanie podczas oksydacyjnej fosforylacji  $^{32}\text{P}$ -ortofosforanu, który mógł powstać wskutek hydrolizy  $^{32}\text{P}$ -pirofosforanu. Według Kroona (84) który stwierdził podobną wymianę między znakowanym ATP a AMP, ATP nie musi

być, a według Bronka (20) wręcz nie jest źródłem energii dla procesu biosyntezy białka. Czy wobec tego ATP bierze udział w aktywacji aminokwasów? Kroon (84) uważa, że ATP może brać tu udział, gdyż może on powstawać w małych ilościach dzięki działaniu kinazy adenylanu (E.C.2.7.4.3), a także na niewrażliwym na działanie oligomycyny etapie łańcucha utleniania. Wspomnieć tu trzeba jednak, że mogą istnieć enzymy aktywujące aminokwasy, które nie katalizują wymiany ATP-PP (na przykład układ Beljanskiego i Ochoa (11)) z mikrosomów.

Mitochondria dysponują nie tylko znaczną pulą endogennych aminokwasów, ale również enzymami niezbędnymi do ich biosyntezy i przemian. Klingenberg (78) sugeruje, że stężenie aminokwasów dodanych z zewnątrz wpływa na wewnątrzmitochondrialną pulę aminokwasów wskutek przesuwania równowagi niektórych reakcji transaminacji.

Barnabei (5) sugeruje, że pośrednikiem pomiędzy aminokwasami a białkiem w procesie jego biosyntezy nie są połączenia aminoacylo-sRNA, ale tak zwane fosfatydopeptydy, które bardzo aktywnie włączają  $^{14}\text{C}$ -aminokwasy. Jeżeli znakowane fosfatydopeptydy inkubuje się *in vitro* z mitochondriami wątroby szczura, to piętno przechodzi do frakcji białek błon mitochondrialnych. Przypominało to podobny przebieg zjawisk w zdolnej do biosyntezy białek, a bogatej w fosfolipidy frakcji błon bakterii (51, 106), drożdży, i w pewnych tkankach zwierzęcych (59). Sugestie Barnabei nie mają wielu zwolenników, nie można jednak pominąć pewnych danych, które wskazywałyby na możliwość udziału peptydów, jako stadiów pośrednich w biosyntezie białka w mitochondriach. We wczesnych pracach grupy Simpsona podkreślano, że aktywność właściwa  $^{14}\text{C}$ -waliny w różnych miejscach cząsteczki cytochromu c była różna, a w jednym z peptydów uzyskanych przez częściowy rozkład cytochromu c była 10-krotnie większa niż w innych (123). Jest to niezgodne z matrycową teorią syntezy białka, a mogłoby natomiast sugerować udział peptydów jako pośredników. Podobne przesłanki z prac Steinberga i Anfinsena (153) nad biosyntezą owoalbuminy i rybonukleazy oraz Campbella i Worka (23) doprowadziły do wysunięcia takej możliwości. Należy jednak podkreślić, że cytochrom c w normalnych warunkach nie ulega znakowaniu w mitochondriach *in vitro*.

Suttie (156) stwierdził, że jeżeli izolowane, przemyte mitochondria preinkubuje się zmieniając kilkakrotnie podłoże optymalne dla wbudowywania aminokwasów, to wówczas układ staje się niezależny od oksydacyjnej fosforylacji, nie jest hamowany przez puromycynę i chloramfenikol, natomiast silnie hamuje go hydroksyloamina, a znakowaniu ulegają C-końcowe grupy białek mitochondrialnych. Autor przypuszcza, że zachodzi tu transpeptydacja katalizowana przez katepsynę. Enzym ten pochodzi z lizosomów (6), których otoczki w tych warunkach ulegają częściowemu zniszczeniu.

Jednakże inni autorzy (35, 73) wykazali, że włączenie aminokwasów

zachodzi z całą pewnością wewnątrz łańcucha peptydowego, a nie na jego końcach. Stwierdzono (34), że w mitochondriach L-glutaminian i L-glutamina są niezależnie od siebie wbudowywane do białek, a kwas glutaminowy nie jest włączany w formie glutationu wiążącego się z białkiem wiązaniami -S-S. Podobnie  $^{14}\text{C}$ -glicyna nie przechodzi do białek *via* glutation. Wielu autorów stoi na stanowisku, że mechanizm mitochondrialnej syntezy białka (pomijając ciągle powstawanie mRNA) jest zasadniczo podobny do jej przebiegu w rybosomach cytoplazmatycznych. Jednakże tacy znani badacze jak Kroon (84, 85), Roodyn (129) czy Chatterjee (25) nie widzą podstaw aby przyjąć, że w biosyntezie białka w mitochondriach są zaangażowane mitochondrialne rybosomy.

Rola biosyntezy białka w mitochondriach nie jest jasna, zwłaszcza po stwierdzeniu (126, 145), że mitochondrialny cytochrom c, dehydrogenaza jabłczanowa i katalaza nie są *in vitro* znakowane. Z drugiej strony wiadomo, że synteza cytochromu c zwiększa się podczas regeneracji wątroby (39), a wbudowywanie aminokwasów do mitochondriów regenerującej wątroby jest wyższe w porównaniu z wątrobą normalną zarówno *in vitro* (21) jak też *in vivo* (24). Kompromisowym rozwiązaniem problemu biosyntezy cytochromów jest sugestia Nagao i wsp. (100), według której synteza cytochromów a i b zależy od pozajądrowych genów cytoplazmatycznych, a więc od DNA mitochondriów, natomiast cytochrom c jest syntetyzowany w oparciu o informację genetyczną zawartą w jądrowym DNA. Przemawia za tym działanie proflawiny, która hamuje zależną od DNA polimerazę RNA w mitochondriach (105) i biosyntezę cytochromu a i b, a nie wpływa na biosyntezę cytochromu c. Wskazywałoby to, że część mRNA mitochondrialnego syntetyzuje się na matrycy DNA mitochondriów, a część pochodzi z jądra.

Humm i Humm (66) wykazali, że mitochondrialny mRNA hybrydyzuje zarówno z jądrowym jak i z mitochondrialnym DNA, które różnią się między sobą sekwencją zasad, ponieważ hybrydują z sobą w znikomym procencie. Obserwacje Hummów (66) są zgodne z wynikami Nagao (100) i wyjaśniają niepowodzenia prac nad syntezą cytochromu c w izolowanych mitochondriach *in vitro*.

Marsh i Drabkin (94) sugerują, że mitochondria syntetyzują białka wyłącznie na wewnętrzny użytek komórki. U szczurów z eksperymentalną nerczycą wzrostowi biosyntezy białek surowicy krwi towarzyszy wzrost aktywności mikrosomów wątroby, natomiast nie zmienia się aktywność biosyntezy białek mitochondrialnych tej tkanki. Roodyn (129) opierając się na tym, że najaktywniej włącza aminokwasy bogata w lipidy frakcja błon mitochondrialnych sugeruje, że biosynteza białka jest niezbędna do odtworzenia łańcucha oddechowego. Przypuszcza on, że biosynteza białka błon prowadzi do przekształcania się promitochondriów w mitochondria funkcjonalne. Błony promitochondrialne tworzyłyby się przez podział elementów macierzystych. O powstawaniu mito-

chondriów poprzez podział już istniejących organelli świadczą prace L u c k a (90, 91). Obok tej istnieją oczywiście i inne teorie powstawania mitochondriów (10, 64, 107).

Badania S t r a u b a i wsp. (154, 155) nad biosyntezą amylazy zwracają uwagę na ważną rolę mitochondrialnego RNA w tym procesie. Początkowo powstaje (prawdopodobnie w rybosomach) nieczynny prekursor amylazy, który przechodzi w czynny enzym po inkubacji ze specyficznym RNA. Ten RNA powstaje jedynie z mitochondrialnego RNA w obecności ATP, argininy i treoniny. Chloramfenikol nie wpływa na proces modyfikacji mitochondrialnego RNA, hamuje natomiast etap aktywacji prekursora.

Mówiąc o roli mitochondrialnej syntezy białka wspomnieć trzeba też prace R z e c z y c k i e g o i wsp. (133) świadczące, iż zasadowe białko mitochondriów może wykazywać, słabe wprawdzie, działanie depolimeryzacyjne na RNA. Może to być jednak zjawisko niespecyficzne, wspólne dla wielu zasadowych białek (133).

Interesujące są obserwacje G r a f f i e g o i wsp. (52), że wbudowywanie argininy (a szczególnie stosunek włączanych  $^{14}\text{C}$  argininy do  $^{14}\text{C}$  leucyny) do mitochondriów jest wyższe w nowotworach samoistnych i przeszczepialnych, niż w tkankach zdrowych nie wyłączając tkanek embrionalnych lub regenerujących. Jest to jedna z niewielu cech odróżniających przemiany tkanek nowotworowych od normalnych tkanek szybko rosnących. Zwiększone włączanie argininy nie jest wyrazem wzmożonej syntezy białek zasadowych typu histonów, ale zmian w sprzężeniu cyklu ornitynowego z biosyntezą kwasów nukleinowych.

W rozważaniach nad biosyntezą białka w mitochondriach nie można pominąć stanowiska jakie badacze szwedzcy Von der D e c k e n, L ö w i S a n d e l l zajęli na sympozjum w Bari (1965 r.). Przedstawili oni dane świadczące, że mitochondria pozbawione zanieczyszczeń bakteryjnych nie wbudowują w ogóle  $^{14}\text{C}$  leucyny do białka i wypowiedzieli pogląd, że obecność bakterii jest zapewne przyczyną obserwowanego przez innych badaczy włączania aminokwasów w mitochondria *in vitro*. Wywołało to burzliwą dyskusję, w której oponentami byli głównie Roodyn oraz Kroon. Przytaczano następujące kontrargumenty:

- 1) brak jakiegokolwiek zależności włączania aminokwasów od ilości bakterii (między innymi przy ilościach bakterii różniących się tysiąc-krotnie obserwowano takie samo włączanie; zresztą według danych badaczy szwedzkich przy tysiąc-krotnie większej ilości bakterii włączanie było tylko 16 razy większe).

- 2) Prawie całkowite hamowanie włączania w mitochondria przez dwunitrofenol, przy czym układ ten nie może wykorzystywać glukozy jako źródła energii, a dla osiągnięcia maksymalnego włączania wymaga dodatku jonów magnezu, fosforanów i AMP, zachowuje się zatem inaczej niż bakterie.

3) Hamowanie włączania przez łagodną homogenizację mitochondriów wobec detergentu *Triton X-100*; przypuszczenie, że w tych warunkach bakterie mogą również ulec rozbiciu jest nieprawdopodobne.

4) Brak nagłego wzrostu aktywności związanego z logarytmiczną fazą podziału bakterii w czasie procesu włączania aminokwasów.

5) Znaczny wpływ hormonów tarczycy na włączanie aminokwasów do mitochondriów *in vivo*. Przypuszczenie, że synteza białka w komórkach bakteryjnych zależy od stanu fizjologicznego gruczołów żywego zwierzęcia jest nieprawdopodobne.

Mimo to badacze szwedzcy zachowali swój pogląd i podczas III Zjazdu FEBS w Warszawie podali, że w sterylnie wyizolowanych mitochondriach wątroby szczura nie przebiega zupełnie włączanie aminokwasów, a dodanie mitochondriów do bakterii (zidentyfikowanych w niesterylnych mitochondriach) znacznie podwyższa włączanie aminokwasów do białka bakterii.

#### LITERATURA

1. Appleby C. A., *Biochem. J.* **73**, 539, (1959).
2. Appleby C. A., Morton R. K., *Biochem. J.* **75**, 258 (1960).
3. Azzone G. F., Proc. Symp. on the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, Bari, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam (1965) (głos w dyskusji).
4. Baranowicz J., Gross M., Turski W., (1966), przygotowane do druku.
5. Barnabei O., Proceedings of the Symposium on the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, Bari, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1965, (głos w dyskusji).
6. Bass R., Neubert D., III FEBS-Meeting, Warsaw 1966, Abst. M-90.
7. Bates H. M., Simpson M. V., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 597 (1959).
8. Bates H. M., Craddock V. M., Simpson M. V., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1600 (1960).
9. Bates H. M., Craddock V. M., Simpson M. V., *J. Biol. Chem.* **235**, 140 (1960).
10. Beale G. H., *Proc. Roy. Soc.* **164**, 212 (1966).
11. Beljanski M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **44**, 498 (1958).
12. Birbeck M. S. C., Reid E., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 609, (1956).
13. Brand L., Mahler H. R., *J. Biol. Chem.* **234**, 1615 (1959).
14. Borkowski T., Harth S., Mardell R., Mandel P., *Nature* **192**, 4801 (1961).
15. Borkowski T., Monografie Biochemiczne P. T. Bioch. (1962).
16. Borst P., Proc. Symp. on the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, Bari, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1965, str. 450
17. Borst P., Kroon A. M., Ruttenberg G. J. C. M., III FEBS-Meeting Warsaw 1966, Symp. The Properties and Function of genetic Elements Symp. Contribution.
18. Borst P., Ruttenberg C. J. C. M., III FEBS-Meeting Warsaw 1966, str. G-100.
19. Borst P., Ruttenberg G. J. C. M., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 647 (1966).
20. Bronk J. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **50**, 524 (1963).

21. Braun G. M., Marsh J. B., Drabkin D. L., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 645 (1963).
22. Butler J. A., Crathorn A. R., Hunter G. P., *Biochem. J.* **69**, 544 (1958).
23. Campbell P. N., Work T. S., *Biochem. J.* **52**, 217 (1952).
24. Campbell P. N., Greengard O., Kernot B. A., *Biochem. J.* **74**, 107 (1960).
25. Chatterjee S. K., Das H. K., Roy S. C., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 349 (1966).
26. Chevremont M., w Cell Growth and Cell Division, red. R. J. C. Harris, New York 1963, str. 323.
27. Civen M., Brown C. B., Hilliard J., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 127 (1966).
28. Claude A., *J. Exptl Med.* **84**, 51 (1946).
29. Cooper A. H., Harris G., Neal G. E., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 573 (1962).
30. Corneo G., Moore C., Sanadi D. R., Grossman L. I., Marmur J., *Science* **151**, 687 (1966).
31. Craddock V. M., Simpson M. V., *Biochem. J.* **74**, 10P (1960).
32. Crosbie G. W., Smellie R. M. S., Davidson J. N., *Biochem. J.* **54**, 287 (1953).
33. Das H. K., Roy S. C., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 445 (1961).
34. Das H., Chatterjee S. K., Roy S. C., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 478 (1964).
35. Das H. K., Chatterjee S. K., Roy S. C., *J. Biol. Chem.* **231**, 1126 (1964).
36. Davis J. C. W., Novelli G. D., *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 299 (1958).
37. De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmans F., *Biochem. J.* **60**, 604 (1955).
38. De Duve C., Beaufay A., Jacques P., Rahman-Li Y., Sellinger O. Z., Wattiaux R., De Coninck S., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 187 (1960).
39. Drabkin D. L., *J. Nat. Cancer Inst.* **10**, 1357 (1950).
40. Edelman M., Schiff J. N., Epstein H. T., *J. Mol. Biol.* **11**, 769 (1965).
41. Elaev N. R., *Biochimija* **29**, 413 (1964).
42. Elaev N. R., *Biochimija* **31**, 240 (1966).
43. Elson B., Chargaff E., w Phosphorus Metabolism red. Mc Elroy, Glass, John Hopkins Press, Baltimore 1952, str. 329.
44. Evans E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 678 (1966).
45. Farese R. V., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 699 (1964).
46. Feigelson P., Feigelson M., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 430 (1959).
47. Feigelson M., Gross P. R., Feigelson P., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 495 (1962).
48. Fraser M. J., Gutfreund H., *Proc. Roy. Soc.* **149**, 936 (1958).
49. Freeman K. B., Roodyn D. B., Tata J. R., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 129 (1963).
50. Freeman K. B., *Biochem. J.* **94**, 494 (1965).
- 50a. Giorgiew G. P., Samarina O. P., Lerman M. I., Smirnov M. N., *Nature* **200**, 1291 (1963).
51. Godson G. N., Hunter G. D., *Biochem. J.* **79**, 37P (1961).
52. Graffi A., Butschak X., Schneider X., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 418 (1965).
53. Greengard O., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 207 (1959).
54. Greengard O., Campbell P. N., *Biochem. J.* **72**, 305 (1959).
55. Greengard O., Campbell P. N., *Biochem. J.* **71**, 148 (1959).
56. Hallberg A., Hauge J. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 80 (1965).
57. Harel L., Jacob A., Moulé Y., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **39**, 819 (1957).

58. Hauge J. G., Halvorson H. O., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 201 (1962).
59. Hendler R. W., *J. Biol. Chem.* **234**, 1466 (1959).
60. Hiatt H. H., *J. Mol. Biol.* **5**, 217 (1962).
61. Hogeboom G. H., Schneider W. C., *Science* **113**, 355 (1951).
62. Hogeboom G. H., Schneider W. C., Striebich M. J., *J. Biol. Chem.* **196**, 111 (1952).
63. Hoagland M. B., w *Nucleic Acids*, tom 3, E. Chargaff, J. N. Davidson, Academic Press, New York, London, 1960, str. 395.
64. Horowitz N. H., Metzberg R. L., *Annual Rev. Biochem.* **34**, 558 (1965).
65. Hulsmans H. A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **54**, 1 (1961).
66. Humm D., Humm J. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 118 (1966).
67. Jackson J. F., Kornberg R. D., Berg P., Rajbhandary U. L., Stewart A., Khorana H. G., Kornberg A., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 243 (1965).
68. Yayaraman J., Tewary K. K., Mahler H. R., *Federation Proc.* **24**, 296 (1965).
69. Jardetzky G., Julian G. R., *Nature* **201**, 397 (1964).
70. Junghahn J., Bielka H., III FEBS-Metting, Warsaw 1966, Abstr. G-48.
71. Kalf G. F., Simpson M. V., *J. Biol. Chem.* **234**, 2943 (1959).
72. Kalf G. F., Bates H. M., Simpson M. V., *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 245 (1959).
73. Kalf G. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **101**, 350 (1963).
74. Kalf G. F., *Biochemistry* **3**, 1702 (1964).
75. Keller E. B., Zamecnik P. C., Loffield J., *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 378 (1954).
76. Khesin R. V., *Biochimija* **17**, 664 (1952).
77. Killey R. K., Schneider W. C., *J. Biol. Chem.* **185**, 869 (1950).
78. Klingenberg M., Proceedings of the Symposium on the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, Bari, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1965, (głos w dyskusji).
79. Korner A., *Exptl. Cell. Res.* **18**, 594 (1959).
80. Kroon A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 165 (1963).
81. Kroon A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 184 (1963).
82. Kroon A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 45 (1964).
83. Kroon A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 391 (1963).
84. Kroon A. M., Proceedings of the Symposium on the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, Bari, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1965, str. 397.
85. Kroon A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 275 (1965).
86. Kuff E. L., Schneider W. C., *J. Biol. Chem.* **206**, 677 (1954).
87. Kuff E. L., Dalton A. J., w *Subcellular Particles*, red. T. Hayashi, New York, 1959, str. 114.
88. Leuthardt F., Nelson H., *Helv. Chim. Acta* **34**, 1618 (1951).
89. Lowe C. U., Lehninger A. L., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 89 (1955).
90. Luck D. J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **49**, 233 (1963).
91. Luck D. J. L., *J. Cell. Biol.* **16**, 483 (1963).
92. Luck D. J. L., Reich E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 931 (1964).
93. Mager J., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 150, (1960).
94. Marsh J. B., Drabkin D. L., *J. Biol. Chem.* **224**, 909 (1917).
95. Martin E. M., Morton R. K., *Biochem. J.* **64**, 221 (1956).
96. Matthaei H., III FEBS-Meeting, symp. The Properties and Function of Genetic Elements, Symp. Contribution, Warsaw 1966.
97. Mac Lean J. C., Simpson M. V., *Federation Proc.* **15**, 312 (1956).
98. Mac Lean J. R., Cohn G. L., Brandt J. K., *J. Biol. Chem.* **233**, 657 (1968).



99. Moriber L., *J. Morphol.* **99**, 271 (1956).
100. Nagao M., Sugimura T., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 353 (1965).
101. Nass S., Nass M. M. K., *J. Cel. Biol.* **19**, 613 (1963).
102. Nass S., Nass M. M. K., *J. Nat. Cancer. Inst.* **33**, 777 (1964).
103. Nass S., Nass M. M. K., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 426 (1965).
104. Naubert D., Proc. Symp. Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, Bari (1965), Publ. Elsevier Amsterdam (głos w dyskusji).
105. Neubert D., Helge H., Bass R., III FEBS-Meeting, Warsaw 1966, Abstracts G-27.
106. Nisman B., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 18 (1959).
107. Novikoff A. B., w *The Cell.*, red. J. Brachet, A. E. Mirsky, London, 1961, tom 2, str. 299.
108. Paigen K., *J. Biol. Chem.* **206**, 945 (1954).
109. Parsons J. A., *J. Cell. Biol.* **23**, 70A (1964).
110. Parthier B., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 503 (1963).
111. Penn N. W., *Federation Proc.* **18**, 301 (1959).
112. Penn N. W., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 55 (1960).
113. Pollister A. W., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **69**, 580 (1957).
114. Rabinowitz M., Sinclair J., De Salle L., Haselkorn R., Swift H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1126 (1965).
115. Rabinowitz M., De Salle J., Sinclair R., Stirewalt H., Swift H., *Federation Proc.* **25**, 581 (1966).
116. Ralph R. K., Bellamy A. R., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 9 (1964).
117. Ray D. S., Hanawalt P. C., *J. Mol. Biol.* **9**, 812 (1964).
118. Reis P. J., Coote J. L., Work T. S., *Nature* **184**, 165 (1959).
119. Reis P. J., Coote J. L., Work T. S., *Biochem. J.* **72**, 24P (1959).
120. Rendi R., *Exp. Cel. Res.* **17**, 585 (1959).
121. Rendi R., Warner R. C., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **88**, 741 (1960).
122. Richter G., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 144 (1962).
123. Roodyn D. E., Reis P. J., Work T. S., Proc. Symp. Protein Biosynthesis, Acad. Press, London, 1961, str. 37.
124. Roodyn D. B., Reis P. J., Work T. S., *Biochem. J.* **80**, 9 (1961).
125. Roodyn D. B., *Biochem. J.* **85**, 177 (1962).
126. Roodyn D. B., Suttie J. W., Work T. S., *Biochem. J.* **83**, 29 (1962).
127. Roodyn D. B., *Biochem. J.* **97**, 782 (1965).
128. Roodyn D. B., Freeman K. B., *Biochem. J.* **94**, 628 (1965).
129. Roodyn D. B., Proc. Symp. Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, Bari Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1965, str. 386.
130. Rudkin G. T., Schultz J., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **21**, 303 (1956).
131. Rutman R. J., Cantarow A., Paschkis K. E., *Cancer Res.* **14**, 111 (1954).
132. Rutman R. J., Cantarow A., Paschkis K. F., *Cancer Res.* **14**, 150 (1954).
133. Rzczycki W., III FEBS-Meeting, Warsaw 1966, Abstracts M-88.
134. Sachsenmaier W., *Biochem. Z.* **340**, 541 (1964).
135. Samarina O. P., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 688 (1964).
136. Sampson M., Katoh A., Hotta Y., Stern H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 459 (1963).
137. Sandell S., Löw H., von der Decken A., III FEBS-Meeting, Warsaw 1966, Abstracts M-89.
138. Schatz G., Haslbrunner E., Tuppy H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 127 (1964).
139. Scherrer K., Darnell J. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 486 (1962).

140. Schneider J. H., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 107 (1961).
141. Siekevitz P., *J. Biol. Chem.* **195**, 549 (1952).
142. Siekevitz P., Watson M. L., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 653 (1956).
143. Simpson M. V., McLean J. R., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 573 (1955).
144. Simpson M. V., McLean J. R., Cohn G. L., Brandt J. K., *Federation Proc.* **16**, 249 (1957).
145. Simpson H. V., Skinner D. M., Lucas J. M., *J. Biol. Chem.* **236**, PC 81 (1961).
146. Simpson M. V., *Annual Rev. Biochem.* **31**, 361, (1962).
147. Singh V. N., Raghupathy E., Chaikoff I. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 12 (1964).
148. Sinsheimer R. L., *Federation Proc.* **20**, 661 (1961).
149. Sissakian N. M., Filippowicz I. I., *Biochimija* **22**, 375 (1957).
150. Sissakian N. M., Filippowicz I. I., Sretailo R. N., Aliyer K. A., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 160 (1965).
151. Smellie R. M. S., McIndoe W. M., Logan R., Davidson J. N., Dawson I. M., *Biochem. J.* **54**, 280 (1953).
152. Schmidt G., *Annual Rev. Biochem.* **33**, 690 (1964).
153. Steinberg D., Anfinsen C. B., *J. Biol. Chem.* **199**, 25 (1952).
154. Straub F. B., Ullman A., Venetianer P., Proc. Symp. Protein Biosynthesis (1961), str. 13.
155. Straub F. B., Ullman A., Venetianer P., *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 152 (1960).
156. Suttie J. W., *Biochem. J.* **84**, 382 (1962).
157. Swift H., Kisler N., Bogorad L., *J. Cell. Biol.* **23**, 91A (1964).
158. Symons R. H., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 298 (1965).
159. Szabadasz A. L., *Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.* **114**, 658 (1959).
160. Szarkowski J. W., Gołaszewski T., *Postępy Biochemii* **10**, 491 (1964).
161. Tata J. R., Widnell C. C., *Biochem. J.* **98**, 604 (1966).
162. Truman D. E. S., Korner A., *Biochem. J.* **84**, 40P (1962).
163. Truman D. E. S. Korner A., *Biochem. J.* **83**, 588 (1962).
164. Truman D. E. S. Korner A., *Biochem. J.* **85**, 154 (1962).
165. Truman D. E. S., Low W., *Exptl Cell. Res.* **31**, 230 (1963).
166. Truman D. E. S., *Exptl Cell. Res.* **31**, 313 (1963).
167. Turski W., Gross M., Baranowicz J., III FEBS-Meeting, Warsaw 1966, Abstracts G-87.
168. Webster G. C., *Plant Physiol.* **29**, 202 (1954).
169. Weisberger A. S., Armentrout S., Wolfe S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 86 (1963).
170. Whitcutt J. M., Roth J. S., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 380 (1964).
171. Werkheiser W. C., Bartley W., *Biochem. J.* **66**, 79 (1957).
172. Wintersberger E., *Hoppe-Seyl. Z. Physiol. Chem.* **336**, 285 (1964).
173. Wintersberger E., Tuppy H., *Biochem. Z.* **341**, 399 (1965).
174. Wintersberger E., Proc. Symp. on the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, Bari, Publ. Elsevier, Amsterdam, 1965, str. 439.
175. Von der Decken A., Löw H., Sandell S., Proc. Symp. Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, Bari, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, 1965, str. 415.

ALICJA BARDON\*

## Wewnątrzkomórkowe rybonukleazy zwierzęce i ich naturalny inhibitor

### Intracellular Animal Ribonucleases and Their Natural Inhibitor

The occurrence, properties and distribution of intracellular acid and alkaline ribonucleases as well as of their natural inhibitor are reviewed.

Rybonukleazy katalizują rozbicie wiązania fosfodwuestrowego w RNA, w wyniku czego powstają mono- oraz oligonukleotydy.

Wewnątrzkomórkowymi rybonukleazami nazywamy te, dla których substratem są endogenne (wewnątrzkomórkowe) kwasy rybonukleinowe. W cytoplazmie wielu tkanek zwierzęcych wykazano obecność termolabilnego, niedializującego inhibitora tych rybonukleaz (13, 50, 54, 60). Układ wewnątrzkomórkowych rybonukleaz i ich naturalnego inhibitora może być istotnym mechanizmem regulującym metabolizm kwasów rybonukleinowych w komórce.

W artykule tym zebrano dane o zwierzęcych rybonukleazach wewnątrzkomórkowych i ich naturalnym inhibitorze. Informacje o rybonukleazie trzustkowej działającej pozakomórkowo na RNA, zawiera artykuł Shugara (63), a o rybonukleazach roślinnych — Gołaszewskiego (16), oba ogłoszone w *Postęпах Biochemii*.

### I. Własności wewnątrzkomórkowych rybonukleaz

Badając homogenaty tkanek zwierzęcych stwierdza się dwa optima aktywności rybonukleolitycznej. Jedno z nich leży w zakresie kwaśnym od pH 5,2—5,8, a drugie po stronie zasadowej przy pH 7,8—8,2 (39, 40, 48, 68, 73). Aktywność „kwaśnych” rybonukleaz w wielu tkankach zwierzęcych jest niższa (2 do 4 razy) w porównaniu z aktywnością rybonukleaz „alkalicznych” (11, 66). Obie wewnątrzkomórkowe RN-azy znacznie różnią się od siebie właściwościami fizykochemicznymi i mechanizmem działania na RNA.

\* Dr med. stom., adiunkt Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku.

Oprócz rybonukleaz kwaśnych i alkalicznych niektórzy autorzy znajdują jeszcze rybonukleazy o optimum pH leżącym w pobliżu oddziaływania obojętnego (1, 34).

### 1. Rybonukleazy kwaśne

Są one wrażliwe na temperaturę zarówno w homogenatach tkankowych jak i częściowo oczyszczonych preparatach (38, 40, 73). Ich preparaty ogrzane przez kilka minut w temperaturze  $100^{\circ}$  lub nieco niższej tracą od 70%—85% swojej aktywności (40, 73). Tę właściwość wykorzystuje się dla oddzielenia RN-azy kwaśnej od alkalicznej, która w tych warunkach nie ulega zniszczeniu. Do ekstrakcji kwaśnej RN-azy nie można użyć rozcieńczonych kwasów (jak to ma miejsce dla rybonukleazy trzustkowej), ponieważ traci ona wówczas aktywność. Stosuje się zatem zwykle frakcjonowanie siarczanem amonu (3, 51, 73) oraz chromatografię na celulozach jonowymiennych. Dotychczas zdołano oczyścić ten enzym blisko 60-krotnie, jednak tylko z około 10% wydajnością (3, 40, 73). Mało wiadomo o produktach rozkładu kwasów rybonukleinowych przez tę RN-azę. W wyniku hydrolizy RNA z drożdży przez kwaśną RN-azę ze śledziona i wątroby wołu produktami końcowymi są wyłącznie mononukleotydy purynowe i pirymidynowe zarówno cykliczne jak i nie cykliczne (40). Kwaśna RN-aza z wątroby szczura rozkłada kwas 2',3'-urydylowy, nie udało się jednak stwierdzić, czy powstaje 2'- lub 3'-nukleotyd urydylowy, natomiast kwas 2',3'-adenylowy hydrolizuje do kwasu 2'-adenylowego (73).

Jony  $Mg^{2+}$  w stężeniu  $2 \times 10^{-3}M$  zwiększają aktywność kwaśnej RN-azy o około 25% (11). Heparyna w stężeniu 0,25 mg/ml płynu inkubacyjnego inaktywuje tę rybonukleazę w około 60% (11).

### 2. Rybonukleazy alkaliczne

Najlepiej poznaną z pośród tych enzymów jest rybonukleaza z trzustki wołu. Jest to białko o stosunkowo prostej budowie i masie cząsteczkowej około 13 000. Znana jest jego sekwencja aminokwasów a także centrum aktywne i jego konformacja (9, 23, 29, 67). Enzym ten wydzielany przez trzustkę do przewodu pokarmowego działa pozakomórkowo — na RNA dostarczane w pokarmach.

Wewnątrzkomórkowe rybonukleazy alkaliczne są bardzo zbliżone własnościami do RN-azy trzustkowej. Wszystkie one są stosunkowo odporne na ogrzewanie (40, 53, 73). Ogrzewanie częściowo oczyszczonych preparatów w  $100^{\circ}$  przez 5 minut powoduje spadek aktywności tylko o 10% (40, 73). Rybonukleazy alkaliczne są odporne na działanie rozcieńczonych kwasów na przykład 0,25 N  $H_2SO_4$  (28, 50, 51). Tkankowe

RN-azy alkaliczne ekstrahuje się zwykle rozcieńczonymi roztworami kwasu solnego i siarkowego (2, 17, 37, 45, 51). Dalsze oczyszczanie polega na chromatografii na celulozach jonowymiennych oraz *Sephadexach*, na których uzyskano najbardziej oczyszczone preparaty (2, 17), na przykład oczyszczony około 6 600 razy preparat RN-azy alkalicznej z wątroby szczura (17).

Powinowactwo rybonukleaz alkalicznych do substratu jest około 5 razy mniejsze niż rybonukleaz kwaśnych (11).

Najlepiej poznano produkty rozkładu RNA powstające pod działaniem RN-azy trzustkowej. Produktami tymi są: mononukleotydy (kwasy 3'-cytodylowy i 3'-urydylowy) oraz znaczna ilość cztero i pięcionukleotydów granicznych (ang. *core*) stanowiących niestrawioną resztę. Końcowym nukleotydem w tych oligonukleotydach jest zawsze nukleotyd 3'-pirymidynowy (7, 36). RN-aza trzustkowa zaliczana do grupy transferaz (pirymidyno-nukleotydo-2'-transferaza rybonukleinianu cyklizująca E.C. 2.7.7.16) rozbija wiązania pomiędzy nukleotydem 3'-pirymidynowym i 5'-purynowym lub pirymidynowym. Podczas tego rozkładu jako stadium przejściowe powstają cykliczne 2',3'-nukleotydy pirymidynowe.

Wewnątrzkomórkowe rybonukleazy alkaliczne również pozostawiają niewielką ilość oligonukleotydów granicznych (40); oprócz cyklicznych i niecyklicznych nukleotydów pirymidynowych powstaje także nukleotyd gwanylowy, którego nie stwierdza się w produktach działania RN-azy trzustkowej na RNA. Z syntetycznych polinukleotydów rozkładowi ulega

Tablica 1

Zestawienie własności kwaśnych i alkalicznych rybonukleaz wewnątrzkomórkowych

|                                      | Rybonukleazy kwaśne   | Rybonukleazy alkaliczne  | Literatura         |
|--------------------------------------|---|--|--------------------|
| Zakres optimum <i>pH</i>             | 5,2—5,8   | 7,8—8,2  | 39, 40, 48, 68, 73 |
| Odporność na ogrzewanie              | termolabilne  | termostabilne  | 38, 40, 53, 73     |
| Ekstrakcja kwasem                    | nie ekstrahują się  | ekstrahują się   | 2, 17, 37, 51      |
| Odporność na kwasy                   | całkowita inaktywacja   | nie ulegają zmianie  | 50, 51             |
| Mg <sup>2+</sup>                     | aktywacja   | zahamowanie  | 11, 41, 48         |
| Heparyna                             | silne zahamowanie   | słabsze zahamowanie  | 11, 47, 70         |
| Naturalny inhibitor cytoplazmatyczny | bardzo słabe zahamowanie  | silne zahamowanie  | 15, 33, 50, 54, 62 |
| Produkty trawienia RNA               | nie powstają oligonukleotydy graniczne „core”. Powstają cykliczne i niecykliczne nukleotydy purynowe i pirymidynowe | powstają oligonukleotydy graniczne „core”. Powstają cykliczne i niecykliczne nukleotydy pirymidynowe i nukleotyd gwanylowy | 27, 40             |

kwasy policytydylowe, natomiast kwas poliadenylowy nie jest rozkładany (40). Oczyszczony preparat RN-azy alkalicznej z wątroby szczura nie działa na cykliczne kwasy adenylowe i urydylowe (73). Na podstawie tych badań trudno jeszcze ustalić mechanizm działania alkalicznych rybonukleaz wewnątrzkomórkowych.

Jony dwuwartościowe, a szczególnie  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ , znane inhibitory RN-azy trzustkowej, hamują również aktywność alkalicznych rybonukleaz (11, 48). Heparyna jest około cztero-krotnie słabszym inhibitorem RN-az zasadowych aniżeli kwaśnych (11, 70).

W cytoplazmie wielu tkanek zwierzęcych występuje termolabilny niedziałający inhibitor rybonukleaz alkalicznych; jest on prawie bez wpływu na rybonukleazy kwaśne (33, 50, 54, 62). Ostatnio przypisuje się mu rolę chronienia kwasów rybonukleinowych przed działaniem rybonukleaz.

W tabelicy 1 zebrano własności rybonukleaz kwaśnych i alkalicznych.

### 3. Inne rybonukleazy

Kaplan i Heppel (34) wyodrębnili ze śledziony cielęcej i oczyszcili około 700 razy preparat rybonukleazy, która wykazuje optymalne działanie przy  $pH$  6,0—6,5. Jest ona względnie termostabilna. Podobnie jak RN-aza z trzustki nie rozkłada ona całkowicie kwasu rybonukleinowego, pozostawiając oligonukleotydy graniczne. Hydrolizuje ona nukleotydy cykliczne cytydylowe i urydylowe, natomiast nie działa na 2',3'-adenozynofosforan. Bardoń i Rzeczycki (1) stwierdzili, że zasadowe białko mitochondrialne z nerek wieprza ma zdolność depolimeryzacji kwasów rybonukleinowych. Optimum  $pH$  dla jego enzymatycznego działania leży przy  $pH$  6,7—7,0. Białko to zawiera około 30% aminokwasów zasadowych (głównie lizyny), ekstrahuje się z mitochondriów kwasem sulfosalicylowym (57, 58) i jest względnie termostabilne. Maver i Greco (40) oczyściły rybonukleazę z wątroby wołu. Oczyszczony preparat wykazywał dwa optima działania: przy  $pH$  6,7 i 7,8, w obecności jonów  $Mg^{2+}$  zaś stwierdzono tylko jedno optimum przy  $pH$  7,3 (40).

### 4. Występowanie oraz rozmieszczenie wewnątrzkomórkowych rybonukleaz

Rybonukleazy występują powszechnie we wszystkich dotąd badanych tkankach zwierzęcych oraz wielu płynach ustrojowych jak: krew (8, 20, 31, 44), ślina (14), pot (30), mocz (21), płyn mózgowo-rdzeniowy (32), płyn otrzewnowy (69).

W grasicy i śledzionie cieląt stwierdzono jedynie obecność RN-azy kwaśnej o optimum działania w  $pH$  4,5—5,5 (6, 38). Natomiast w innych tkankach stwierdza się na ogół zarówno rybonukleazę kwaśną jak i alkaliczną (39, 40, 48, 68, 73).

Porównywanie aktywności podawanych przez różnych autorów jest najczęściej niemożliwe, ponieważ używane metody oznaczania są bardzo różne. Pewien pogląd na rozmieszczenie RN-az w tkankach szczura daje zestawienie podane przez Rotha i Milstein'a (46) (tablica 2).

Tablica 2  
Aktywność rybonukleazy w tkankach szczura (wg 46)

| Tkanka           | Liczba zwierząt | Fosfor uwolniony w mg/mgN/godz. |
|------------------|-----------------|---------------------------------|
| Nerka            | 8               | 0,321 (0,250—0,420)*            |
| Śledziona        | 8               | 0,258 (0,168—0,347)             |
| Jelita           | 8               | 0,223 (0,175—0,284)             |
| Płuca            | 5               | 0,193 (0,171—0,222)             |
| Wątroba          | 8               | 0,047 (0,040—0,069)             |
| Mózg             | 5               | 0,040 (0,032—0,050)             |
| Surowica         | 11              | 0,039 (0,019—0,091)             |
| Serce            | 4               | 0,016 (0,013—0,017)             |
| Mięśnie          | 3               | 0,011 (0,009—0,012)             |
| Krwinki czerwone | 4               | 0,001 (0,000—0,001)             |

\* Podano średnie, a w nawiasach skrajne wartości. Inkubowano znakowany  $^{32}\text{P}$  RNA drożdżowy z homogenatami poszczególnych tkanek w  $\text{pH}$  5,5. Po inkubacji nierozłożony RNA wytrącano kwaśnym alkoholem, a w płynie nad osadu mierzono ilość  $^{32}\text{P}$ .

Największą aktywność rybonukleolityczną wykazuje nerka, w śledzionie, jelitach i płucach aktywność jest nieco mniejsza, natomiast w wątrobie, mózgu i surowicy jest ona około ośmiokrotnie, a w sercu i mięśniach około dwudziestokrotnie mniejsza niż w nerce. Wyniki te jednak należy traktować jako przybliżone, nie odzwierciedlają one

Tablica 3  
Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie aktywności kwaśnej i alkalicznej rybonukleazy w wątrobie szczura (wg 11)

|                           | Kwaśna RN-aza                   |            | Alkaliczna RN-aza               |            |
|---------------------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|------------|
|                           | Aktywność*<br>na gram<br>tkanki | Procent    | Aktywność*<br>na gram<br>tkanki | Procent    |
| 1. Homogenat              | 410,0 ± 62,0                    | 100        | 786,0 ± 92,0                    | 100        |
| 2. Jądra                  | 46,8 ± 20,0                     | 11,3 ± 3,9 | 106,5 ± 25,0                    | 13,8 ± 4,3 |
| 3. Mitochondria           | 222,2 ± 40,0                    | 54,2 ± 3,6 | 368,2 ± 46,0                    | 46,8 ± 1,7 |
| 4. Mikrosomy              | 63,1 ± 13,0                     | 15,5 ± 3,4 | 146,2 ± 33,0                    | 18,6 ± 4,1 |
| 5. Supernatant            | 53,5 ± 14,0                     | 13,1 ± 3,4 | 131,2 ± 22,0                    | 16,7 ± 2,5 |
| 6. Odzyskano<br>(2+3+4+5) | 385,6 ± 55,0                    | 94,0 ± 2,4 | 752,1 ± 58,0                    | 96,0 ± 3,9 |

Podane wartości są średnimi z 4 różnych doświadczeń  
± Średnie odchylenie standardowe

\* Aktywność wyrażona w umownych jednostkach przyrostu  $E_{260}$  na gram tkanki

bowiem w pełni aktywności rybonukleazy alkalicznej i w innym *pH* rozmieszczenie aktywności mogłoby się okazać odmienne.

Rozmieszczenie rybonukleaz w poszczególnych frakcjach podkomórkowych badało wielu autorów (6, 11, 59). Najbardziej wyczerpujące wyniki przedstawił *Lamirande* i wsp. dla wątroby szczura (11). Z ich danych (tablica 3) wynika, że około 50% aktywności zarówno kwaśnej jak i alkalicznej rybonukleazy przypada na mitochondria, w jądrach, mikrosomach i supernatancie zaś jest tylko po kilkanaście procent tej aktywności. Wyniki te uzyskano przed wykryciem inhibitora cytoplazmatycznego RN-azy alkalicznej, faktyczne rozmieszczenie aktywności tej rybonukleazy może być zatem nieco inne, bowiem inhibitor ten częściowo hamuje aktywność cytoplazmatycznej RN-azy (13, 50, 54, 60). W grasicy cielęcej, gdzie występuje tylko RN-aza kwaśna, około 50% aktywności stwierdzono w jądrach (6).

## II. Naturalny inhibitor wewnątrzkomórkowych rybonukleaz

Obecność naturalnego inhibitora rybonukleaz w cytoplazmie wątroby świnki morskiej pierwsi stwierdzili *Pirrotte* i *Desreux* (cyt. wg 33). Następnie pojawiły się inne doniesienia o jego występowaniu (13, 15, 33). *Roth* (50, 54) wykazał obecność inhibitora we frakcji cytoplazmatycznej tkanek szczura i innych ssaków, a także oczyścił go częściowo z supernatantu wątroby szczura (52).

Stwierdził on, że inhibitor z cytoplazmy wątroby szczura hamuje rybonukleazę z trzustki wołu, jak również RN-azy alkaliczne pochodzące z tkanek innych ssaków (50, 54), a prawie nie działa na RN-azy kwaśne. *Shortman* (60) otrzymał inhibitor z wątroby szczura w stanie znacznej czystości (zagęszczony około 6000 razy) stosując chromatografię na DEAE-celulozie oraz na żelu z fosforanu wapnia i stwierdził, że inhibitor ten jest białkiem złożonym. Jego komponenta niebiałkowa jest prawdopodobnie węglowodanem, ponieważ nadjodan już w stężeniu  $10^{-4}M$  powoduje zupełną inaktywację inhibitora. Nie można jednak wykluczyć, że nadjodan utlenia końcowe aminokwasy łańcucha peptydowego, które mogłyby warunkować jego aktywność (61). Inhibitor jest bardzo wrażliwy na ogrzewanie.

Zarówno oczyszczony jak i nieoczyszczony inhibitor jest całkowicie inaktywowany przez związki wiążące grupy -SH takie jak: mersalyl, kwas *p*-chlorortęciobenzoowy oraz jony  $Pb^{2+}$ , co wskazywałoby, iż wolne grupy -SH są potrzebne dla jego aktywności (50, 52, 61). Tworzenie dwusiarczkowych wiązań pomiędzy rybonukleazą a inhibitorem jest niemożliwe, ponieważ RN-aza z trzustki nie ma wolnych grup -SH. Grupy -SH w inhibitorze spełniają zatem jakąś inną rolę niż tworzenie wiązań w kompleksie RN-aza — inhibitor.



Inhibitor rybonukleaz ma względnie silne powinowactwo do DEAE celulozy, a protamina unieczynnia go, co wskazywałoby na jego polianionowy charakter. Jeżeli przyjąć, że alkaliczne rybonukleazy wewnątrzkomórkowe mają podobną budowę do RN-azy z trzustki wołu, o której wiadomo, że jest białkiem zasadowym, to inaktywacja mogłaby polegać na elektrostatycznym łączeniu inhibitora (polianionu) z RN-azami (polikationami).

Rozmieszczenie inhibitora w tkankach szczura badał Roth (49) (tablica 4).

Tablica 4

Rozmieszczenie inhibitora rybonukleazy w tkankach szczura (wg 49)

| Tkanka    | Ilość oznaczeń | Jednostki inhibitora/mg azotu* |                  |
|-----------|----------------|--------------------------------|------------------|
|           |                | Wartości średnie               | Wartości skrajne |
| Mózg      | 6              | 17,2                           | 28,4—11,3        |
| Wątroba   | 8              | 15,2                           | 17,0—13 2        |
| Płuca     | 6              | 11,7                           | 16 5—5,5         |
| Śledziona | 6              | 9,6                            | 14,8—4,5         |
| Serce     | 6              | 8,2                            | 11,4—4,7         |
| Nerka     | 7              | 7,5                            | 13,6—4,8         |
| Mięśnie   | 6              | 4,6                            | 6,2—2,2          |
| Surowica  | 6              | 1,5                            | 2,7—0,0          |

\* Za jednostkę inhibitora przyjęto taką jego ilość, która w temp. 37° w czasie 30 minut powoduje 50% zahamowanie 0,015 µg krystalicznej RN-azy z trzustki

Największe stężenie inhibitora jest w mózgu, wątrobie i płucach, najmniejsze zaś w surowicy i mięśniach. Zawartość inhibitora w tych samych tkankach z różnych szczurów waha się w szerokich granicach, stosunkowo najwęższych dla wątroby.

Porównując rozmieszczenie aktywności rybonukleolitycznej w tkankach szczura (tablica 2) oraz rozmieszczenie inhibitora (tablica 4) wydaje się, że tam gdzie jest duża aktywność inhibitora aktywność rybonukleazy jest stosunkowo mała i odwrotnie, na przykład w mózgu i wątrobie jest dużo inhibitora a aktywność RN-azy jest mała, natomiast w nerce gdzie jest najwyższa aktywność rybonukleazy ilość inhibitora jest niewielka.

Ze względu na obecność inhibitora w cytoplazmie przy oznaczaniu aktywności rybonukleolitycznej w homogenacie lub frakcji supernatantu wprowadzono pojęcie „aktywność wolna” i „utajona”. Pod pojęciem aktywności „wolnej” rozumiemy aktywność RN-azy, którą wykazują te frakcje bez dodania czynników inaktywujących inhibitor. „Utajoną” aktywność RN-azy oznaczamy po dodaniu do mieszaniny inkubacyjnej czynnika inaktywującego inhibitor, najczęściej kwasu *p*-chlorortęciobenzoesowego (33, 53). W niektórych tkankach zwierzęcych nie stwierdza się „wolnej” aktywności rybonukleazy, a tylko aktywność „utajoną” co

oznacza, że cała RN-aza alkaliczna cytoplazmy jest zinaktywowana przez inhibitor (33).

### III. Biologiczna rola rybonukleaz wewnątrzkomórkowych i ich naturalnego inhibitora

Mechanizm rozkładu kwasów rybonukleinowych przez wewnątrzkomórkowe rybonukleazy jest stosunkowo mało poznany. Wiadomości o nim czerpiemy z nielicznych prac przeprowadzonych na mniej lub więcej oczyszczonych preparatach enzymów lub poszczególnych frakcjach podkomórkowych, w których podczas inkubacji z RNA powstają oligonukleotydy i mononukleotydy (27, 34, 40, 42).

Ponieważ rybonukleazy występują we wszystkich dotychczas badanych tkankach zwierzęcych jak i w poszczególnych frakcjach podkomórkowych, należy przypuszczać, że spełniają one istotną rolę w metabolizmie kwasów rybonukleinowych. Poziom kwasów rybonukleinowych jest warunkowany z jednej strony szybkością ich biosyntezy, z drugiej zaś szybkością rozkładu. O udziale RN-az wewnątrzkomórkowych w biosyntezie RNA nic nie wiadomo. *In vitro* jednak przy użyciu rybonukleazy z trzustki wołu udało się zsyntetyzować oligonukleotydy z cyklicznych fosforanów cytydyny (24). Wydaje się, że ta aktywność nie jest związana z centrum aktywnym RN-azy niezbędnym do rozkładu kwasu rybonukleinowego. RN-aza trzustkowa pozbawiona zdolności rozkładu RNA zablokowaniem histydyny w pozycji 119 przez przyłączenie grupy karboksymetylowej i zablokowaniem lizyny w pozycji 41 przez przyłączenie reszty dwunitrofenolowej, w dalszym ciągu katalizuje syntezę oligonukleotydów z cyklicznych fosforanów cytydyny (4). Synteza ta jednak nie ma zapewne większego znaczenia *in vivo* ponieważ zachodzi ona przy wysokim stężeniu substratów i enzymu nie spotykanym wewnątrz komórki. Natomiast wydaje się, że istotny udział RN-az polega na rozkładzie kwasów rybonukleinowych. Dodatkowym czynnikiem regulującym poziom RNA w komórce obok rybonukleaz byłby ich inhibitor znajdujący się w cytoplazmie.

Jeżeli układ RN-aza i jej inhibitor jest układem regulującym poziom kwasów rybonukleinowych, to pośrednio wpływa on też na biosyntezę białka. Wydaje się, iż w tkankach powinna występować odwrotna zależność pomiędzy poziomem RNA, a aktywnością rybonukleazy. Nie zawsze jednak wyniki doświadczeń są zgodne z tym przypuszczeniem. Na przykład w nadnerczach szczura zwiększonemu poziomowi RNA towarzyszył spadek aktywności RN-azy, a wzrost poziomu inhibitora; taką samą zależność stwierdzono w nowotworach wszczepiennych u szczurów (33, 71, 72). Natomiast przeciwne wyniki otrzymano w rozwijającym się łożysku ludzkim. W miarę rozwoju łożyska spada poziom RNA jak

również zmniejsza się aktywność RN-azy. Również w gruczole sutkowym szczura w różnych okresach laktacji i w innych zdrowych tkankach zmniejszonemu poziomowi RNA towarzyszyła obniżona aktywność RN-azy (5, 35, 65). Fakt ten nie przeczy jednak możliwości udziału RN-az w regulacji poziomu kwasów rybonukleinowych w komórce, ponieważ poziom ten zależy nie tylko od aktywności enzymów rozkładających RNA, ale i od układów biosyntetyzujących ten związek.

Wydaje się, że istnieje odwrotna proporcjonalność pomiędzy poziomami „wolnej” aktywności RN-az i ich inhibitora. Z porównania tablic 2 i 4 wynika, że tam gdzie jest duża aktywność inhibitora, aktywność rybonukleaz jest stosunkowo mała. Przemawia to za istotną rolę inhibitora jako czynnika regulującego aktywność RN-az.

Nie wyjaśniono dotychczas zachowania się rybonukleaz w nowotworach. Istnieją dwa diametralnie różne poglądy. Badania jednych autorów wskazują na znaczny wzrost aktywności rybonukleaz w nowotworach wszczepialnych u szczurów w porównaniu z analogicznymi zdrowymi tkankami (55, 56), inni autorzy zaś w ogóle nie stwierdzają obecności rybonukleaz w nowotworach (10, 18, 19).

Stwierdzone przez wielu autorów działanie RN-azy trzustkowej jako inhibitora układu Warburga-Keilina oraz jako czynnika rozkojarzającego oksydacyjne fosforylacje (22, 26, 43) wydaje się być nieswoiste. Związane jest ono prawdopodobnie z zasadowym charakterem RN-azy trzustkowej. Inne białka zasadowe jak: histony i protamina hamują te procesy znacznie silniej. Trudno jest przenieść wyniki tych doświadczeń przeprowadzonych *in vitro* na warunki *in vivo*, ponieważ nie wydaje się, żeby stężenia RN-azy *in vivo* były tak duże, aby mogła ona wpływać na czynności oddechowe mitochondrium.

Na podstawie dotychczasowych danych doświadczalnych należy zatem przyjąć, że najistotniejszą rolą rybonukleaz wewnątrzkomórkowych jest ich udział w rozpadzie kwasów rybonukleinowych. Ważnym czynnikiem regulującym ten proces może być inhibitor RN-az występujący w cytoplazmie różnych narządów i tkanek zwierzęcych.

#### LITERATURA

1. Bardoń A., Rzeczycki W., *Acta Biochim. Polon.* **12**, 217, (1966).
2. Beard J. R., Razell W. E., *J. Biol. Chem.*, **239**, 4186 (1964).
3. Bernardi G., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 216 (1961).
4. Bernfield M. R., *J. Biol. Chem.* **240**, 4753 (1965).
5. Brody S., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 502 (1957).
6. Brown K. D., Jacobs G., Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **194**, 445 (1952).
7. Brown D. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.* **512**, 2040 (1953).
8. Connolly J. H., Herriot R. M., Gupta S., *Brit. J. Exp. Path.* **43**, 402 (1962).

9. Crestfield A. M., Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.* **238**, 2413 (1963).
10. Daoust R., Amono H., *Cancer Res.* **23**, 131 (1963).
11. De Lamirande G., Allard C., Da Costa C. H., Cantero A., *Science* **119**, 351 (1954).
12. Dickman S. R., Arostar J. P., Kropf R. B., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 539 (1956).
13. Eichel H. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **109**, 804 (1962).
14. Eichel H. J., Conger N., Chernick W. S., *Arch. Biochem. Biophys.* **107**, 197 (1964).
15. Girija N. S., Sreenivasan A., *Biochem. J.* **98**, 562 (1966).
16. Golaszewski T., *Post. Biochem.* **10**, 369 (1964).
17. Gordon J., *Arch. Biochem. Biophys.* **112**, 421 (1965).
18. Gordon J., *Arch. Biochem. Biophys.* **112**, 429 (1965).
19. Gordon J., Myers J., *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 187 (1966).
20. Gupta S., Herriot M. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **101**, 88 (1963).
21. Hakim A. A., Pappas J. M., *Clin. Chim. Acta* **4**, 184 (1959).
22. Hanson J. B., *J. Biol. Chem.* **234**, 1303 (1959).
23. Henrikson R. L., Stein W. H., Crestfield A. M., Moore S., *J. Biol. Chem.* **240**, 2921 (1965).
24. Heppel L., Whitefield P., Markham R. J., *Biochem. J.* **60**, 8 (1955).
25. Heppel L. A., Ortiz P. J., Ochoa S., *Science* **123**, 415 (1956).
26. Hillar M., *Acta Biochim. Polon.* **12**, 379 (1965).
27. Hilmo R. J., Heppel L. A., Springhorn S. S., Koshland D. E., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 214 (1961).
28. Hirs C. H. W., w *Methods in Enzymology*, tom I, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, New York 1955, str. 119.
29. Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.* **235**, 633 (1960).
30. Holley R. W., Apgar J., Merrill S. H., *J. Biol. Chem.* **236**, PC42 (1961).
31. Houck J. C., Berman L. B., *J. Appl. Physiol.* **12**, 473 (1958).
32. Houck J. C., *J. Appl. Physiol.* **13**, 273 (1958).
33. Imrie R. C., Hutchison W. C., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 106 (1965).
34. Kaplan H. S., Heppel L. A., *J. Biol. Chem.* **222**, 907 (1956).
35. Ledoux L., Pileri A., Vanderhage F., Brandli S., *Nature* **180**, 1048 (1957).
36. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.* **52**, 552 (1952).
37. Martin S. J., England H., Turhington V., Leslie J., *Biochem. J.* **89**, 327 (1963).
38. Maver M. E., Greco A. E., *J. Biol. Chem.* **181**, 861 (1949).
39. Maver M. E., Greco A. E., *J. Nat. Cancer Inst.* **17**, 503 (1956).
40. Maver M. E., Greco A. E., *J. Biol. Chem.* **237**, 736 (1962).
41. McDonald M. R., w *Methods in Enzymology*, tom II, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, New York 1955, str. 433.
42. Morais R., De Lamirande G., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 40 (1965).
43. Person P., Fine S. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 392 (1961).
44. Rabinovitch M., Liberman B., Fausto N., *J. Lab. Clin. Med.* **53**, 563 (1959).
45. Reid E., Nodes J. T., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **81**, 618 (1959).
46. Roth J. S., Milstein S. W., *J. Biol. Chem.* **196**, 489 (1952).
47. Roth J. S., *Arch. Biochem. Biophys.* **44**, 265 (1953).
48. Roth J. S., *J. Biol. Chem.* **208**, 181 (1954).
49. Roth J. S., *Arch. Biochem. Biophys.* **60**, 7 (1956).
50. Roth J. S., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 34 (1956).
51. Roth J. S., *J. Biol. Chem.* **227**, 591 (1957).

52. Roth J. S., *J. Biol. Chem.* **231**, 1085 (1958).
53. Roth J. S., *J. Biol. Chem.* **231**, 1097 (1958).
54. Roth J. S., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 903 (1962).
55. Roth J. S., *Cancer Res.* **23**, 657 (1963).
56. Roth J. S., Hilton S., Morris H. P., *Cancer Res.* **24**, 294 (1964).
57. Rzczycki W., Grudzińska A., Hillar M., *Acta Biochim. Polon.* **9**, 295 (1962).
58. Rzczycki W., Grudzińska A., Hillar M., Wszelaki-Lass E., *Acta Biochim. Polon.* **10**, 49 (1963).
59. Schneider W. C., Hageboom G. H., *J. Biol. Chem.* **198**, 155 (1952).
60. Shortman K., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 37 (1961).
61. Shortman K., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 88 (1962).
62. Shortman K., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 50 (1962).
63. Shugar D., *Post. Biochem.* **1**, 269 (1955).
64. Singer M. F., Heppel F. A., Hilmoer R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 447 (1957).
65. Slater T. F., *Biochem. J.* **78**, 500 (1961).
66. Spencer B., *Biochem. J.* **71**, 500 (1959).
67. Stein W. H., Abstract IV. International Congress of Biochemistry New York 26.VII—1.VIII.1964.
68. Stevens B. M., Reid E., *Biochem. J.* **64**, 735 (1956).
69. Urański K., *Arch. Med. Wewn.* **31**, 511 (1961).
70. Vandendrijsche L., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 347 (1956).
71. Wannemacher R. W., Allison J. B., Chu D., Crosseley M. L., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**, 708 (1962).
72. Zigman S., Allison J. B., *Cancer Res.* **19**, 1105 (1959).
73. Zytko J., De Lamirande G., Allard C., Cantero A., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 495 (1958).

## Komunikat

W dniach 19—20 września 1968 roku odbędzie się we Wrocławiu II Ogólnopolski Zjazd Genetyków, organizowany przez Polskie Towarzystwo Genetyczne.

W programie przewidziane są obrady plenarne oraz obrady w sekcjach:

- a) genetyki drobnoustrojów
- b) genetyki roślin
- c) genetyki zwierząt
- d) genetyki człowieka

Komitet Organizacyjny prosi o nadsyłanie wstępnych zgłoszeń uczestnictwa w Zjeździe oraz o nadsyłanie tytułów referatów i doniesień do 1-go grudnia bieżącego roku na adres: *Oddział Wrocławski PTG, Wrocław, ul. Chatubińskiego 4.*

MARIA KAMIŃSKA-ŻYŁA\*

## Zastosowanie warstw jednomolekularnych w badaniu kwasów nukleinowych

### Application of Monomolecular Films in the Investigation of Nucleic Acids

The preparation of nucleic acids monolayers for electron microscopy has been described.

Problem współzależności między strukturą kwasów nukleinowych a ich funkcją stanowi dzisiaj jeden z najbardziej interesujących tematów w biochemii, genetyce i biologii molekularnej. Zmiany w stanie fizykochemicznym kwasów nukleinowych oznaczają również pewną zmianę ich funkcji. Nasuwa się pytanie w jakim stopniu narusza się całość makrocząsteczek kwasów nukleinowych przy ich izolowaniu z materiału wyjściowego, charakteryzowaniu i uwalnianiu od ciał towarzyszących, kompleksowo z nimi związanych. Przy ustalaniu ciężaru cząsteczkowego posługiwano się dotychczas takimi metodami, jak ultrawierowanie, wiskozymetria i rozpraszanie światła. Obecnie mikroskopia elektronowa pozwala poznać nie tylko wielkość cząsteczek ale i zmiany budowy przestrzennej nitek molekularnych kwasów nukleinowych. W literaturze najczęściej spotyka się zdjęcia DNA, natomiast bardzo rzadko — RNA. W artykule tym przedstawiono krótko stronę metodyczną przygotowywania preparatów kwasów nukleinowych do badań w mikroskopie elektronowym.

Kwasy nukleinowe są polimerami o długich łańcuchach i dużej masie cząsteczkowej, na przykład dla DNA wynosi ona  $7 \times 10^6$  (28), co znacznie utrudnia wyodrębnianie ich z materiału biologicznego. Za pomocą stosowanych metod (6, 13, 23, 24, 26), otrzymuje się kwasy nukleinowe w stanie dość oczyszczonym, jednak mogą one zawierać jeszcze polisacharydy, białka, pektyny itp. Często podczas wyodrębniania kwasy nukleinowe ulegają pewnej degradacji. Na przykład procedura Kirby'ego (13) dwufazowego rozdziału w układzie fenol—warstwa wodna skutecznie oddziela kwas rybonukleinowy od obojętnych i kwaśnych polisacharydów, ale równocześnie doprowadza do znacznej degradacji

\* Dr, adiunkt Pracowni Wirusologii Zakładu Fizjologii Roślin PAN w Krakowie.

RNA. Wytrącanie RNA z wodnej warstwy (metoda Kirby'ego) bromkiem cetylotrójmetyloamoniowym (4, 11, 25) pozwala ominąć długi proces dializy, co ogranicza szkodliwe działanie rybonukleazy. Tak zmodyfikowana metoda pozwoliła na otrzymanie bardziej oczyszczonych preparatów RNA.

Preparaty kwasów nukleinowych przeznaczone do fotografowania w mikroskopie elektronowym muszą być odsalane metodą agarowej filtracji według Kellenbergera i Arbera (12). Przy fotografowaniu duże znaczenie ma sposób nałożenia oczyszczonego preparatu kwasów nukleinowych wraz z białkami i octanem amonu na folie nośne (ang. *grids*). Konieczne jest mianowicie uzyskanie jednomolekularnej warstwy, czyli monowarstwy.

Hughes i Riedel (10), Bull (2) i Kleinschmidt (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21) podali szczegółową procedurę sporządzania jednomolekularnych filmów białkowych.

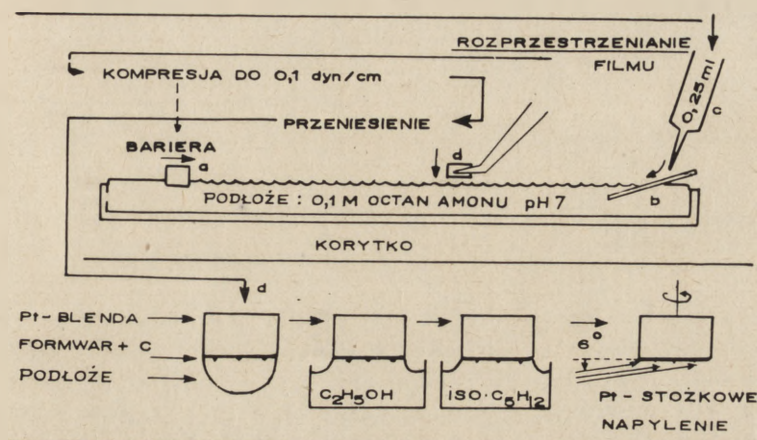
Przygotowywanie preparatów kwasów nukleinowych według Kleinschmidta jest dotychczas jedyną drogą prowadzącą do otrzymania ich fotografii w mikroskopie elektronowym. Wielu badaczy (1, 5, 8, 9, 22, 29, 30) stosowało tę metodę do przygotowywania preparatów DNA pochodzenia przeważnie bakteryjnego. Senseney i wsp. (27) zastosowali technikę monowarstwowych filmów białkowych przy fotografowaniu wirusa pomidora (*tomato ringspot*).

Film jednomolekularny tworzy się na powierzchni swobodnej między ośrodkiem wodnym a powietrzem dzięki działaniu sił międzyfazowych. Do wytworzenia jednomolekularnego nierozpuszczalnego filmu na wodnym podłożu nadają się roztwory licznych białek globularnych. W większości prac jako białkowy składnik filmów stosowano cytochrom c.

Weil i Vinograd (30) zastąpili cytochrom c dwuizopropylfosforylową trypsyną. Stężenia trzech zasadniczych składników filmu: kwasów nukleinowych, białka i octanu amonu są różne, indywidualnie dobierane przez badaczy. Filmy białkowe na powierzchni wodnej określa się podając stopień obsadzenia powierzchni A w  $\text{m}^2/\text{mg}$  i ciśnienie wywierane przez film w  $\text{dyn}/\text{cm}^2$ . Wielki wpływ na tworzenie się filmów białkowych ma *pH* rozpuszczalnika i zawartość soli. Stosunek stężenia kwasów nukleinowych do cytochromu c reguluje się samoczynnie dzięki działaniu sił międzycząsteczkowych, a jedynym sposobem jego kontrolowania jest regulowanie ciśnienia filmu za pomocą na przykład wagi Wilhelmgiego. Urządzenie to pozwala uzyskać właściwe stężenie kwasów nukleinowych, które może się zmieniać w dosyć szerokich granicach. Do pomiarów powierzchni filmu używa się tak zwanego korytka Langmuira o rozmiarach  $600 \times 100 \times 10$  mm (17). Korytko to pozwala rejestrować przesuw filmu przez zastosowanie odpowiedniej podziałki, przy czym specjalna bariera (a na rysunku 1) może film ścisnąć i rozprężyć. Chcąc się przekonać, kiedy warstwa filmu stanie się monowarstwą na-



leży zastosować zmodyfikowaną przez Dervichiana (3) i Harkinsa (7) wagę Wilhelmięgo (31), używaną do pomiarów napięcia powierzchniowego cieczy. Modyfikacja ta polega na dołączeniu do wagi Wilhelmięgo urządzenia samopiszącego, dzięki któremu można w sposób ciągły notować na papierze fotograficznym ciśnienie filmu i po-

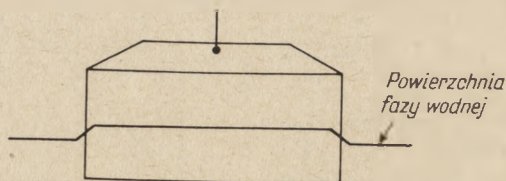


Rys. 1. Schemat przygotowania preparatów kwasu nukleinowego do mikroskopu elektronowego: a — bariera, b — pochylnia (szkiełko przedmiotowe), c — naczynie zapasowe (strzykawka), d — folia nośna. Wg (18).

wierzchnię, którą on zajmuje. Kleinschmidt zastosował metodę Wilhelmięgo z pływakami zanurzonym pionowo w stosunku do powierzchni wodnej w korytku Langmuira. Pływak może być wykonany ze szkła, lub platyny w postaci bardzo cieniutkiej blaszki. Jest on zawieszony na jednym ramieniu wagi analitycznej lub torsyjnej specjalnie przystosowanej do tego celu. Pływak musi być zrównoważony w stosunku do drugiego ramienia wagi i szalki. Po zanurzeniu pływaka do wody, względnie zetknięciu go z powierzchnią wody, wskutek działania napięcia powierzchniowego na płytkę, równowaga wagi zostaje zachwiana. Różnica obciążenia szalki po ponownym zrównoważeniu wagi jest miarą napięcia powierzchniowego. Jeżeli korytko wypełnione jest wodą, napięcie powierzchniowe powinno wynosić w temperaturze pokojowej około 73 dyn/cm. Napięcie powierzchniowe wody, względnie roztworu stanowiącego podłoże mierzy się dwukrotnie — przed i po wprowadzeniu filmu na powierzchnię wodną w korytku. Bariera (o której była mowa uprzednio) daje możliwość ściskania, lub rozprężania filmu do momentu ustaleniażądanego napięcia powierzchniowego. Po ustaleniu się napięcia powierzchniowego przyjmuje się, że film utworzył warstwę jednomolekularną. Szybkość przesuwania bariery można regulować w granicach od 0,05 cm/s, aż do 10 cm/s. Do mierzenia napięcia powierzchniowego (ciśnienia) filmu można używać według Kleinschmidta

pływak z bibuły filtracyjnej, którego górny brzeg zabezpiecza się przed wodą podłoża przez naparafinowanie.

Jeżeli pływak z bibuły pozostaje na stałej wysokości, wówczas upraszcza się oznaczanie napięcia powierzchniowego (ciśnienia filmu) stosując ważenie różnicowe za pomocą wagi torsyjnej z utrwalonym punktem



Rys. 2. Pływak z papieru filtracyjnego do mierzenia napięcia powierzchniowego. Wg (17).

zerowym belki wagi. Działanie kapilarne papieru filtracyjnego pozwala za punkt zerowy przyjąć kąt, który tworzy powierzchnia wody z powierzchnią pływaka, tak że pływak mierzy bezpośrednio napięcie powierzchniowe filmu. Zakłada się, że pływak może swobodnie przejść przez powierzchnię wody i że pęcznienie celulozy, które można obserwować przez zmianę ciężaru jest zakończone. Napięcie powierzchniowe (ciśnienie filmu) definiuje się (17):

$$\pi = \frac{(a-b) \cdot 0,981}{u} \text{ dyn/cm}$$

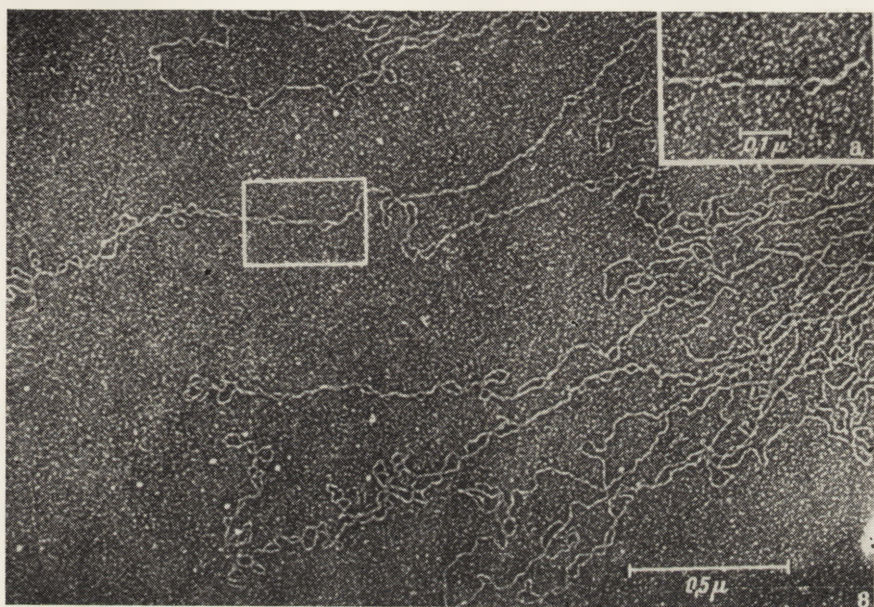
gdzie: a — pozorna waga bez filmu w mg

b — waga z filmem w mg

u — wymiary pływaka

Dokładność dynamicznego pomiaru wynosi  $\pm 1/10$  dyn/cm. Czułość metody Wilhelmięgo jest odwrotnie proporcjonalna do grubości płytki. Granicznie cienką płytkę platynową można użyć w wypadku, gdy dąży się do otrzymania ciśnienia filmu równego 0,001 dyn/cm. W wypadku kwasów nukleinowych ciśnienie filmu powinno wynosić  $\pm 0,1$  dyn/cm, a zatem dopuszczalna jest dużo mniejsza dokładność, niż przy cienkich blaszkach platynowych.

Mieszanie cytochromu c i kwasu nukleinowego w octanie amonu o pH 7 przenosi się na powierzchnię wodnego roztworu octanu amonu w korytku Langmuira. Tylko roztwory o niskich stężeniach można rozciągnąć w film jednomolekularny. Korytko Langmuira może być wykonane z winiduru, lub plexiglasu, a dno jego musi być przy każdym pomiarze powlekane parafiną, której powierzchnia powinna być gładka i wypolerowana. Wprowadzenie roztworu tworzącego film do korytka i właściwe rozpościeranie filmu polega na wypływaniu bardzo małych ilości cieczy z naczynia zapasowego (c — rysunek 1); urządzeniem wprowadzającym film do korytka może być na przykład strzykawka, z któ-



Rys. 3. Kwas dezoksyrybonukleinowy z bakterii *Staphylococcus SAB*. Wg (18).



rej roztwór powinien spływać po pochylni sporządzonej ze szkiełka przedmiotowego kompletnie zwilżonego podłożem filmu (b — rysunek 1 góra). Całkowite rozpostarcie filmu na powierzchni trwa około 15 minut. Korytko Langmuira jest umocowane na masywnej podstawie dla uniknięcia wszelkich wstrząsów oraz wyposażone w urządzenie, które pozwala przesuwac barierę (a — na rysunku 1) ograniczającą film. Do każdego rozpościerania filmu korytko napełnia się na nowo roztworem wodnym octanu amonu.

Po utworzeniu warstwy jednomolekularnej filmu i ustaleniu się napięcia powierzchniowego film przenoszony jest (przez zetknięcie) na folię nośną pokrytą warstwą węgla (d — rysunek 1). Folię tę należy trzymać poziomo, a następnie natychmiast przenieść wraz z przylegającą kropelką substratu na 30 sekund na powierzchnię absolutnego alkoholu, a bezpośrednio potem do 10% izopentanu. Następnie folię suszy się na powietrzu. Łańcuchy kwasów nukleinowych nie byłyby dostrzegalne w mikroskopie elektronowym bez pokrycia ich warstewką odpowiedniego metalu. Dlatego też po spreparowaniu filmu napyła się je w próżni. Najpierw napyła się metalem (platyna, uran, lub tlenek wanadu), a następnie węglem w bardzo cienką warstwę. Przy napyłaniu metalem folii nośnych pokrytych już filmem białkowym konieczne jest napylenie skośne pod kątem  $6^{\circ}$ — $10^{\circ}$ . Tylko przy bardzo skośnym cieniowaniu obiektu jego obraz w mikroskopie elektronowym jest dostatecznie szczegółowy (32). Przedmiot napyłany powinien obracać się tak, aby napylenie metalem następowało ze wszystkich stron (napylenie stożkowe). W oparciu o fotografie można przy pomocy odpowiedniego urządzenia zmierzyć długość nitkowatych cząstek kwasów nukleinowych. (Fotografia DNA z bakterii).

Przedstawiona metoda jest wprawdzie długa i żmudna, jest to jednak jedyna droga pozwalająca umieścić kwasy nukleinowe w ognisku mikroskopu elektronowego. Mikroskopia elektronowa w oparciu o metodę Kleinschmidta rokuje nadzieję rozwiązania wielu jeszcze niedokładnie zbadanych zagadnień dotyczących kwasów nukleinowych. L u c k i R e i c h (22) dzięki zastosowaniu tej metody śledzili pojedyncze drobiny DNA wyodrębnionego z mitochondriów, a B a s s e l, H a y a s h i i S p i e g e l m a n n (1) badali syntezę RNA na pojedynczej nici DNA.

Urządzenie do sporządzania warstw jednomolekularnych jest tylko pozornie nieskomplikowane. Wymaga ono niezwyklej precyzji i czystości. Ślady lotnych związków chemicznych (na przykład dymu z papierosa) które dostaną się na powierzchnię wodną tworzą natychmiast nowe filmy powierzchniowe, zakłócając stan równowagi filmów badanych, a przez to uniemożliwiają właściwe wykonanie pomiarów. W instytutach fizykochemicznych zazwyczaj kilku specjalistów zajmuje się wyłącznie tego rodzaju urządzeniami.

## LITERATURA

1. Bassel A., Hayashi M., Spiegelmann S. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 796 (1964).
2. Bull H. B., *Adv. Protein Chem.* **3**, 95 (1947).
3. Dervichian D. G., *J. Physique* **6**, 221 (1935).
4. Dutta S. K., Jones A. S., Stacey M., *Biochim. Biophys. Acta* **10**, 613 (1953).
5. Franck H., Zarnitz M. L., Weidel W., *Z. Naturforsch.* **18b**, 281 (1963).
6. Gierer A., Schramm G., *Nature* **177**, 702 (1956).
7. Harkins W. D., Anderson T. F., *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 1600 (1942).
8. Hattie L. A., Thomas C. A., *Science* **144**, 1142 (1964).
9. Hayashi M., Hayashi M. N., Spiegelmann S., *Science* **143**, 47 (1964).
10. Hughes A. H., Rideal E. K., *Proc. Roy. Soc. London A* **137**, 62 (1932).
11. Jones A. S., *Nature* **199**, 280 (1963).
12. Kellenberger Ed., Arber W., *Virology* **3**, 245 (1957).
13. Kirby K. S., *Bioch. J.* **64**, 405 (1956).
14. Kleinschmidt A. K., Lang D., *Proc. Eur. Reg. Conf. on Electron Micr. Delft II*, 690 (1960).
15. Kleinschmidt A. K., Lang D., Jacherts D., Zahn R. K., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 857 (1962).
16. Kleinschmidt A. K., Lang D., Zahn R. K., *Proc. XVI Internat. Congr. Zoology, Procee. wyd. J. A. Moore*, **4**, 276 (1963).
17. Kleinschmidt A. K., Zahn R. K., *Z. Naturforsch.* **14b**, 770 (1959).
18. Kleinschmidt A. K., Lang D., Zahn R. K., *Z. Naturforsch.* **16b**, 730 (1961).
19. Kleinschmidt A. K., Zahn R. K., *IV Internat. Kongr. Elektronenmikroskop.*, Berlin 1958, Band II Biologisch-Medizin. Teil Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1960.
20. Lang D., Kleinschmidt A. K., Zahn R. K., *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 142 (1964).
21. Lang D., Kleinschmidt A. K., Zahn R. K., *Biophysik* **2**, 73 (1964).
22. Luck L., Reich E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 931 (1964).
23. Lyttleton J. W., Petersen G. B., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 391 (1964).
24. Millikan D. F., Pickett E. F., *Phytochemistry* **3**, 1 (1964).
25. Ralph R. K., Bellamy A. R., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 9 (1964).
26. Reichmann M. E., Stace-Smith R., *Virology* **9**, 710 (1959).
27. Senseney C. A., Kahn R. P., Desjardins X., *Science* **120**, 456 (1954).
28. Stace C. A., *Zarys botaniki submikroskopowej*, Warszawa (1965), str. 73.
29. Thomas C. A., Hattie L. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 1297 (1964).
30. Weil R., Vinograd J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 730 (1963).
31. Wilhelmy L., *Amer. Phys.* **119**, 177 (1863).
32. Williams R. C., Wyckoff R. W. G., *J. Appl. Phys.* **17**, 23 (1946).

MARTA STAHL\*

## Oznaczanie ciężaru cząsteczkowego białek przy pomocy sączenia molekularnego

### Determination of Molecular Weight of Proteins by Molecular Sieving on Gels

The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weight is presented

We wszystkich rodzajach chromatografii podziałowej wielkość cząsteczek rozdzielanych substancji wpływa w pewnym stopniu na rozdział, ale tylko w jednym przypadku masa cząsteczkowa jest zasadniczą podstawą rozdziału. Ten rodzaj chromatografii nazwano sączeniem molekularnym (*molecular sieving*). Używa się też nazwy filtracja na żelu (*gel filtration*).

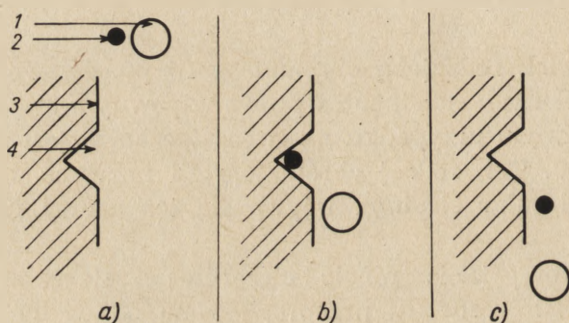
Próby wykorzystania różnic ciężarów cząsteczkowych badanych substancji do ich rozdziału przeprowadzano od dawna. W 1950 roku Syngge i Tiselius (28) rozdzielali na kolumnie wypełnionej agarosem produkty hydrolizy amylozy. W 1956 roku Lathé i Ruthven (16) jako sita molekularnego użyli skrobi. Objętość eluatu potrzebna do wymycia materiału z kolumny związana była bezpośrednio z ciężarem cząsteczkowym — jako pierwsze wymywane były białka, następnie peptydy, a na końcu aminokwasy. Obecnie skrobia jako sito molekularne ma już tylko znaczenie historyczne. Zastąpiono ją syntetycznym produktem o ściśle określonych właściwościach. Nowy materiał uzyskano przez poprzeczne usieciowanie (*cross-linking*) frakcji dekstranu o określonej długości łańcucha i nazwano *Sephadexem*. Sposób przyrządzania tego żelu jak również jego prawdopodobny wzór podano w 1963 roku w *Postęпах Biochemii* (20).

Pierwsze doświadczenia na nowym materiale przeprowadzili Porath i Flodin (21). Stwierdzili oni, że *Sephadexy* są nierozpuszczalne w wodzie i solach, stabilne w słabych kwasach i zasadach (ulegają jednak hydrolizie w silniejszych kwasach, szczególnie w podwyższonej temperaturze), nie mają własności adsorbujących, a ich hydrofilny charakter spowodowany jest obecnością grup hydroksylowych.

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

Usieciowany poprzecznie dekstran tworzy trójwymiarową sieć. Dyfuzja do wnętrza struktury żelu ograniczona jest rozmiarem wolnych przestrzeni pomiędzy łańcuchami dekstranu. *Sephadexy* charakteryzują się tym, że w przestrzenie te mogą stosunkowo łatwo wnikać związki o małych wymiarach, a szczególnie cząsteczki wody. Dla dużych cząsteczek przestrzenie te są niedostępne. Związki o dużym ciężarze cząsteczkowym przechodzą zatem przez kolumnę bez zatrzymania, natomiast w miarę zmniejszania się ciężaru cząsteczkowego coraz wyraźniej występuje zjawisko opóźniania przejścia przez kolumnę. Na tym polega funkcja *Sephadexów* jako sita molekularnego.

Na rysunku 1 przedstawiono schematycznie obraz stosunków panujących w kolumnie z *Sephadexem*, do której wprowadzono mieszaninę substancji o różnym ciężarze cząsteczkowym.



Rys. 1. Schemat sączenia molekularnego.

Na rysunku b i c widać efekt opóźnienia przejścia cząsteczek o małych rozmiarach spowodowany przez ich dyfuzję do wnętrza ziarna żelu.

1 — cząsteczki o dużych rozmiarach, 2 — cząsteczki o małych rozmiarach, 3 — powierzchnia ziarna żelu, 4 — przestrzeń w żelu dostępna dla wnikających substancji.

Żel umieszczony w wodzie pęcznieje do określonych granic, zależnie od stopnia usieciowania dekstranu. Ilość wody (w gramach) jaką może związać 1 g *Sephadexu* pozostawiony do pęcznienia określona jest przez współczynnik  $W_r$ . Czym większy jest ten wskaźnik, tym luźniejsza, mniej zbita jest struktura żelu, tym większe cząsteczki mogą przez niego penetrować.

Tablica 1

Zakres zastosowania różnych typów *Sephadexów*

| Typ <i>Sephadexu</i> | Granice ciężarów cząsteczkowych rozdzielanych substancji | Literatura |
|----------------------|--|------------|
| G-75                 | 3 000—130 000  | (1)        |
| G-100                | 5 000—300 000  | (1)        |
| G-200                | 5 000—1 000 000  | (2)        |



Zdolność pęcznienia, a tym samym zakres stosowania danego żelu przedstawiono w *Postęпах Biochemii* w 1963 r. (20). Jednak okazało się, że zakres stosowania jest znacznie szerszy, niż podany przez producenta *Sephadexu*. Tablica podaje zakres stosowania różnych typów *Sephadexów* na podstawie danych eksperymentalnych (1, 2).

### 1. Teoria sączenia molekularnego

Kolumna wypełniona spęczniałym żelem stanowi układ dwóch faz. Jedną z nich jest woda zatrzymana przez ziarna żelu, tak zwana woda wewnętrzna, której objętość oznaczono  $V_i$ . Jest to faza stacjonarna. Fazą ruchomą jest woda wypełniająca przestrzeń między ziarnami żelu. Jej objętość  $V_o$  równa jest objętości swobodnej kolumny.

Substancja wprowadzona na kolumnę ulega podziałowi między obie fazy, tak, że przy dostatecznie wolnym przepływie ustala się równowaga pomiędzy jej stężeniem w fazie ruchomej i nieruchomej. Jeżeli współczynnik podziału ( $K_d$ ) danej substancji równa się 0, to znajduje się ona tylko w fazie ruchomej i przechodzi swobodnie bez zatrzymania przez sieć żelu. Pojawia się ona w wycieku w objętości  $V_o$ , to znaczy wtedy gdy objętość eluatu równa  $V_o$  osiągnie dolny koniec kolumny. W przypadku substancji o  $K_d$  równym 1, elucja jej nastąpi dopiero wtedy, gdy przez kolumnę przejdzie eluent o objętości równej  $V_o + V_i$ . Dla substancji o  $K_d$  mającym wartości pośrednie między 0 i 1, objętość eluatu ( $V_e$ ) wyniesie więc

$$V_e = V_o + V_i K_d \quad 1$$

stąd

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} \quad 2$$

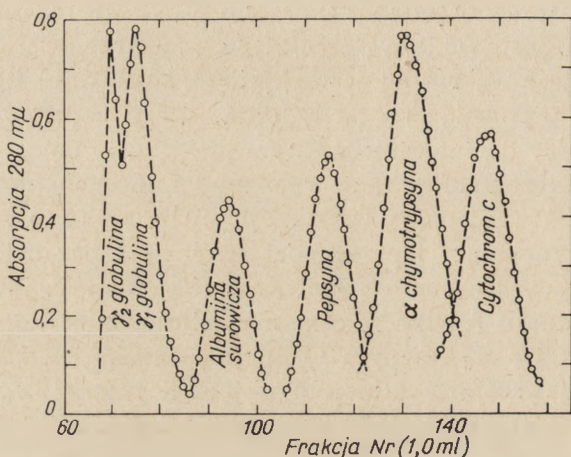
Pierwszym czynnikiem, który determinuje współczynnik podziału — jest rozmiar cząsteczek. Duże cząsteczki, (na przykład cząsteczki białka) mają  $K_d$  około 0, cząsteczki o małych rozmiarach (na przykład NaCl, glukoza) mają współczynnik podziału około 1. Ogólnie biorąc, cząsteczki o dużych rozmiarach pojawiają się wcześniej w wycieku z kolumny wypełnionej materiałem, który działa na zasadzie sita molekularnego, a cząsteczki drobne przechodzą przez kolumnę z pewnym opóźnieniem i pojawiają się w wycieku później. Znajomość  $K_d$  ma duże znaczenie, gdyż określa on położenie substancji na diagramie elucji. Pozycja zaś danej substancji w diagramie elucji jest bezpośrednio związana z jej ciężarem cząsteczkowym. Przykładowy diagram elucji podano na rysunku 2.

Żele *Sephadexy* służyć mogą, jak z powyższego widać, nie tylko do frakcjonowania, ale i do oznaczania ciężaru cząsteczkowego. Matematyczne podstawy oznaczania ciężaru cząsteczkowego na *Sephadexach*

podał P o r a t h (22). W myśl jego modelu należy przyjąć, że przestrzenie w żelu dostępne dla cząsteczek mają kształt stożkowy, same zaś cząsteczki są kształtu kulistego. Jeżeli średnicę podstawy takiego stożka oznaczyć jako  $A$ , a jego głębokość jako  $H$ , to objętość stożka  $V$  wyniesie

$$V = \frac{H\pi}{12} A^2 \quad 3$$

Jeżeli przyjąć, że promień kulistej cząsteczki równa się  $R$  i jest mniejszy od promienia podstawy stożka, to cząsteczka taka łatwo mieści się w otworze i wnikać może w głąb stożka do wysokości  $h$ .



Rys. 2. Diagram elucji białek z kolumny wypełnionej *Sephadexem* G-100 (według 30).

Środek cząsteczki może w tym otworze zajmować różne położenia, a ściślej biorąc może lokować się w tej części objętości stożka ( $v$ ), którą określa wzór

$$v = \frac{h\pi}{12} (A - 2R)^2 \quad 4$$

Jeżeli pomiędzy badaną substancją a żelem nie zachodzi adsorpcja ani inne wzajemne oddziaływanie, to współczynnik podziału ( $K_d$ ) jest proporcjonalny do stosunku  $v$  i  $V$ .

$$K_d = k \frac{v}{V} = k \frac{h(A - 2R)^2}{A^2} \quad 5$$

gdzie  $k$  oznacza współczynnik proporcjonalności.

Głębokość  $h$ , na którą może wnikać cząsteczka, zależna jest od wzajemnego stosunku promienia podstawy stożka i promienia cząsteczki, tak że

$$\frac{h}{H} = \frac{A - 2R}{A}$$

stąd

$$K_d = k \left( 1 - \frac{2R}{A} \right)^3 \quad 6$$

Objętość rozpuszczalnika w żelu ( $W_r$ ) i  $A^3$  są przypuszczalnie ze sobą ściśle powiązane. P o r a t h przyjmuje, że  $A^3$  jest proporcjonalne do  $W_r - \alpha$

$$A^3 \sim W_r - \alpha \quad 7$$

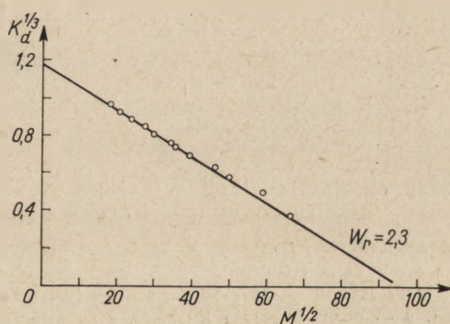
gdzie  $\alpha$  jest poprawką określającą część rozpuszczalnika tak związaną z żelem, że jest niedostępna dla substancji. Zakłada on też, że ciężar cząsteczkowy jest proporcjonalny do promienia kulistej cząsteczki

$$R \sim M^{\frac{1}{2}} \quad 8$$

Podstawiając wyrażenia 7 i 8 do wzoru (4) otrzymuje się

$$K_d = k \left[ 1 - k_1 \frac{M^{1/2}}{(W_r - \alpha)^{1/3}} \right]^3 \quad 9$$

Tak więc wartości  $R$ ,  $A$ ,  $H$  i  $h$  mające charakter raczej umowny zostały zastąpione we wzorze 9 innymi, bardziej konkretnymi wielkościami. Jak widać z równania 9 między  $K_d$  i  $M$  istnieje ściśła zależność, wykres jej jest linią prostą (rysunek 3). Identyczną zależność otrzymał W i e l a n d (29).



Rys. 3. Zależność między współczynnikiem podziału ( $K_d$ ), a ciężarem cząsteczkowym  $M$  (według 22).

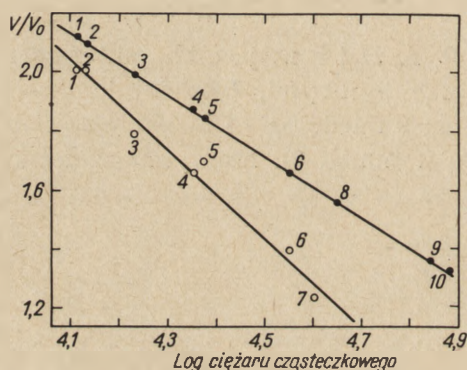
Wielu badaczy (1, 2, 30) wykazało, że podobnego typu zależność zachodzi pomiędzy ciężarem cząsteczkowym ( $M$ ) i objętością elucji ( $V_e$ ). Jeżeli do wzoru 1 wprowadzimy zależność  $V_i = aW_r$ , gdzie  $a$  — oznacza wagę suchego żelu, to różnicę między objętością elucji ( $V_e$ ), a objętością swobodną ( $V_o$ ) można przedstawić:

$$\Delta V = V_e - V_o = V_i K_d = aW_r K_d \quad 10$$

Podstawiając w miejsce  $K_d$  we wzorze 10 wyrażenie 9 otrzymujemy

$$V = aW_r \left[ 1 - k_1 \frac{M^{1/2}}{(W_r - \alpha)^{1/3}} \right]^3 \quad 11$$

Również z tego wzoru widać, że wartość  $V_e$  i  $M$  są ze sobą powiązane. Doświadczalne dane uzyskane przez wielu badaczy (18, 22, 30) wskazują, że pomiędzy objętością elucji  $V_e$  i logarytmem ciężaru cząsteczkowego istnieje zależność liniowa. Ponieważ jednak objętość elucji tego samego białka zmierzone na kolumnach o różnej długości i przekroju są różne — nie można wartości  $V_e$  stosować jako podstawy do obliczania ciężaru cząsteczkowego. Nie ulega natomiast zmianie stosunek objętości elucji danej substancji do objętości swobodnej kolumny ( $V_0$ ), uzyskany na różnych kolumnach. Tak więc właśnie stosunek tych dwóch objętości, ponieważ jest stały, służy jako podstawa dla doświadczalnego oznaczania ciężaru cząsteczkowego. Wykres zależności  $\log M$  od  $V_e/V_0$  uzyskany przez Whitakera (30) podano na rysunku 4. Podobne wykresy przedstawiają w swych pracach Andrews (1, 2) i Leach (18).



Rys. 4. Zależność między objętością elucji wyrażoną stosunkiem  $V_e/V_0$ , a ciężarem cząsteczkowym białek (według 30).

○ — kolumna wypełniona Sephadexem G-75

● — kolumna wypełniona Sephadexem G-100

1 — cytochrom c, 2 — rybonukleaza, 3 — mioglobina, 4 —  $\alpha$ -chymotrypsyna, 5 — trypsyna, 6 — pepsyna, 7 — peroksydaza, 8 — albumina jaja kurzego, 9 — albumina surowicza wołu, 10 — konalbumina.

Ze względów praktycznych łatwiej jest posługiwać się oczywiście wielkością  $V_e$  niż  $K_d$ , gdyż dla znalezienia  $V_e$  wystarczy zmierzyć absorpcję kolejnych frakcji eluatu i sporządzić diagram elucji; objętość wycieku w ml od początku prowadzenia elucji do momentu wymywania frakcji o największym stężeniu białka stanowi właśnie objętość elucji  $V_e$ . Dla znalezienia zaś ciężaru cząsteczkowego badanej substancji należy oznaczyć  $V_0$  danej kolumny oraz  $V_e$  dla kilku substancji o znanym ciężarze cząsteczkowym i sporządzić wykres zależności  $\log M$  od  $V_e/V_0$ . Znając zaś  $V_e$  dla substancji o nieznanym ciężarze cząsteczkowym można przez interpolację z tej krzywej kalibracyjnej odczytać odpowiadający danej wartości  $V_e$  ciężar cząsteczkowy.

## 2. Zastosowanie sączenia molekularnego

Wielu badaczy zajęło się praktycznie wykorzystaniem *Sepehadexów* do oznaczania ciężaru cząsteczkowego. Zbadano szereg białek, których ciężar cząsteczkowy oznaczony został innymi metodami i dla wielu z nich uzyskano wyniki zgodne, dla innych natomiast wyniki odbiegały znacznie od dotychczas podawanych wartości (Tablica 2). Przyczyny

Tablica 2

Ciężar cząsteczkowy białek oznaczony metodą filtracji na żelu (A) i innymi metodami (B)\*.

| Białko                           | Ciężar cząsteczkowy |                  |
|----------------------------------|---------------------|------------------|
|                                  | A                   | B                |
| Renina                           | 32 000 (1)          | 32 000 (7)       |
| Ceruloplazmina                   | 155 000 (2)         | 160 000 (14)     |
| Dehydrogenaza alkoholowa drożdży | 126 000 (2)         | 129 000 (11)     |
| Albumina jaja kurzego            | 44 000 (18)         | 45 000 (3)       |
| Albumina surowicza wołu          | 69 000 (18)         | 70 000 (24)      |
| Hemoglobina                      | 40 000 (30)         | 68 000 (12)      |
| Owomukoid                        | 38 000—45 000 (30)  | 27 000 (6)       |
| Lizozym                          | 7 000 (30)          | 14 000 (13)      |
| $\gamma$ -globulina              | 105 000 (2)         | 160 000 (19)     |
| Fibrynogen                       | 733 000 (2)         | 330 000 (25, 26) |
| Tyroglobulina                    | 1 330 000 (2)       | 670 000 (4)      |

\* W nawiasie podano odnośniki do literatury

niezgodności mogą być różne, na przykład adsorpcja na żelu, dysocjacja na podjednostki, obecność węglowodanów, nieregularny kształt cząsteczki, względnie tworzenie kompleksów między żelem a białkiem.

Wśród białek, dla których pomiary ciężaru cząsteczkowego poprzez filtrację na żelu nie dają prawidłowych wyników jest wiele glikoproteidów. Białka zawierające węglowodany mają luźniejszą strukturę i zachowują się jakby miały większą objętość niż białka globularne o odpowiadającym im ciężarze cząsteczkowym. Dla prostych białek objętość zajmowana przez 1 gram białka, jak również stopień hydratacji w roztworach wodnych waha się w wąskich granicach (około 0,73 ml/g i około 0,3 g H<sub>2</sub>O na gram białka), dlatego też można przyjąć, że cząsteczki białek o podobnych rozmiarach mają podobny ciężar cząsteczkowy. Być może łańcuchy węglowodanowe ulegają w większym stopniu hydratacji niż łańcuchy peptydowe i dlatego białka zawierające węglowodany zachowują się w filtracji na żelu jakby miały większy ciężar cząsteczkowy (Tablica 3). Jednakże, jak widać z tablicy 3, albumina jaja kurzego i transferyna pomimo zawartości węglowodanów dają stosunkowo nieduże odchylenia ciężarów cząsteczkowych. Podob-

nie ceruloplazmina pomimo zawartości 7% cukrowców zachowuje się w sączeniu na żelu jak typowe białko globularne. Widocznie nie we wszystkich przypadkach obecność węglowodanów powoduje zmiany gęstości białek, a co za tym idzie — odchylenia w oznaczaniu ciężarów cząsteczkowych w sączeniu na żelu. Jako potwierdzenie służyć mogą fibrynogen i  $\gamma$ -globulina, które pomimo prawie jednakowej zawartości węglowodanów (tablica 3) wykazują w sączeniu molekularnym zupeł-

Tablica 3

Ciężary cząsteczkowe glikoproteidów oznaczone metodą filtracji na żelu (A) i innymi metodami (B)\*

| Białko                | % cukrowców | ciężar cząsteczkowy |              | % odchylenia (B-A)/A $\times$ 100 |
|-----------------------|-------------|---------------------|--------------|-----------------------------------|
|                       |             | A                   | B            |                                   |
| Transferyna           | 3,9         | 41 000              | 45 000 (14)  | -10                               |
| Albumina jaja kurzego | 3,5         | 74 000              | 68 000 (3)   | +10                               |
| Ceruloplazmina        | 7,1         | 155 000             | 160 000 (14) | 0                                 |
| Fetuina               | 22,5        | 115 000             | 46 000 (27)  | +150                              |
| Owomukoid             | 21,0        | 55 000              | 28 000 (6)   | +100                              |
| Fibrynogen            | 2,3         | 733 000             | 330 000 (25) | +120                              |
| $\gamma$ -globulina   | 2,2         | 205 000             | 160 000 (16) | +30                               |

\* W nawiasach podano odnośniki do literatury

nie różne odchylenia od ciężarów cząsteczkowych przyjętych dla tych białek. Dla fibrynogenu odchylenie to wynosi +120%, a dla  $\gamma$ -globuliny tylko +30%. Według Andrews'a (2) spowodowane to może być kształtem cząsteczki; cząsteczki fibrynogenu mają dużo większy stosunek osiowy niż  $\gamma$ -globulina (25, 27). Podobnie cząsteczka fetuiny ma bardziej wydłużony kształt niż owomukoid i pomimo podobnej zawartości cukrowców wykazuje dużo większe odchylenie. Im bardziej zaś jest wydłużony kształt cząsteczki tym gorzej spełnia się równanie Poratha (równanie 8), które dotyczy tylko cząsteczek kulistych.

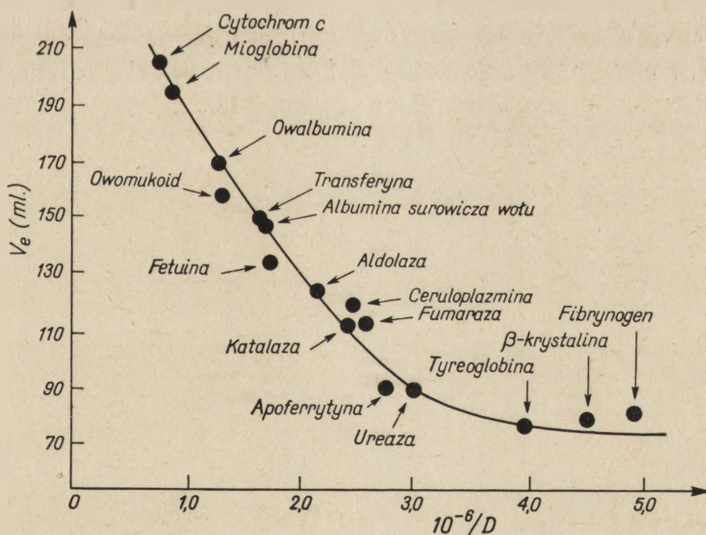
Ale nie tylko kształt i obecność cukrowców wpływają na prawidłowość wyników. Na przykład dla lizozymu otrzymuje się wyniki prawie o połowę niższe od spodziewanych. W przypadku tego białka nie można mówić o absorpcji, gdyż nie zaobserwowano wpływu siły jonowej buforu użytego do elucji, na wartość  $V_e$ . Nie ma tu też miejsca dysocjacja na podjednostki, gdyż wiadomo, że białko to zbudowane jest tylko z jednego łańcucha polipeptydowego (13). Według Whitakera (30) przyczyną uzyskiwania zbyt niskich wartości ciężaru cząsteczkowego dla lizozymu jest tworzenie się słabego kompleksu pomiędzy tym białkiem a żelem. Lizozym, mukopolisacharydaza, tworzy być może, z żelem połączenie, w którym dekstran służy jako substrat lub inhibitor dla enzymu. Na poparcie tej hipotezy można przytoczyć obserwacje

Gelotte (8), że  $\alpha$ -amylaza trzustkowa eluuje się z *Sephadexu* G-75 dużo później niż się tego oczekuje.

Przyczyną oznaczania metodą sączenia na żelu zbyt niskiego ciężaru cząsteczkowego dla hemoglobiny jest prawdopodobnie jej dysocjacja na podjednostki. Z prac Andrews'a (1, 2) wynika, że oznaczane tą metodą wartości ciężaru cząsteczkowego hemoglobiny wzrastają wraz ze stężeniem nałożonej próbki, co wskazuje na dysocjację. Whitaker (30) oznaczał ciężar hemoglobiny na *Sephadexie* G-75 i G-100. Na *Sephadexie* G-75 oznaczył on ciężar hemoglobiny jako 40 000, a na *Sephadexie* G-100 rozdzielił on hemoglobinę na dwa składniki o ciężarach cząsteczkowym 43 000 i 55 000. Ponieważ w bardzo rozcieńczonych roztworach zachodzi dysocjacja hemoglobiny na dwie podjednostki o ciężarach 34 000 (10) postuluje się, że to właśnie zjawisko ma miejsce podczas filtracji hemoglobiny przez żel i jest przyczyną otrzymywania zbyt niskich wartości ciężaru cząsteczkowego.

Według Gelotte (8) i Poratha (21) fenyloalanina, tyrozyna i tryptofan adsorbują się silnie na żelach dekstranowych. Powodować to może nienormalne zachowanie się w sączeniu molekularnym białek o dużej zawartości tych aminokwasów.

Jak widać z powyższego przeglądu nie dla wszystkich białek pomiar ciężaru cząsteczkowego metodą sączenia molekularnego daje wyniki porównywalne z ciężarem oznaczonym innymi metodami. Z tego też względu wybór białek, które mają służyć do sporządzania krzywej kalibracyjnej ma bardzo duże znaczenie. Polecieć można do tego celu albuminę surowiczą wołu, albuminę jaja kurzego, ceruloplazminę, reninę.



Rys. 5. Zależność między objętością elucji ( $V_e$ ) a współczynnikiem dyfuzji ( $D$ ), badana na kolumnie wypełnionej *Sephadexem* G-200, w pH 7,5 (według 2).

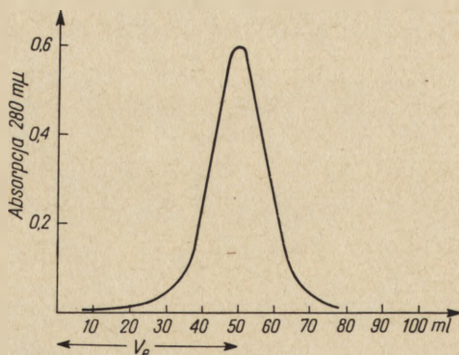
Otrzymane z filtracji na żelu dane można wykorzystać nie tylko do obliczenia współczynnika podziału i ciężaru cząsteczkowego, co omówiono powyżej, lecz również do obliczania współczynnika dyfuzji ( $D$ ). Jak wykazał Laurent i Killander (17) oraz Andrews (2) istnieje prosta zależność pomiędzy objętością elucji ( $V_e$ ) a odwrotnością współczynnika dyfuzji. Z prac Andrews wynika, że glikoproteidy, które wykazywały duże odchylenie od krzywej zależności  $\log M$  i  $V_e$ , układają się bardzo dobrze na krzywej zależności  $V_e$  i  $1/D$  (rysunek 5).

Jak wykazali Whitaker i Andrews (1) wartość  $V_e$  nie zależy od siły jonowej buforu użytego do elucji ani, co ważniejsze, od stężenia użytego do badania białka. Ilość wprowadzonego na kolumnę białka zależy tylko od czułości metody wykrywania go w wycieku. Najmniejsze stosowane przez Andrews ilości to 0,2—0,3 mg białka. Nie zaobserwowano również wpływu  $pH$  na zależność pomiędzy  $V_e$  i  $\log M$ . Dla przebadanych białek —  $\gamma$ -globuliny, albuminy jaja kurzego, albuminy surowiczej wołu, inhibitora sojowego trypsyny — wykres tej zależności w zakresie  $pH$  1,3—10,7 jest taki sam (1), co wydaje się dosyć zaskakujące wobec faktu, że większość białek w kwaśnych  $pH$  ulega denaturacji, bądź przynajmniej zmianom konformacji cząsteczek.

Wartości  $V_e$  mierzone w tych samych warunkach, w kolejnych identycznie prowadzonych doświadczeniach, na tej samej kolumnie, wahają się dla białek globularnych, wolnych od węglowodanów, w granicach 10%, dla glikoproteidów błąd oznaczeń może być większy (1).

### 3. Oznaczanie ciężaru cząsteczkowego białek metodą sączenia molekularnego

Obliczanie objętości swobodnej kolumny ( $V_o$ ). Wartość  $V_o$  można obliczyć znając całkowitą objętość kolumny ( $V_t$ ), współczynnik pęcznienia ( $W_r$ ), ciężar suchego żelu ( $a$ ) i wilgotność żelu ( $d$ ) na podstawie wzoru podanego przez Fasolda i wsp. (5), gdzie  $V_t = V_o + V_j + V_g$ , a  $V_g$  — oznacza objętość suchego żelu.



Rys. 6. Schematyczny diagram elucji. Strzałka wskazuje na objętość elucji, która w tym wypadku wynosi 50 ml.



Teoretycznie po nałożeniu na kolumnę substancji o współczynniku podziału  $K_d = 0$  znajdować się ją powinno w wycieku wtedy, gdy po swobodnym przejściu przez kolumnę osiągnie ona jej dolny koniec. W praktyce jednak nie otrzymuje się takiej punktowej elucji. Jak obrazuje rysunek 6 elucja przebiega w czasie i próba na obecność białka jest pozytywna w kilku kolejnych frakcjach. Jako objętość elucji przyjmuje się więc praktycznie tę objętość eluatu, przy której wymywa się maksymalna ilość nałożonego materiału. Dotyczy to również białek o  $K_d > 0$ .

Dla doświadczalnego oznaczenia objętości swobodnej danej kolumny ( $V_0$ ) należy zaobserwować moment, w którym wymywa się białko lub inna substancja o  $K_d = 0$  (na przykład tyreoglobulina lub tusz chiński).

*Obliczanie objętości wewnętrznej kolumny ( $V_i$ ).* Objętość wewnętrzna kolumny równa jest iloczynowi współczynnika pęcznienia ( $W_r$ ) i wagi suchego żelu (a)

$$V_i = aW_r \quad 12$$

Jeżeli (a) jest nieznane to  $V_i$  można obliczyć na podstawie wzoru podanego przez F a s o l d a i wsp. (5)

$$V_i = (V_i - V_0) \frac{W_r d}{1 + W_r} \quad 13$$

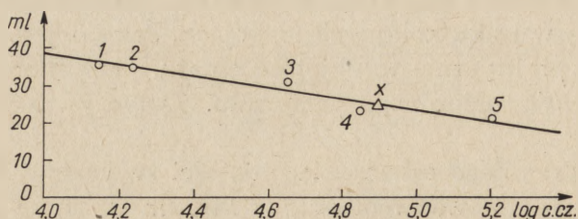
(objaśnienia jak wyżej).

*Ilość nałożonej na kolumnę próbki badanej substancji.* Aby uzyskać prawidłowe wyniki oznaczeń objętości elucji, a więc i ciężaru cząsteczkowego, objętość nałożonej próbki nie powinna być zbyt duża. W przeciwnym wypadku szczyty w diagramie elucji będą rozmyte, niesymetryczne i zachodzące na siebie. W prawidłowym diagramie elucji szczyty powinny być ostre i symetryczne, gdyż tylko wtedy możliwa jest dokładna interpretacja wyników.

Kolumna wypełniona żelem nadaje się do wielokrotnego użycia, można na niej kolejno oznaczać ciężary cząsteczkowe różnych białek. Gdy po przejściu przez kolumnę pierwszego białka przemyje się ją buforem, to na wierzch kolumny można już nakładać następną badaną substancję. Jest to ogromna zaleta tej metody, gdyż ułatwia stronę techniczną oznaczeń.

W doświadczeniu, które przeprowadzono w naszej pracowni, na kolumnę o wymiarach  $1,9 \times 50$  cm wypełnioną spęczniałym żelem *Sephadex G-100* nanoszono 1 ml próbkę 1% białka. Do kalibrowania kolumny użyto: cytochrom c, mioglobinę, albuminę jaja kurzego, albuminę surowiczą wołu i ceruloplazminę. Objętości elucji wynosiły kolejno 36,5, 35,1, 32,1, 23,0 i 20,6 ml. Na podstawie tych liczb sporządzono wykres zależności objętości elucji od logarytmu ciężaru cząsteczkowego tych białek (rysunek 7). Następnie na wykalibrowaną kolumnę nałożono 1 ml badanego białka (produkt proteolitycznej degradacji fibrynogenu,

który jest przedmiotem badań w naszej pracowni). Elucję prowadzono identycznie jak dla białek wzorcowych — płynem elującym był 0,05M bufor Tris zawierający 0,1M NaCl, pH 7,4. Zbierano frakcje po 2 ml co 5 min. i mierzono ich gęstości optyczne przy 280 m $\mu$ . W opisanym do-



Rys. 7. Wykres zależności objętości elucji badanych białek od logarytmu ich ciężaru cząsteczkowego.

1 — cytochrom c, 2 — mioglobina, 3 — albumina jaja kurzego, 4 — albumina surowicza wołu, 5 — ceruloplazmina, X — badane białko.

świadczeniu nie mierzono objętości swobodnej kolumny. Dla badanego białka uzyskano objętość elucji 22,4 ml co na podstawie krzywej kalibracyjnej odpowiada ciężarowi cząsteczkowemu 113 000.

Ze względu na niewrażliwość na zmiany pH, siły jonowej buforu użytego do elucji, stężenia badanej substancji, a również ze względu na brak chemicznego oddziaływania stosowanie *Sephadexów* do oznaczania ciężaru cząsteczkowego nabiera coraz szerszego zasięgu i jest cytowane w literaturze jako nowa, szybka i dostatecznie dokładna metoda oznaczania ciężaru cząsteczkowego białek (15). Za pomocą tej metody oznaczono nieznane dotąd ciężary cząsteczkowe kilku białek. I tak według Andrews a (1) ciężar cząsteczkowy fosfatazy alkalicznej mleka wynosi 148 000, dezaminazy adenozy — 34 000, dehydrogenazy 6-fosfo-glukozy z drożdży — 110 000 i dehydrogenazy glicerolu z *Aerobacter aerogenes* — 120 000

Ostatnio wszedł na rynki nowy syntetyczny żel — poliakrylamid, stosowany szeroko dla swych zalet w chromatografii i elektroforezie. Żel ten powstaje w wyniku polimeryzacji dwóch składników — akrylamidu i metylenobisakrylamidu w obecności czynników polimeryzujących. W zależności od proporcji obu składników jest on w różnym stopniu usieciowany — im więcej dodaje się metylenobisakrylamidu tym mniejsze są oka sieci polimeru. Wydaje się, że ze względu na możliwość otrzymania dowolnie usieciowanego żelu będzie on jeszcze lepszym środowiskiem dla sączenia molekularnego niż *Sephadexy*.

#### LITERATURA

1. Andrews P., *Biochem. J.* **91**, 222 (1964).
2. Andrews P., *Biochem. J.* **96**, 595 (1965).
3. Bull H. B., *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 4 (1945).
4. Edelhoch H., *J. Biol. Chem.* **235**, 1326 (1960).

5. Fasold H., Gundlach G., Turba F., *Chromatography*, wyd. E. Heftman, Reinhold Publishing Corp., New York, 1961, str. 405.
6. Fredericq E., Deutsch H. F., *J. Biol. Chem.* **181**, 499 (1949).
7. Friedman L., *Diss. Abstr.* **20**, 4510 (1960).
8. Gelotte B., *J. Chrom.* **3**, 330 (1960).
9. Gelotte B. J., cyt. przez P. Flodin w *Dextran Gels and Their Applications in Gel Filtration*, Pharmacia, Uppsala, Sweden, 1962.
10. Gutfreund H., *Hemoglobin*, Interscience, New York, 1947, str. 197.
11. Hersch R. T., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 353 (1962).
12. Johnson P., *Ann. Repts. on Progress Chem.* **43**, 53 (1948). Chem. Soc. London.
13. Jollès P., w *The enzymes*, red. P. D. Boyer, Lardy H., Myrbäck K., Academic Press, New York, 1960, str. 431.
14. Kasper C. B., Deutsch H. F., *J. Biol. Chem.* **238**, 2305 (1963).
15. Keil B., *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 175 (1965).
16. Lathe G. N., Ruthven S. R., *Biochem. J.* **62**, 665 (1955).
17. Laurent T. C., Killander J., *J. Chrom.* **14**, 317 (1964).
18. Leach A. A., O'Shea P. C., *J. Chrom.* **17**, 245 (1965).
19. Phelps R. A., Putnam F. W., *The Plasma Proteins*, vol. 1, Putnam F. W., Academic Press Inc. New York, str. 143.
20. Popowicz J., *Post. Biochem.* **9**, 245 (1963).
21. Porath J., Flodin P., *Nature* **183**, 1657 (1959).
22. Porath J., *Pure Appl. Chem.* **6**, 233 (1963).
23. Porath J., *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 193 (1960).
24. Scatchard G., Batchelder A. C., Brown A., *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 2320 (1946).
25. Scheraga H. A., Laskowski M., *Adv. Protein Chem.* **12**, 1 (1957).
26. Shulman S., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 5846 (1953).
27. Spiro R. G., *J. Biol. Chem.* **235**, 2860 (1960).
28. Syngé R. L. M., Tiselius A., *Biochem. J.* **46**, xli (1950).
29. Wieland T., Duesberg P., Determann H., *Biochem. Z.* **337**, 303 (1963).
30. Whitaker J. R., *Anal. Chem.* **35**, 1950 (1963).



LECH KORNISZEWSKI\*, MARCIN KROTKIEWSKI\*

## Metabolizm trójglicerydów tkanki tłuszczowej

### The Metabolism of Adipose Tissue Triglycerides

The mechanisms of triglycerides biosynthesis and degradation are surveyed with special emphasis on adipose tissue metabolism and hormonal influences on it.

Podstawowym substratem procesów utleniania komórkowego u ssaków są kwasy tłuszczowe i glukoza. Zapasy węglowodanów są jednak bardzo małe, toteż z wyjątkiem okresów bezpośrednio po posiłkach ustrój korzysta przede wszystkim z energii zmagazynowanej w trójglicerydach tkanki tłuszczowej. Metabolizm trójglicerydów można omawiać tylko w ścisłym powiązaniu z metabolizmem tkanki tłuszczowej.

Tkanka tłuszczowa była przez długi czas swego rodzaju Kopciuszką wśród innych tkanek ustroju, nazywana była „tkanką bez znaczenia” lub „biernym magazynem tłuszczu”. Kariera tkanki tłuszczowej rozpoczęła się w roku 1937, kiedy to Rittenberg i Schoenheimer (46) używając kwasów tłuszczowych znakowanych deuterem wykazali, że trójglicerydy depot tłuszczowego myszy mają czas półtrwania jedynie 7 dni. Pierwszy artykuł poglądowy o tkance tłuszczowej opublikowali w r. 1948 Wertheimer i Shapiro (65). Praca ta przyczyniła się znacznie do zainteresowania metabolizmem tkanki tłuszczowej.

Tkanka tłuszczowa jest niezbędna do życia. Aby istnieć bez niej, organizm musiałby przystosowywać szybkość wchłaniania z przewodu pokarmowego do różnych szybkości zużywania energii. Absorpcja z przewodu pokarmowego zachodzi jednak szybko i nie może być dowolnie regulowana. Przy braku tkanki tłuszczowej nie byłoby możliwe nawet krótkotrwałe głodzenie, ponieważ węglowodany i białka nie mogą być wydajnym źródłem energii (całkowite zasoby węglowodanów w tkankach i płynach ustrojowych wynoszą zaledwie około 75 g, co odpowiada

\* I Klinika Pediatria Akademii Medycznej i II Klinika Chorób Wewnętrznych Studium Doskonalenia Lekarzy w Warszawie.

Wykaz stosowanych skrótów: FFA — wolne kwasy tłuszczowe, TG — trójglicerydy, LP — lipoproteidy, CH — cholesterol, FL — fosfolipidy,  $\alpha$ -FG —  $\alpha$ -fosfoglicerol, ACP — białko transportujące rodniki acylowe (ang. *Acyl Carrier Protein*).

300 kaloriom). Zdolność magazynowania trójglicerydów w depot jakim jest tkanka tłuszczowa zapewnia elastyczność metaboliczną i zdolność adaptacji, które musiały decydować o większej zdolności przeżycia w przebiegu ewolucji.

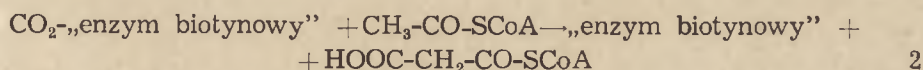
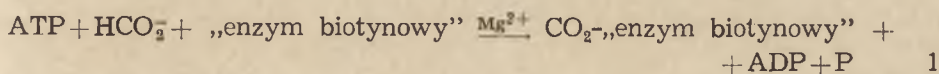
Dawniejsze obserwacje wykazujące niewielkie zużycie tlenu i słabe unaczynienie tkanki tłuszczowej były mylne. Nie uwzględniano bowiem faktu, że aktywna metabolicznie masa tkanki tłuszczowej reprezentuje małą część jej całkowitej wagi. Właściwą ocenę uzyskuje się dopiero odnosząc przepływ krwi przez sieć kapilar i metabolizm całej tkanki do tej małej wagowo ale niezwykle aktywnej części. Zmagazynowane w wakuolach komórek tkanki tłuszczowej trójglicerydy są prawdopodobnie metabolicznie „bezwładne”, ale cienka warstwa cytoplazmy otaczającej wakuole jest bardzo aktywna. Może ona szybciej przekształcać substraty na przykład glikozę lub kwas octowy w długołańcuchowe kwasy tłuszczowe niż komórki wątroby. Komórki tkanki tłuszczowej oglądane w mikroskopie elektronowym wykazują w cytoplazmie otaczającej zmagazynowane kulki tłuszczu, mitochondria, siateczkę endoplazmatyczną i inne wyposażenie komórkowe świadczące o wielkiej aktywności metabolicznej. Badania enzymatyczne dowodzą istnienia wielu układów. Najważniejsze z nich to: 1) cykl Embdena—Meyerhoffa, 2) cykl pentozowy, 3) cykl Krebsa, 4) układy przenoszenia elektronów, 5) układy syntezy kwasów tłuszczowych, 6) układy syntezy fosfolipidów, 7) układy utleniania kwasów tłuszczowych, 8) układy rozkładu fosfolipidów, 9) swoiste lipazy, 10) układy syntezy glikogenu przez urydynodwufosfo-glikozę, 11) układy syntezy białek i inne.

Najważniejsze etapy w metabolizmie trójglicerydów to: synteza kwasów tłuszczowych, synteza trójglicerydów i lipoliza. Zostaną one kolejno omówione.

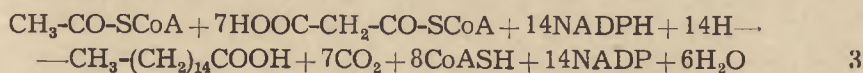
### I. Synteza kwasów tłuszczowych

Przez długi czas uważano, że synteza kwasów tłuszczowych może być tylko odwróconym procesem ich utleniania. Według tych poglądów podstawowym elementem jest acetylo-CoA, a pierwszym produktem syntezy — aceto-acetylo-CoA. W obecności NADH<sub>2</sub> ulega on redukcji do β-hydroksybutyrylo-CoA, a ten z kolei (po odłączeniu cząsteczki H<sub>2</sub>O) przekształca się w kwas β-nienasycony-krotonylo-CoA. W obecności NADPH<sub>2</sub> zostaje on zredukowany, tworząc butyrylo-CoA. Wielokrotne powtórzenie tego procesu powoduje powstawanie pochodnych CoA coraz to wyższych kwasów tłuszczowych o parzystej liczbie atomów węgla. Według obecnych poglądów ten tor syntezy wydaje się jednak mieć małe znaczenie i zachodzi prawdopodobnie tylko w mitochondriach. Przed kilkoma laty zaproponowano inny schemat syntezy kwasów

tłuszczowych (62). Uwzględniła ona fakt, że do syntezy niezbędny jest  $\text{CO}_2$ . Pierwszą reakcją jest kondensacja  $\text{CO}_2$  z acetylo-CoA na malonylo-CoA. Karboksylacja ta przebiega w dwóch etapach (33):



Malonylo-CoA łączy się z acetylo-CoA, ulega pod wpływem  $\text{NADPH}_2$  redukcji a następnie traci  $\text{CO}_2$  tworząc butyrylo-CoA. W dalszych reakcjach łańcuch wydłużany jest kolejno o 2 atomy węgla poprzez łączenie się z innymi cząsteczkami malonylo-CoA, uwodorowanie i odłączenie  $\text{CO}_2$ . Sumarycznie reakcje te przedstawiają się następująco:



Bresler i Wakil (5) pierwsi wykazali, że głównym produktem reakcji jest wolny kwas palmitynowy, a nie jego CoA-pochodne.

15 i 16 atom węgla kwasu palmitynowego pochodzi z acetylo-CoA, podczas gdy malonylo-CoA dostarcza fragmentów dwuwęglowych do budowy odcinka łańcucha od 1 do 14 atomu węgla. Krótkołańcuchowe acylo-CoA (butyrylo-CoA, heksanylo-CoA, oktanylo-CoA) są wbudowywane w kwas palmitynowy dwudziestokrotnie słabiej niż równoważne ilości acetylo-CoA. Co więcej nie nagromadzają się one w czasie syntezy z udziałem acetylo-CoA. Bresler i Wakil (6) wykazali ponadto, że jest mało prawdopodobne, aby wolne pochodne acetylo-CoA były związkami pośrednimi w syntezie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Krotonylo-CoA i  $\beta$ -hydroksybutyrylo-CoA nie mogą być ani zredukowane przez  $\text{NADPH}_2$  w obecności wysokooczyszczonych preparatów z wątroby, ani nie mogą zastąpić acetylo-CoA w przemianie malonylo-CoA do kwasu palmitynowego. Aceto-acetylo-CoA jest wprawdzie redukowany do  $\text{D}(-)\beta$ -hydroksybutyrylo-CoA przez enzymatyczny układ syntezy kwasów tłuszczowych — ale tylko przy względnie wysokich stężeniach i z szybkością znacznie mniejszą niż szybkość syntezy kwasów tłuszczowych. Działanie to przypisywano reduktazie  $\text{NADPH}_2$ : aceto-acetylo-CoA, która prawdopodobnie nie jest częścią kompleksu enzymatycznego syntezy kwasów tłuszczowych (60).

Wykazano na preparatach tkanki tłuszczowej szczura (39) i wątroby gołębia (6), że w procesach syntezy kwasów tłuszczowych istnieje zapotrzebowanie na związane z białkiem grupy sulfhydrylowe. Lynen i Tada (32) doszli do wniosku, że związkiem pośrednim w syntezie kwasów tłuszczowych jest kompleks acetylo-S-enzym (lub enzymy), a następnie udało się im wyodrębnić ów kompleks po inkubacji preparatów z drożdży ze znakowanymi  $^{14}\text{C}$  acetylo-CoA i malonylo-CoA bez

NADPH<sub>2</sub>. Ostatnio Goldman i Vagelos (16) otrzymali oczyszczone wyciągi z *E. coli*, które katalizują syntezę kwasu palmitynowego i *cis*-wakcenowego z malonylo-CoA i acetylo-CoA. Rozdzielając te wyciągi otrzymano (30, 64) dwie frakcje: ciepłochwiejną i ciepłostałą, obie niezbędne do syntezy długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Frakcję ciepłochwiejną nazwano „syntetazą kwasów tłuszczowych”. Stwierdzono w niej aktywność dwóch dehydrataz: jedna odłącza wodę z hydroksydekanylo-CoA powodując powstanie  $\beta$ -dekanylo-CoA, a druga odłączając wodę z tego samego substratu daje  $\alpha$ -dekanylo-CoA. Obecność ich w preparatach *E. coli* potwierdza hipotezę o beztlenowej syntezie kwasu *cis*-wakcenowego (52). Białko ciepłostałe ma raczej charakter koenzymu niż enzymu; sulfhydrylowa grupa tego białka działa jako akceptor i donator acylu. Wszystkie reakcje, w których łańcuch kwasu tłuszczowego jest przedłużany i redukowany zachodzą, gdy acyl związany jest z tym białkiem. Właściwy enzym udało się rozdzielić na trzy składowe części, które katalizują reakcję wydłużania łańcucha, jego redukcję oraz pośrednie etapy dehydratacji. Wobec tego, że głównym zadaniem ciepłostałego białka jest przenoszenie acyli, zostało ono nazwane białkiem transportującym rodniki acylowe (ACP — ang. *Acyl Carrier Protein*). (64): ACP jest białkiem o charakterze kwaśnym i ciężarze właściwym 9 000—9 400; zawiera ono 82 aminokwasy (między innymi 20 cząsteczek kwasu glutaminowego i 10 cząsteczek kwasu asparaginowego). Białko to zawiera prawdopodobnie tylko jedną grupę sulfhydrylową, która przyłącza grupy acylowe z ich CoA-pochodnych. Grupę prostetyczną stanowi 4-fosfopantoteina, związana w ACP wiązaniem estrowym przez grupę hydroksylową seryny (36). W bakteryjnych preparatach enzymatycznych syntetyzujących kwasy tłuszczowe (dobrze rozpuszczalnych i dających się frakcjonować), ACP gra więc podstawową rolę w tej syntezie. Natomiast syntetyzujące kwasy tłuszczowe preparaty z gołębi (5, 22) i ssaków (40) są wieloenzymowymi kompleksami niepoddającym się frakcjonowaniu i dotychczas nie udało się wykazać w nich obecności ACP. Mimo to są pewne dowody, że białko identyczne z ACP lub podobne znajduje się w tkance tłuszczowej ssaków. Larrabee i wsp. (28) wykazali, że preparaty tkanki tłuszczowej szczura zawierają związaną z białkiem 4-fosfopantoteinę. Za identycznością ACP u różnych gatunków przemawia fakt, że 4-fosfopantoteina odszczepia się od bakteryjnego ACP i od preparatów syntetazy szczura w tych samych warunkach (28).

Mechanizm syntezy kwasów tłuszczowych z uwzględnieniem roli ACP przedstawia się jak następuje:

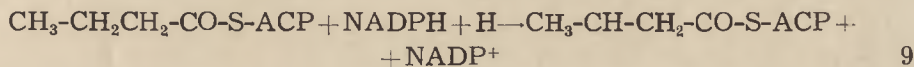
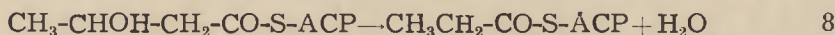
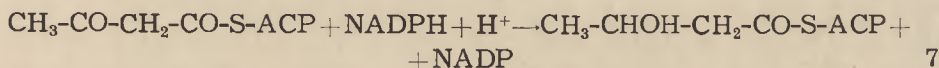
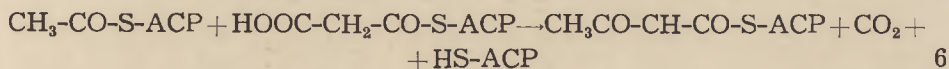
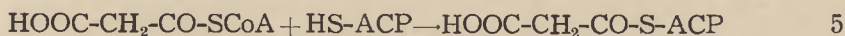
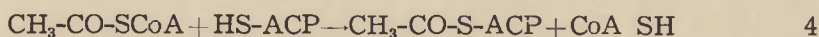
1. ACP przyłącza grupy acetylowe i malonylowe z ich CoA-pochodnych, tworząc acetylo-ACP i malonylo-ACP.
2. Acetylo-ACP i malonylo-ACP reagują tworząc acetoacetylo-ACP.



3. W obecności  $\text{NADPH}_2$  malonylo-ACP i acetoacetylo-ACP reagują tworząc długołańcuchowe kwasy tłuszczowe.

4. W obecności pewnych frakcji enzymatycznych acetylo-CoA, malonylo-CoA,  $\text{NADPH}_2$  i ACP dają mieszaninę hydroksyacetylo-ACP o łańcuchach 8, 10, 12 i 14-węglowych. Te hydroksyacetylopochodne są przekształcane w ich nasycone homologi lub w kwas palmitynowy podczas inkubacji z  $\text{NADPH}_2$ , malonylo-CoA i odpowiednią frakcją enzymatyczną syntetazy.

Końcowym produktem syntezy kwasów tłuszczowych jest wolny kwas palmitynowy, ale w obecności stechiometrycznych ilości ACP można otrzymać jako produkt końcowy palmitylo-ACP. Syntezę kwasów tłuszczowych przedstawiają reakcje 4—9:

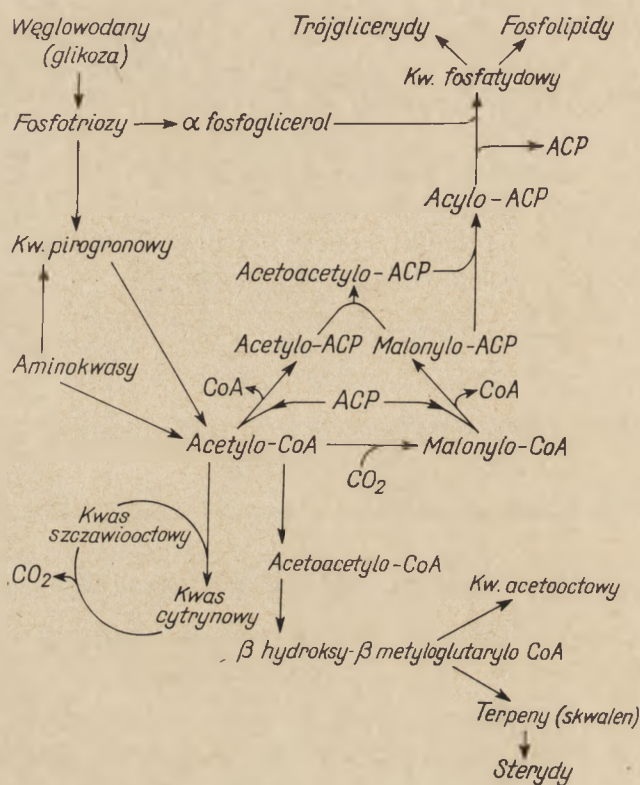


Sześciokrotne powtórzenie reakcji 6—8 daje palmitylo-ACP, który jest następnie hydrolizowany do kwasu palmitynowego i ACP. Nie wiadomo jeszcze na pewno, czy synteza kwasów tłuszczowych zakończona jest bezpośrednim przeniesieniem cząsteczki kwasu z ACP na fosfolipid, czy też odbywa się z udziałem acylo-CoA. Schemat syntezy kwasów tłuszczowych przedstawia rysunek 1.

Chociaż synteza kwasów tłuszczowych może zachodzić pod wpływem tych samych enzymów co ich katabolizm, istnienie niezależnego typu syntezy (przez malonylo-CoA) pozwala na lepszą kontrolę syntezy i rozkładu. Obydwa układy syntetyzujące wymagają nie tylko odpowiedniej ilości acetylo-CoA ale także donatora protonów. Jest nim  $\text{NADPH}_2$  wytwarzany w cyklu pentozowym utleniania glukozy. Jeśli  $\text{NADPH}_2$  jest obecny w dostatecznej ilości, prawie cały acetylo-CoA używany jest do syntezy kwasów tłuszczowych; przy braku  $\text{NADPH}_2$  przeważa synteza ciał ketonowych.

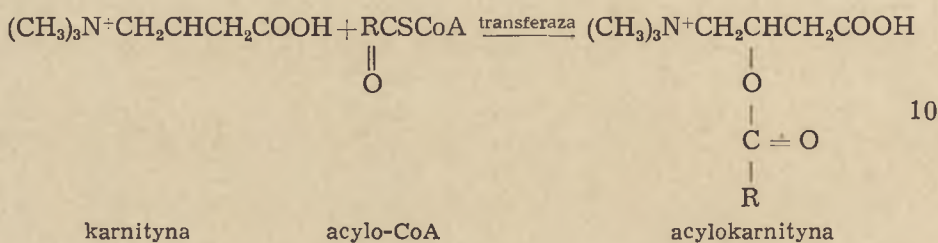
Głównym prekursorem trójglicerydów tkanki tłuszczowej jest glukoza. Jest ona źródłem zarówno  $\alpha$ -fosfoglicerolu jak i kwasów tłuszczowych (poprzez acetylo-CoA); ponadto metabolizm glukozy umożliwia dowóz  $\text{NADPH}_2$  niezbędnego do procesów redukcyjnych w syntezie kwasów. Aminokwasy mogą także przyczyniać się — choć w znacznie

mniejszym stopniu — do wzrostu syntezy trójglicerydów: albo przez procesy neoglikogenezy, albo bezpośrednio służąc po dezaminacji jako materiał do syntezy kwasów tłuszczowych.



Rys. 1. Schemat syntezy kwasów tłuszczowych

Znany jest fakt, że aktywacja i utlenianie kwasów tłuszczowych w mitochondriach nasilają się pod wpływem karnityny, z której powstaje acylokarnityna — nośnik grup acylowych do mitochondriów. Reakcja 10 przenoszenia acyli z CoA na karnitynę zależy od swoistej acylotransferazy:



Karnityna pobudza także przemianę kwasu pirogronowego w dłużejłańcuchowe kwasy tłuszczowe, a kompetycyjny inhibitor karnityny,  $\gamma$ -butyrobetaina znacznie obniża wytwarzanie acetoctanu (7). Opisy-

wano także inne rodzaje aktywacji kwasów tłuszczowych. Rossi i Gibsen (49) wykazali, że kwasy tłuszczowe są aktywowane specyficznie przez trójfosforan guanozyny. Aktywacja kwasów tłuszczowych może też zachodzić pod wpływem enzymów cyklu kwasu cytrynowego. Wykazano, że w większym stopniu przyczynia się to do powstawania acetylo-CoA niż reakcje aktywowane przez acetotiokinazę (24).

## II. Synteza trójglicerydów

Trójglicerydy powstają z dwuglicerydów, których prekursorami są:  $\alpha$ -fosfoglicerol i dwuacylofosfoglicerol czyli kwas fosfatydowy. Rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w trójglicerydach sugeruje, że do pierwszego atomu węgla  $\alpha$ -fosfoglicerolu przyłącza się kwas nasycony, a do 2-go — nienasycony. Powstały kwas fosfatydowy może być następnie przekształcony w trójgliceryd.

Savary i Desnuelle (51) wykazali, że niektóre trójglicerydy pochodzenia roślinnego, zawierają nienasycone kwasy tłuszczowe wyłącznie przy 2 atomie węgla. Sugerują oni istnienie dwóch układów enzymatycznych przekształcających  $\alpha$ -fosfoglicerol w kwas fosfatydowy. Jeden — estryfikujący w pozycji 2 — powinien być specyficzny dla kwasów nienasyconych. Drugi, prawdopodobnie niespecyficzny układ estryfikuje kwasy tłuszczowe w pozycji 1. Hipoteza ta mogłaby również dotyczyć specyficzności enzymatycznej różnych tkanek; wyjaśniałoby to różne rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w naturalnych trójglicerydach. Inni autorzy (8) wykazali jednak, że rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w trójglicerydach kontrolowane jest raczej przez długość łańcucha niż przez stopień jego nasycenia. Granssen stwierdził ostatnio, że *in vitro* stosunek wbudowywanego kwasu olejowego do palmitynowego był znacznie niższy w dwuglicerydach niż w trójglicerydach, co sugeruje, że *in vivo* kwas olejowy jest łatwiej wbudowywany niż kwas palmitynowy (20). Kwas fosfatydowy zajmuje w syntezie glicerydów kluczową pozycję, a specyficzne enzymy umieszczające nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe odpowiednio w pozycji 1 i 2 tego kwasu kontrolowałyby tym samym skład kwasów tłuszczowych we wszystkich jego pochodnych.

Inne wnioski wydają się wypływać z pracy Landsa i Harta (27), którzy badali w preparatach mikrosomów wątroby powstawanie kwasu fosfatydowego z fosfoglicerolu w obecności kwasu stearynowego i linc-lenowego. W warunkach doświadczenia acylofosfoglicerol — związek pośredni w procesie syntezy kwasu fosfatydowego — nie gromadził się, ponieważ był szybciej acylowany niż związek wyjściowy. Obydwa etapy reakcji katalizowane są przez odrębne enzymy; pierwszy etap wymaga obecności grup sulhydrolyowych, w drugim nie są one niezbędne.

W pozycję 2 fosfoglicerolu wbudowywało się 40% kwasu stearynowego i 52% kwasu linolenowego. Wskazywałoby to na przypadkowy rozdział kwasów tłuszczowych i przemawiało za tym, że reakcje prowadzące do powstawania kwasu fosfatydowego nie są wystarczająco swoiste aby zapewnić specyficzne rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w glicerydach tkankowych. Specyficzny układ kwasów tłuszczowych w trójglicerydach musiałby być zatem wynikiem przemieszczania kwasów tłuszczowych już po ich zestryfikowaniu z  $\alpha$ -fosfoglicerolem.

Wbudowywanie kwasów tłuszczowych z trójglicerydów osocza w trójglicerydy tkanki tłuszczowej zależy od stanu odżywienia i jest wprost proporcjonalne do aktywności lipazy lipoproteidowej (4). Enzym ten jest związany z komórkami tłuszczowymi, a nie jak dawniej uważano — z komórkami zębów czy naczyń. Depot trójglicerydowy jest ciągle hydrolizowany i powtórnie syntetyzowany. U ludzi, w ciągu doby, 1,7% wiązań estrowych trójglicerydów rozszczepia się i ponownie powstaje. Oznacza to, że trójglicerydy tkankowe mają czas półtrwania około 40 dni.

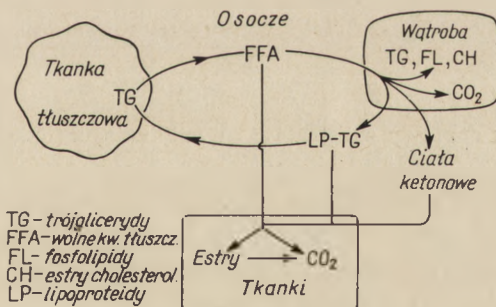
Wśród lipaz zidentyfikowanych w innych tkankach najlepiej poznana jest lipaza trzustkowa. Hydrolizuje ona wiązania estrowe tylko w pozycji 1 i 3; kwasy zestryfikowane w pozycji 2 można więc następnie oznaczyć jako monoglicerydy (11). Enzym ten nie jest jednak stereospecyficzny nie można zatem ustalić jaki kwas tłuszczowy znajdował się w pozycji 1, a jaki w pozycji 3. Inne lipazy tkankowe mogą być stymulowane lub hamowane przez sulfonowane związki wielocukrowe. Być może związana z tym jest mała aktywność lipazy lipoproteidowej w aorcie starych zwierząt (37). Za znaczeniem aktywności lipazy lipoproteidowej w patogenezie miażdżycy przemawiałyby prace Nestela (43), który wykazał, że u osób z chorobą wieńcową trójglicerydemia po posiłkach jest wyższa niż u osób zdrowych. Jak się ostatnio powszechnie przyjmuje hipertrójglicerydemia ma znacznie większe znaczenie dla rozwoju miażdżycy niż wysoki poziom cholesterolu.

Różne kwasy tłuszczowe uwalniane pod wpływem lipazy komórkowej przechodzą do środowiska z różną szybkością. Poziom wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu nie zawsze jest więc odbiciem całkowitej ilości uwolnionych kwasów (1). Wbudowywanie wolnych kwasów tłuszczowych osocza w trójglicerydy tkanki tłuszczowej zachodzi również z różną szybkością dla różnych kwasów (21). Szybkość transportu wzrasta ze stopniem nienasycenia i skróceniem łańcucha kwasu tłuszczowego, jest więc związana z jego rozpuszczalnością. Onaczając wychwytywanie kwasów palmitynowego, stearynowego, olejowego i linolenowego nie stwierdzono jednak wyraźniejszego uprzywilejowania żadnego z nich (53). Sugerowano, że różne kwasy mają różne progi absorpcji, powyżej których procentowe wchłanianie jest jednakowe dla każdego kwasu.

Lokalny dowóz pewnych kwasów może niewątpliwie wpływać na skład kwasów tłuszczowych w glicerydach. Tove (57) wykazał, że podawanie szczurom kwasu linolenowego powoduje estryfikację dużej jego ilości z pierwszorzędowymi grupami hydroksylowymi glicerolu i zmienia normalny skład kwasów tłuszczowych w trójglicerydach tkanki tłuszczowej. Prawdopodobnie estryfikacja w pozycji 2 jest odbiciem syntezy *de novo*, a w pozycji 1 lub 3 zależy przede wszystkim od reakcji wymiany, katalizowanej przez lipazy. Ostatnio wykazano, że niektóre nasycone kwasy przed estryfikacją przy węglu 2 muszą być odwodorowane (1). Enzymy, które kontrolują przyłączanie lub rozmieszczenie kwasów tłuszczowych decydują o typowym układzie kwasów tłuszczowych, charakterystycznym dla trójglicerydów danej tkanki. Skład kwasów tłuszczowych trójglicerydów tkankowych kontrolowany jest przez czynniki genetyczne; kontrola ta może prowadzić do zmiany składu glicerydów w czasie dojrzewania. Przykładem tego jest wyraźne zwiększenie syntezy kwasu linolenowego wskutek działania systemów enzymatycznych nasion krokosza w około 15 dni po kwitnieniu (40).

### III. Rozkład trójglicerydów

Tkanka tłuszczowa, w przeciwieństwie do wątroby, jest niezdolna do użytkowania wolnego glicerolu, nie zawiera bowiem fosfoglicerokinazy (38). Uwolniony w procesie lipolizy glicerol nie może być więc zużyty do syntezy trójglicerydów, a że jest on także bardzo słabo utleniany (10), stanowi zatem właściwie końcowy produkt w metabolizmie



Rys. 2. Schemat przemian wolnych kwasów tłuszczowych

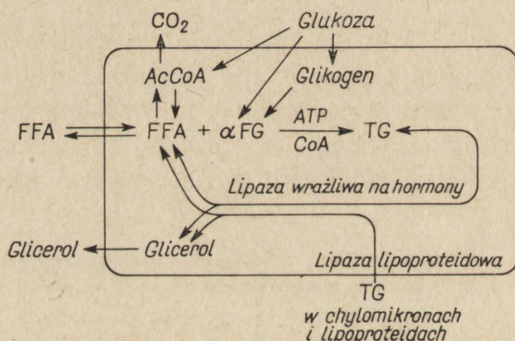
tkanki tłuszczowej. Szybkość nagromadzenia glicerolu *in vitro* pozwala wnioskować o szybkości lipolizy.

Z trójglicerydów tkanki tłuszczowej uwalniają się do osocza wolne kwasy tłuszczowe (FFA). Łączą się one z albuminami i w tej formie transportowane są we krwi. Czas półtrwania FFA osocza wynosi zaledwie kilka minut. W czasie głodzenia FFA mogą pokryć prawie cał-

kowiecie zapotrzebowanie kaloryczne. Po posiłkach mała część FFA jest bezpośrednio zużytkowana, natomiast większa ilość zostaje wychwycona przez wątrobę. Tutaj FFA są rozmaicie zużywane: część zostaje utleniona, część zmagazynowana jako trójglicerydy, fosfolipidy lub estry cholesterolu; pewien odsetek (duży w czasie głodzenia lub przy niedoborze insuliny) przekształcony jest w ciała ketonowe. Wreszcie część FFA zostaje po przekształceniu w trójglicerydy wbudowana w lipoproteidy. Lipoproteidy mogą być zużywane przez różne tkanki (po zadziałaniu lipazy lipoproteidowej), ale część z nich dociera z powrotem do tkanki tłuszczowej. Przedstawia to schematycznie rysunek 2.

Wszystko to wskazuje, że rozkład trójglicerydów w tkance tłuszczowej jest procesem prostej lipolizy, a nie ma dowodów na istnienie mechanizmów rozkładu obejmujących inne akceptory niż woda.

Podczas inkubacji tkanki tłuszczowej szczura uwalniają się zarówno wolne kwasy tłuszczowe (FFA) jak i glicerol. Glicerol uwalnia się jednak także w warunkach, w których FFA są wychwytywane na przykład w czasie inkubacji tkanki tłuszczowej w roztworze glukozy (29). Wskazuje to, że lipoliza przebiega nawet przy równoczesnej syntezie trójglicerydów (rysunek 3).



Rys. 3. Schemat dróg dopływu substratów i uwalniania produktów przemian w komórce tkanki tłuszczowej

Ostatnie badania (35) wykazały, że procesy lipolityczne w komórkach tkanki tłuszczowej zależą od aktywności co najmniej trzech enzymów. Są to: lipaza, której aktywność zależy od stężenia cyklicznego 3',5'-AMP, cyklaza adenylova — wytwarzająca cykliczny 3',5'-AMP, stymulowana przez katecholaminy (na przykład noradrenalinę) oraz fosfodwuesteraza — unieczynnająca cykliczny 3',5'-AMP; enzym ten hamowany jest przez teofilinę.

Absolutna szybkość uwalniania glicerolu nie zmienia się w wyrażniejszy sposób w obecności glukozy w środowisku (59), ale insulina w pewnych warunkach wydaje się ją zmniejszać (23). Hormony stymulujące uwalnianie FFA *in vitro* stymulują jednocześnie produkcję

glicerolu (29, 61). Wykazano, że aktywują one układ lipazy wrażliwej na hormony. Synteza i rozkład trójglicerydów tkanki tłuszczowej kontrolowana jest nie tylko przez hormony. Duży wpływ wywiera także układ nerwowy i dostępność substratów (regulacja metaboliczna). Czynniki te zostaną kolejno omówione.

#### IV. Regulacja metaboliczna

$\alpha$ -fosfoglicerol jest niezbędnym akceptorem „zrębu”, na którym magazynowane są kwasy tłuszczowe. Ponieważ nawet w stanie równowagi stwierdza się ciągłą minimalną szybkość lipolizy, musi także zachodzić ciągła dostawa  $\alpha$ -fosfoglicerolu lub jego prekursorów. W normalnych warunkach tkanka tłuszczowa zawiera bardzo małe zasoby glikogenu, a ilość gotowego  $\alpha$ -fosfoglicerolu jest jeszcze mniejsza i nie przekracza 0,2 mola/g (38). Zapotrzebowanie na  $\alpha$ -fosfoglicerol pokrywane jest przez glukozę dostarczaną z krwi. Jeśli jednak to minimalne zapotrzebowanie nie jest zaspokojone a lipoliza zachodzi nadal, musi dojść do uwalniania FFA do krwi z szybkością równą różnicy między szybkością lipolizy a estryfikacji.

Tkanka tłuszczowa pobrana od głodzonych zwierząt i inkubowana *in vitro* uwalnia FFA do środowiska. Podanie zwierzęciu glukozy przed pobraniem wycinka lub dodanie glukozy do środowiska nie tylko hamuje to uwalnianie, ale może nawet spowodować pobieranie FFA przez tkankę. Badania nad zmianami poziomu FFA oraz szybkością pobierania znakowanych FFA wykazały, że glukoza intensywnie pobudza wcielanie FFA do trójglicerydów (2). Z drugiej strony dodanie glukozy (samej lub z insuliną) w bardzo małym stopniu wpływa na szybkość wytwarzania glicerolu (33, 59). Nie wiadomo jeszcze, czy insulina działa na mechanizmy transportu FFA przez błonę komórkową czy też wpływa bezpośrednio na lipazę tkanki tłuszczowej. Wydaje się, że glukoza i insulina głównie przyspieszają estryfikację glicerydów, a nie wpływają na szybkość lipolizy. Jednakże ostatnio wykazano (34), że przy całkowitym braku glukozy insulina wywiera wpływ również na lipolizę, stwierdzono na przykład, że fizjologiczne poziomy insuliny mogą hamować lipazę lipoproteidową w tych warunkach (56). Przy braku glukozy insulina wywiera także inne efekty metaboliczne na poziomie tkanki tłuszczowej. Krahl (25) wykazał, że insulina stymuluje wówczas wcielanie znakowanego kwasu pirogronowego i octowego w białka, a Barrnett i Ball (3) stwierdzili zmiany cytologiczne przypominające pinocytozę. Wychwytywanie fruktozy przez tkankę tłuszczową pod wpływem insuliny nie jest prostym odbiciem nasilenia transportu tego cukru przez błonę komórkową (31). Reasumując insulina wpływa na mobilizację

tłuszczu aktywując transport glukozy przez błonę komórkową (45). Wpływ insuliny na lipogenezę przedstawiono w uproszczony sposób na rysunku 4.



Rys. 4. Wpływ insuliny na lipogenezę

Podobny do insuliny wpływ na zużytkowanie glukozy przez tkankę tłuszczową wywierają oksytocyna, RNA, protamina i kwas nikotynowy. Oprócz oksytocyny substancje te nie wpływają na wbudowywanie aminokwasów w białka. Oksytocyna różni się tym od insuliny w działaniu na tkankę tłuszczową, że nie aktywuje syntezy białek przy braku glukozy lub kwasu pirogronowego (26).

Insulina działa na metabolizm trójglicerydów umożliwiając zużytkowanie glukozy, z drugiej jednak strony wpływ glukozy nie ogranicza się tylko do dostępności lub braku tego substratu. Istnieją dowody, że poziom glukozy we krwi wpływa na uwalnianie FFA za pośrednictwem autonomicznego układu nerwowego. Wiadomo od kilku lat, że wstrzyknięcie glukozy do tętnicy szyjnej lub w okolicy podwzgórza u kota wywołuje natychmiastowe zmniejszenie wydzielania katecholamin przez rdzeń nadnerczy (15). Ostatnio wykazano (19), że dożylnie wstrzyknięcie małych ilości glukozy hamuje lipolizę i wyraźnie obniża stężenia FFA.

## V. Mobilizacja trójglicerydów

Na uwalnianie FFA wpływa tak wiele czynników hormonalnych, że nieprawdopodobne jest aby wszystkie one odgrywały istotną rolę w procesie lipolizy. Uwalnianie FFA stymulują następujące czynniki: adrenalina, noradrenalina, glukagon, kortykotropina, tyreotropina, gonadotropina, przysadkowa „frakcja H”, peptyd I i II Astwooda, „czynnik Chalmersa”, hormon wzrostu, intermedyna, trójjodotyronina oraz glikokortykoidy (50). Lista czynników lipolitycznych ciągle rośnie i staje się chyba oczywiste, że część z nich działa poprzez wspólny mechanizm, inne zaś mogą wywierać tylko działanie wspomagające.

Jednym z najsilniejszych czynników lipolitycznych są katecholaminy,



które działają bezpośrednio na mobilizację trójglicerydów. Pierwszego dowodu zwiększenia szybkości lipolizy pod wpływem adrenaliny dostarczyli L e b o e u f i wsp. (29). Podanie adrenaliny ludziom lub zwierzętom doświadczalnym wywołuje szybki choć krótkotrwały wzrost poziomu FFA w osoczu. Również *in vitro* w skrawkach lub homogenatach tkanki tłuszczowej adrenalina stymuluje szybkie uwalnianie FFA do środowiska. Uwalnianiu FFA towarzyszą inne efekty metaboliczne, wśród nich zwracało uwagę przede wszystkim zmniejszenie szybkości wbudowywania znakowanych FFA w trójglicerydy (54). Zjawiska tego nie można było tłumaczyć rozcieńczeniem znakowanych FFA, ponieważ zachodzi ono także podczas inkubacji w dużym stężeniu FFA, gdy specyficzna radioaktywność FFA w środowisku praktycznie jest stała. D o l e (14) wykazał jednak (uwzględniając poprawkę na zmiany specyficznej radioaktywności FFA środowiska), że adrenalina wpływa na estryfikację. Podobnie jak inne hormony lipolityczne (ACTH i TSH) adrenalina zwiększa szybkość estryfikacji (60). Aktywacja lipolizy jest jednak większa, co w ostatecznym efekcie daje uwalnianie FFA.

Do innych zjawisk towarzyszących uwalnianiu FFA z tkanki tłuszczowej pod wpływem adrenaliny należą: zmniejszenie szybkości wbudowywania znakowanego kwasu octowego w trójglicerydy (44), wzrost aktywności lipazy wrażliwej na hormony (47), wzrost aktywności fosforylasy (58), prawdopodobnie związany z pobudzeniem syntezy cyklicznego 3',5'-AMP. a także zwiększenie pobierania i utleniania glikozy, czemu towarzyszy stosunkowo większa szybkość utleniania w cyklu pentozowym (9).

Jak z tego widać działanie adrenaliny nie da się wytłumaczyć aktywacją jednego mechanizmu. Z pewnością nie jest to prosta zależność hormon — enzym i wpływ adrenaliny obejmuje zarówno zmiany organizacji metabolicznej komórki jak i mechanizmy transportowe. Działanie noradrenaliny na tkankę tłuszczową nie różni się w zasadzie od działania adrenaliny, a według niektórych autorów jest nawet nieco silniejsze (42).

Fakt, że adrenalina i glukagon wywierają podobne działanie na metabolizm glukozy skłonił do porównania wpływu tych hormonów na tkankę tłuszczową. Wykazano, że glukagon *in vitro* stymuluje uwalnianie FFA, aktywuje fosforylase i zwiększa pobieranie glukozy przez tkankę tłuszczową. Uwalnianiu FFA towarzyszy (podobnie jak po dodaniu adrenaliny) zmniejszenie szybkości estryfikacji. W doświadczeniach *in vitro* podanie glukagonu prowadzi do obniżenia poziomu FFA w osoczu — związane jest to z hiperglikemią na skutek uruchomienia glikogenu wątrobowego. Jeśli maskujący wpływ hiperglikemii przestaje działać, dochodzi do wzrostu poziomu FFA.

W h i t e i E n g e l (66) pierwsi wykazali, że ACTH ma zdolność uwalniania FFA ze skrawków tkanki tłuszczowej. Te doświadczenia *in vitro*

wymagały jednak dużych dawek hormonu. Podobne ilościowo uruchomienie FFA można osiągnąć *in vivo* stosując mniejsze dawki ACTH. Prawdopodobnie ujawnia się wówczas działanie glikokortykoidów (patrz niżej). Podobnie jak adrenalina i glukagon, ACTH hamuje syntezę trójglicerydów i zmniejsza szybkość wbudowywania kwasu palmitynowego i pirogronowego w glicerydy. Od pewnego czasu wiadomo, że przysadka reguluje mobilizację trójglicerydów na drodze niezależnej od wpływu na wydzielanie nadnerczy. Wykazano, że oczyszczone preparaty hormonu wzrostu mogą stymulować uwalnianie FFA z tkanki tłuszczowej *in vitro* i *in vivo* (66). Doświadczenia *in vivo* wymagają stosunkowo mniejszych dawek hormonu. Prace Goodmana (17) dowiodły, że hormon wzrostu zmienia metabolizm glukozy w tkance tłuszczowej. W około 30 min. po podaniu hormonu zwiększało się pobranie glukozy, utlenianie do CO<sub>2</sub> i synteza kwasów tłuszczowych. Po godzinie takie działanie hormonu wzrostu zmniejszało się, a po 3,5 godz. obserwowano wręcz przeciwne zjawisko: pobieranie glukozy i synteza kwasów tłuszczowych były zmniejszone (18). Wystąpieniu takiego późnego działania hormonu wzrostu zapobiega podanie aktynomycyny D. Ostatnio uzyskano dane wyjaśniające wczesne „insulinopodobne” działanie hormonu wzrostu. Hormon ten uwalnia insulinę z kompleksów białkowych i umożliwia w ten sposób jej działanie metaboliczne (68).

Kortykosterydy i hormony tarczycy wpływają pośrednio na lipolizę. Wpływ adrenaliny na mobilizację FFA jest wyraźnie zahamowany po usunięciu nadnerczy u psów i szczurów. Normalną reakcją na adrenalinę można przywrócić podając zwierzętom kortyzony w dawkach, które bez adrenaliny nie wpływają na poziom FFA. Podobne wyniki uzyskiwano u zwierząt po usunięciu przysadki. Wykazano dalej, że tkanka tłuszczowa pobrana od szczurów pozbawionych nadnerczy ale otrzymujących iniekcje adrenaliny, uwalnia FFA ze znacznie mniejszą szybkością niż tkanka pobrana od normalnych zwierząt, otrzymujących takie same iniekcje adrenaliny. Reakcja tkanki tłuszczowej na adrenalinę jest znacznie słabsza jeśli tkankę pobrano od szczura pozbawionego nadnerczy; reakcja była natomiast prawidłowa kiedy szczury po usunięciu nadnerczy otrzymywały kortyzon. Nie wiadomo w jaki sposób glikokortykoidy umożliwiają maksymalną reakcję tkanki tłuszczowej na katecholaminy. Niektórzy autorzy wiążą działanie kortykoidów z zahamowaniem transportu glukozy przez błonę komórkową.

Podobne działanie można prawdopodobnie przypisywać hormonom tarczycy. Znane jest zjawisko podwyższonego poziomu FFA w osoczu u chorych z nadczynnością tarczycy. Podawanie zdrowym ludziom trójjodotyroniny prowadzi do stopniowego wzrostu poziomu FFA. U małych pozbawionych przysadki podanie adrenaliny wywołuje niewielki wzrost FFA osocza, a prawidłową reakcją przywraca dopiero podanie TSH lub trójjodotyroniny, natomiast, co należy podkreślić, kortyzol i ACTH nie

przywracają prawidłowego oddziaływania na adrenalinę. Tkanka tłuszczowa szczurów otrzymujących trójiodotyroninę uwalnia FFA z większą szybkością niż u szczurów kontrolnych; preparaty tkanki tłuszczowej tych szczurów wykazywały wybitnie nasiloną reakcję na adrenalinę. Tkanka tłuszczowa pobrana od szczurów otrzymujących propylotiouracyl uwalnia FFA znacznie wolniej i prawie nie reaguje na adrenalinę. Deykin i Vaughan (13) wykazali, że przy niewrażliwości na adrenalinę obserwuje się zarówno wzrost lipolizy jak i estryfikacji. Dodanie trójiodotyroniny do tkanki tłuszczowej *in vitro* nie wpływa na uwalnianie FFA. Nie ustalono, czy przyspieszenie lipolizy po podawaniu hormonów tarczycy jest odbiciem ich bezpośredniego działania, czy też działają one poprzez katecholaminy.

Ważnym, choć nie docenionym czynnikiem w mobilizacji glicerydów jest przepływ krwi, a raczej osocza (główna część sinusoidów tkanki tłuszczowej wydaje się być perfundowana tylko przez osocze) przez tkankę tłuszczową. Rotbell (48) stwierdził, że uwalnianie FFA pod wpływem ACTH w homogenatach tkanki tłuszczowej zachodzi prawie dziesięciokrotnie szybciej niż w skrawkach tej tkanki. Jest to wynikiem większej dostępności albumin do powierzchni wolnych komórek. Albuminy — wychwytyjąc i transportując FFA — są niezbędne do efektywnej lipolizy. Jeśli dostępność albumin zwiększa działanie czynnika lipolitycznego dziesięciokrotnie, to szybkość docierania albumin do komórek tkanki tłuszczowej może być jednym z głównych czynników kontrolujących uwalnianie FFA — a wtórnie rozkład trójglicerydów. Stąd prosty wniosek, że przepływ osocza ma podstawowe znaczenie w mobilizacji FFA. Ponieważ zakończenia nerwów sympatycznych w tkance tłuszczowej znajdują się tylko w pobliżu małych naczyń krwionośnych (67), to nie jest wykluczone, że wpływ układu sympatycznego na mobilizację trójglicerydów zależy przede wszystkim od regulacji przepływu krwi.

#### LITERATURA

1. Anderson R. L., Tove S. B., *J. Nutr.* **84**, 244 (1964).
2. Bally P. R., Cahill C. F., Jr., Leboeuf B., Renold A. E., *J. Biol. Chem.* **235**, 3 (1960).
3. Barnett R. J., Ball E. G., *Am. J. Clin. Nutr.* **8**, 666 (1960).
4. Bezman A., Felta J. M., Havel R. J., *J. Lipid. Res.* **3**, 423 (1962).
5. Bressler R., Wakil S. J. *J. Biol. Chem.* **236**, 1643 (1961).
6. Bressler R., Wakil S. J., *J. Biol. Chem.* **237**, 1441 (1962).
7. Bressler R., Katz R. J., *J. Clin. Invest.* **44**, 840 (1965).
8. Brockerhoff H., Hoyle R. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 54 (1963).
9. Cahill G. F., Jr., Jeanrenaud B., Leboeuf B., Renold A. E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **82**, 403 (1959).
10. Cahill G. F., Jr., Leboeuf B., Renold A. E., *Am. J. Clin. Nutr.* **8**, 733 (1960).

11. Coleman M. H., *J. Am. Oil. Chemists Soc.* **40**, 568 (1963).
12. Desnuelle P., Savary P., *J. Lipid Res.*, **4**, 369 (1963).
13. Deykin D., Vaughan M., *J. Lipid Res.* **4**, 200 (1963).
14. Dole V. P., *J. Biol. Chem.* **236**, 3121 (1961).
15. Duner H., *Acta Physiol. Scand.* **102**, (suppl.) 7 (1953).
16. Goldman P., Alberts A. W., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **238**, 1255 (1963).
17. Goodman H. M., *Endocrinology* **76**, 216 (1965).
18. Goodman H. M., *Endocrinology* **76**, 1134 (1965).
19. Goodner C. J., Tustison W. A., *Science* **146**, 770 (1964).
20. Goransson G., *Biochem. J.* **92**, 41P (1964).
21. Hollenberg C. H., Angel A., *Am. J. Physiol.* **205**, 909 (1963).
22. Hsu R. Y., Wassen G., Porter J. W., *Federation Proc.* **24**, 291 (1965).
23. Jungas R. L., Ball E. G., *Federation Proc.* **21**, 202 (1962).
24. Kornacker M. S., Lowenstein J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 490 (1964).
25. Krahl M. E., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 556 (1959).
26. Krahl M. E., *Am. J. Physiol.* **207**, 1169 (1964).
27. Lands W. E. M., Hart P., *J. Lipid Res.* **5**, 81 (1964).
28. Larrabee A. R., Mc Daniel E. G., Balerman H. A., Vagelos P. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 267 (1965).
29. Leboeuf B., Flinn R. B., Cahill G. F., Jr., *Proc. Soc. Exptl. Biol. N. Y.* **102**, 527 (1959).
30. Lennarz W. J., Light R. J., Bloch K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 840 (1962).
31. Leonards J. R., Landau B. R., *Endocrinology* **74**, 142 (1964).
32. Lynen F., Tada M., *Angew. Chem.* **73**, 513 (1961).
33. Lynen F., Matsushashi M., Numa S., Schweizer E., w Control of Lipid Metabolism, Academic Press, 1963, str. 43.
34. Mahler R., Stafford W. S., Tarrant M. E., Ashmore J., *J. Diabetes* **13**, 297 (1964).
35. Maickel R. P., Daviers J. I., Weiss B., *Federation Proc.* **24**, 299 (1965).
36. Majerus P. W., Alberts A. W., Vagelos P. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 410 (1965).
37. Mallev S., *Criculat. Res.* **14**, 357 (1964).
38. Margolis S., Vaughan M., *J. Biol. Chem.* **237**, 44 (1962).
39. Martin D. B., Herning M. G., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **236**, 663 (1961).
40. Martin D. B., Vagelos P. R., w Handbook of Physiology. Część V — Adipose Tissue, Waverley Press Inc., Baltimore, 1965, str. 211.
41. Mc Mahon V., Stumpf P. K., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 359 (1964).
42. Mosinger B., Kuhn E., Kujaleva V., *J. Lab. Clin. Med.* **66**, 380 (1965).
43. Nestel P. J., *J. Clin. Invest.* **43**, 953 (1964).
44. Orth R. D., Odell W. D., Wolliams R. H., *Am. J. Physiol.* **198**, 640 (1960).
45. Renold A. E., Crofford O. B., Stauffacher W., Jeanrenaud B., *Diabetologia* **1**, 4 (1965).
46. Rittenberg D., Schoenheimer R., *J. Biol. Chem.* **121**, 233 (1937).
47. Rizack M. A., *Federation Proc.* **19**, 221 (1960).
48. Rodbell M., *J. Biol. Chem.* **239**, 375 (1964).
49. Rossi C. R., Gibson D. M., *J. Biol. Chem.* **239**, 1964 (1964).
50. Rudman D., *J. Lipid Res.* **4**, 119 (1963).
51. Savary P., Desnuelle P., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 319 (1961).
52. Scheverbrandt G., Goldfine H., Baronwsky P. E., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **236**, PC 70 (1961).

53. Spitzer J. J., Gold M., *Am. J. Physiol.* **206**, 159 (1964).
54. Steinberg D., Vaughan M., Margolis S., *J. Biol. Chem.* **235**, PC 38 (1960).
55. Steinberg D., Vaughan M., Margolis S., *J. Biol. Chem.* **236**, 1931 (1961).
56. Tarrant M. E., Mahler J., *J. Biol. Chem.* **239**, 1714 (1964).
57. Tove S. B., *J. Nutr.* **75**, 361 (1961).
58. Vaughan M., *J. Biol. Chem.* **235**, 3049 (1960).
59. Vaughan M., *J. Biol. Chem.* **237**, 3354 (1962).
60. Vaughan M., Steinberg D., *J. Lipid Res.* **4**, 193 (1963).
61. Vaughan M., Steinberg D., *Federation Proc.* **22**, 303 (1963).
62. Wakil S. J., Ganguly J., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 2597 (1959).
63. Wakil S. J., Bressler R., *J. Biol. Chem.* **237**, 687 (1962).
64. Wakil S. J., Pugh E. L., Sauer F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 106 (1964).
65. Wertheimer E., Shapiro B., *Physiol. Rev.* **28**, 451 (1948).
66. White J. E., Engel F. L., *J. Clin. Invest.* **37**, 1556 (1958).
67. Wirsen C., *Nature* **202**, 913 (1964).
68. Young J. D., George E. P., *Nature* **203**, 1134 (1965).



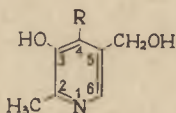
LEOKADIA JAROSZEWICZ\*

## Reakcje katalizowane przez fosforan pirydoksalu

### Reactions Catalyzed by Pyridoxal Phosphate

Recent data on pyridoxal phosphate dependent reactions are reviewed and the mechanism of the catalysis by this substance in enzymatic and non enzymatic systems is discussed.

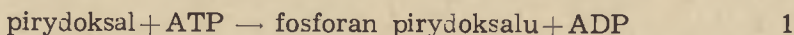
Znajdujący się w kompleksie witamin B czynnik, którego brak powoduje akrodynię szczurzą, wyodrębniono w czystej krystalicznej postaci w 1938 r. (53, 85, 94). W następnym roku K u h n wraz z zespołem badaczy z firmy *Merck* określili jego budowę, po czym związek ten otrzymano syntetycznie (89). K u h n zaproponował dla witaminy B<sub>6</sub> nazwę adermina; w Stanach Zjednoczonych przyjęła się natomiast nazwa pirydoksyna, ponieważ czynnik ten jest pochodną pirydyny zawierającą grupy hydroksylową i hydroksymetylenową. Do grupy witamin B<sub>6</sub> należą trzy związki (rysunek 1), z których dwa, pirydoksal (PAL) i pirydoksamina



Rys. 1. Ogólny wzór witamin grupy B<sub>6</sub>.

R — -CH<sub>2</sub>OH — pirydoksyna, -CHO — pirydoksal, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> — pirydoksamina

(PAM) występują w przyrodzie w postaci odpowiednich fosforanów (PALP, PAMP). Badania nad wpływem witamin grupy B<sub>6</sub> na wzrost mikroorganizmów doprowadziły do bliższego poznania mechanizmu ich działania. Związkiem centralnym jest pirydoksal, który może przechodzić bądź to w pirydoksol, bądź też w pirydoksaminę. Formą czynną są estry fosforanowe pirydoksalu bądź pirydoksaminy, powstające w reakcji przeniesienia reszty kwasu fosforowego z ATP na pierwszorzędową grupę alkoholową przy węglu C<sub>5</sub> rdzenia pirydynowego.



Reakcja transfosforylacji (reakcja 1) jest katalizowana przez kinazę pi-

\* Dr, adiunkt Katedry Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku.

Wykaz stosowanych skrótów: PAL — pirydoksal; PALP — fosforan pirydoksalu; PAM — pirydoksamina; PAMP — fosforan pirydoksaminy.

rydoksalu (65). Enzym ten katalizuje również fosforylację pirydoksaminy i szeregu analogów witaminy B<sub>6</sub>. PALP i PAMP grają zasadniczą rolę w metabolizmie azotowym wszystkich organizmów uczestnicząc w enzymatycznej katalizie różnych przemian aminokwasów.

### I. Teoria nieenzymatycznych i enzymatycznych reakcji katalizowanych przez fosforan pirydoksalu

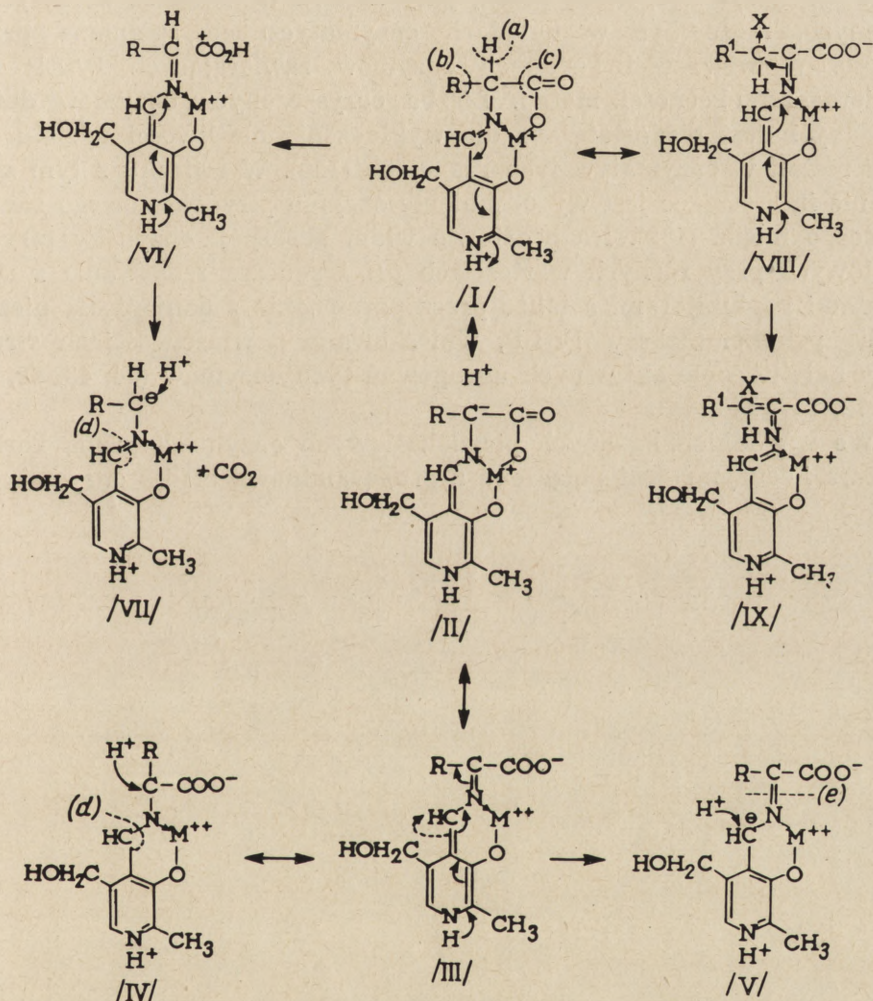
Snell, Metzler i inni (106, 107, 108, 112, 113, 115, 150) wyjaśnili udział PALP w nieenzymatycznych reakcjach transaminacji, których mechanizm omówiono w *Postęпах Biochemii* (132). PALP w obecności jonów metali katalizuje także racemizację aminokwasów (126)), dehydratację seryny i treoniny (109), odwracalny rozpad seryny do glicyny i formaldehydu (109, 110) i treoniny (lub alloteoniny) do glicyny i aldehydu octowego (19, 80), syntezę tryptofanu z seryny i indolu (106) i szereg innych reakcji. A więc PAL lub PALP w odpowiednich warunkach *in vitro* katalizuje szereg reakcji aminokwasów, które *in vivo* są katalizowane przez enzymy zawierające PALP.

Katalizowanie przez PAL nieenzymatycznych reakcji pozwoliło na zbadanie jego strukturalnych cech niezbędnych dla reakcji transaminacyjnych. Heterocykliczny azot, grupa formylowa i grupa fenolowa są konieczne dla przegrupowań przestrzennych katalizowanych przez pirydoksal lub elektronowo równoważny związek, 2-formylo-3-hydroksypirydynę. Podobną funkcję, jak heterocykliczny azot pierścienia pirydynowego spełniać może także grupa nitrowa aldehydu 4-nitrosalicylowego, co wskazuje, że cechą warunkującą katalityczną aktywność tych grup jest ich silnie elektroujemny charakter (106). Grupa hydroksymetylowa w położeniu 5 nie jest niezbędna dla modelowej reakcji, jednak ma ona wielkie znaczenie fizjologiczne jako miejsce wiązania fosforanu (24). Wyniki badań nad mechanizmem pirydoksalowej katalizy przedstawili niezależnie od siebie Metzler i wsp. (107) oraz Braunstein i Szemiakin (20). Według tych badaczy na skutek kondensacji PAL z aminokwasem powstaje związek typu zasady Schiffa w wyniku czego zachodzi przesunięcie elektronów z wiązań otaczających  $\alpha$ -atom węgla aminokwasu w kierunku elektrofilnego atomu azotu PAL (Rysunek 2 (I)). Wiązania otaczające  $\alpha$ -atom węgla zostają osłabione i aminokwas zostaje w ten sposób „zaktywowany” dla szeregu reakcji, które mogą przebiegać w układach enzymatycznych i nieenzymatycznych. Struktura aminokwasów, pH, siła jonowa i obecność różnych czynników (jony metali, apoenzymy) warunkuje poszczególne reakcje. Duża liczba reakcji katalizowanych przez PAL przebiega w wyniku osłabienia wiązania  $\alpha$ -atomu węgla aminokwasów z atomem wodoru (wiązanie a, rysunek 2), na przykład transaminacja, racemizacja, dehydratacja,  $\alpha$ -aminokwasów



itp. Inne reakcje związane są z rozpadem wiązania z grupą karboksylową (wiązanie c, rysunek 2 (I)), bądź z grupą R (wiązanie b, rysunek 2 (I)). Metzler i wsp. (106) podają mechanizm reakcji katalizowanych przez PAL przedstawiony na rysunku 2.

Racemizacja przebiega drogą: (I)  $\leftrightarrow$  (II)  $\leftrightarrow$  (III)  $\leftrightarrow$  (IV); transaminacja: (I)  $\leftrightarrow$  (II)  $\leftrightarrow$  (III)  $\leftrightarrow$  (V);  $\alpha$ -dekarboksylacja: (I)  $\rightarrow$  (VI)  $\rightarrow$  (VII); eliminacja  $\beta$ -podstawnika: (I)  $\leftrightarrow$  (VIII)  $\rightarrow$  (IX).



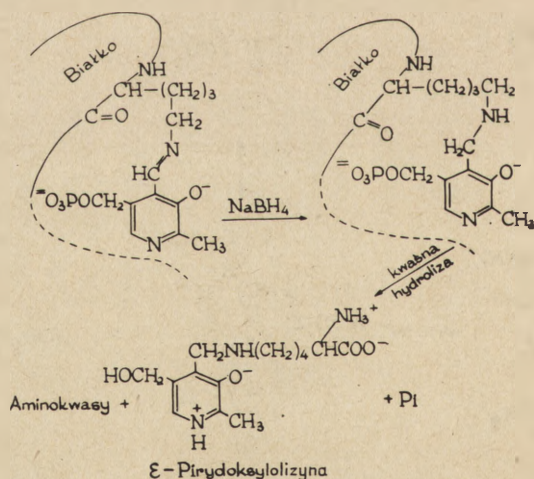
Rys. 2. Mechanizm reakcji katalizowanych przez PAL (106).

W układach nieenzymatycznych reakcję między PAL i aminokwasem znacznie przyspiesza dodanie odpowiednich jonów metali ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ). Obecność metalu wpływa prawdopodobnie na powstawanie zasady Schiffa, która tworzy się przez kondensację jednej lub dwu

cząsteczek witaminy B<sub>6</sub> i aminokwasu. Tego rodzaju chelatowane azometyny wyodrębnił B adiley (9), a później inni badacze (31, 131). Za pomocą metod elektroforetycznych i chromatograficznych Fesella i inni (11, 106) wykazali powstawanie tautomerycznych azometinowych chelatów w przebiegu nieenzymatycznej transaminacji i zbadali kinetykę procesów pośrednich.

Dane dotyczące udziału metali w reakcjach enzymatycznych katalizowanych przez PAL są sprzeczne. Postulowano niejednokrotnie (20, 57, 106), że funkcja, którą pełnią jony metalu w układach nieenzymatycznych, może być w układach enzymatycznych spełniana przez białko. W większości badanych enzymów zawierających PALP nie stwierdzono obecności metali. Liczba oczyszczonych enzymów dotąd zbadanych jest niedostateczna dla wykluczenia możliwości udziału jonów metali w enzymatycznych reakcjach (150). W związku z tym szczególnie interesujące jest wyodrębnienie enzymu pirydoksalowego zawierającego miedź (182). Na podstawie widm absorpcji enzymów pirydoksalowych przy różnych wartościach pH i podczas reagowania z substratami i inhibitorami a także przez porównanie z danymi dla niebiologicznych kompleksów PALP, wnioskowano o właściwościach struktury katalitycznie aktywnych ugrupowań tych enzymów (24, 43, 69, 70, 71, 72, 147, 148).

We wszystkich badanych pirydoksalowych enzymach grupa karbonylowa koenzymu jest połączona z grupą aminową białka enzymatycz-

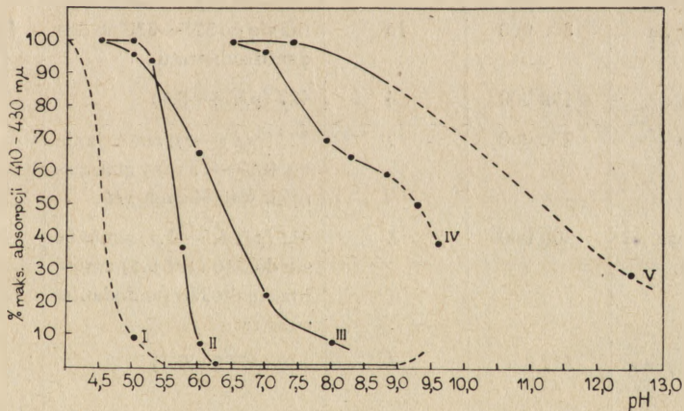


Rys. 3. Wyodrębnienie  $\epsilon$ -pirydokeylolizyny z enzymów pirydoksalowych (63).

nego azometinowym wiązaniem. Naturę iminowego wiązania między PALP i różnymi jego apoenzymami wyjaśnili Fischer i wsp. (43). Z krystalicznej fosforylasy i wysoko oczyszczonych preparatów cystanazy i transaminazy glutaminowo-asparaginianowej po działaniu bo-

rowodorkiem sodu ( $\text{NaBH}_4$ ) i kwaśnej hydrolizie wyodrębniono  $\epsilon$ -pirydoksylozynyę (rysunek 3). Wiązanie aldiminowe pomiędzy PALP i grupą  $\epsilon$ -aminową lizyny apoenzymu jest wspólną cechą wszystkich badanych dotąd enzymów pirydoksalowych. Badania nad enzymatyczną hydrolizą transaminazy glutaminowo-asparaginianowej pozwoliły wyizolować zawierający resztę pirydoksylozyny peptyd o strukturze: Ser. Tre. Glu. (Asp, Gli, Ala, Wal, Ileu,  $\epsilon$ -pirydoksylozyna, Liz). Gli. Ser. Asp. Fen.

Proces powstawania aldimin (zasad Schiffa), które są zasadniczymi pośrednikami w reakcjach katalizowanych przez enzymy pirydoksalowe jest bardzo szybki. Dokładniej poznano go w przypadku transaminazy asparaginianowej (58, 71, 74, 165, 166). Niektóre enzymy pirydoksalowe zachowują się jak wskaźniki  $\text{pH}$ . Występują one w żółtej „kwaśnej” formie przy  $\text{pH} \leq 5$  i ze wzrostem  $\text{pH}$  przechodzą stopniowo w bezbarwną z maksimum absorpcji między 315 i 365  $\text{m}\mu$ . Katalityczną aktywność w pewnych przypadkach wykazuje forma żółta, na przykład dekarboksylazy kwasu glutaminowego (147), w innych bezbarwna, na przykład transaminazy asparaginianowej (69, 70). Krzywe zmian maksimum absorpcji tych enzymów w zależności od  $\text{pH}$  mają różne położenie i nachylenie i wykazują charakter krzywych dysocjacji. Pozwalają one na ustalenie wartości  $\text{pK}$  i liczby dysocjujących protonów (rysunek 4).



Rys. 4. Zmiany maksimum absorpcji enzymów pirydoksalowych w widzialnej części widma (410—430  $\text{m}\mu$ ) w zależności od  $\text{pH}$  (— — — — zmiany nieodwracalne),

I — fosforylaza (43), II — dekarboksylaza kwasu glutaminowego (146, 147), III — transaminaza asparaginianowa (70, 71, 72), IV — transaminaza alaninowa (160), V — cystotonaza (102).

W żółtych „kwaśnych” formach enzymów maksimum pochłaniania w zakresie od 410 do 430  $\text{m}\mu$  jest uwarunkowane obecnością związanej z białkiem PALP zasady Schiffa, stabilizowanej wiązaniem wodorowym między hydroksylem fenolowym i iminowym atomem azotu (69, 70). Wskutek dysocjacji w bardziej zasadowym środowisku powstaje zwią-

zek o nieustalonej dokładnie strukturze mający maksimum pochłaniania w zakresie między 315 i 365 m $\mu$ . Zasluguje na uwagę fakt, że widmo niektórych pirydoksalowych enzymów, na przykład cystationazy (102), nie zmienia się w szerokim zakresie *pH*. Aktywność wielu enzymów pirydoksalowych jest hamowana przez związki reagujące z grupą aldehydową PALP, na przykład przez cyjanki, kwaśne siarczki, hydroksyloaminę, komponenty sulfhydrylowe, aminy, aminokwasy i hydrazydy. Skuteczność działania inhibitora zależy w dużej mierze od natury wiązania PALP z białkiem enzymatycznym. Enzymy pirydoksalowe różnią się znacznie własnościami absorpcyjnymi, ciężarami cząsteczkowymi i ilością cząsteczek koenzymu (tablica 1).

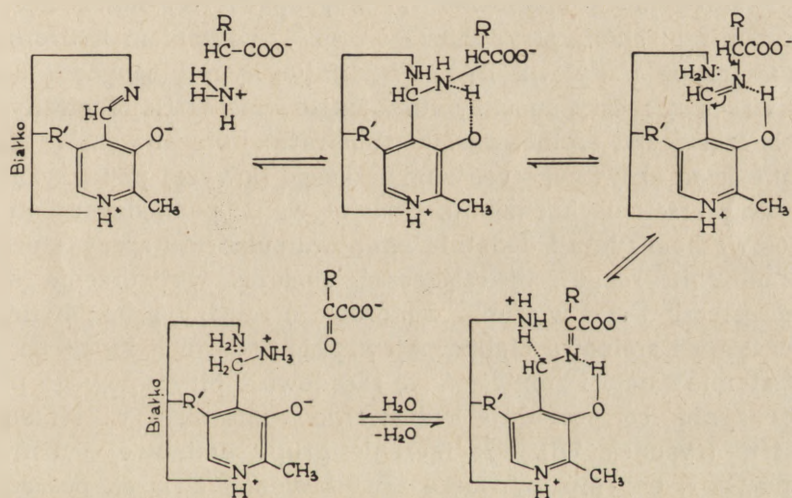
Tablica 1

Niektóre własności kilku znacznie oczyszczonych enzymów pirydoksalowych

| Enzym                                    | Ciężar cząsteczkowy | Ilość moli koenzymu na mol | Maksimum absorpcji  | Literatura         |
|--|---------------------|----------------------------|---|--------------------|
| Transaminaza glutaminowo-asparaginianowa | 110 000             | 2                          | 360 ( <i>pH</i> 8.4) zmienia się do 430 ( <i>pH</i> 5; <i>pK</i> 6.3) zmienia się do 355 po dodaniu substratu | 72                 |
| $\beta$ -dekarboksylaza asparaginianowa  | 800 000             | 16                         | 360—365 ( <i>pH</i> 5—9); zmienia się po 325—330 po dodaniu substratu   | 123, 124, 173, 174 |
| Cystationaza                             | 190 000             | 4                          | 427 ( <i>pH</i> 4—8.4)  | 102                |
| Fosforylaza <i>b</i>                     | 250 000             | 2                          | 333 ( <i>pH</i> 5—9); zmienia się do 400—415 przy granicznych wartościach <i>pH</i>                           | 43, 84             |
| Dekarboksylaza glutaminianu              | 300 000             | 2                          | 415 ( <i>pH</i> 4.5—5.1) zmienia się do 340 ( <i>pH</i> 6.5) zmienia się do 330 po dodaniu substratu          | 146, 147           |
| Hydroksymetylaza seryny                  | 331 000             | 4                          | 430 ( <i>pH</i> 5—9.7)  | 139                |

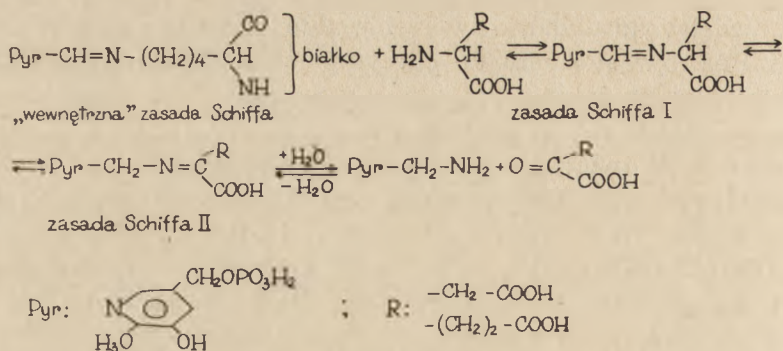
We wszystkich enzymach przedstawionych w tablicy 1 PALP połączony jest z  $\epsilon$ -aminową grupą białka tworząc związek typu zasady Schiffa, lecz właściwości absorpcyjne wskazują, że enzymy te muszą się znacznie różnić innymi wiązaniami między koenzymem i apoenzymem. Różnice te wpływają niewątpliwie na to, że w pewnych przypadkach produkty reakcji enzymu pirydoksalowego z odczynnikami na grupy karbonylowe odszczepiają się, a w innych przypadkach pozostają związane z enzymem.

W modelowym układzie tworzenia aldimin zwiększa się reaktywność PAL i PALP w stosunku do odczynników karbonylowych (32). Również aminokwasy łatwiej reagują z kompleksem transaminaza asparaginianowa-PALP niż z wolnym PAL (73). Bruice i Toppling (25) uważają, że tworzenie pośrednich związków (aldimin) i ich wzajemne przechodzenie w siebie zgodne jest z ogólnymi prawami katalizy kwas — zasada. Na podstawie tych danych i własnych obserwacji Snell (150) doszedł do wniosku, że schemat mechanizmu transaminacji powinien uwzględniać następujące dane: 1) iminowe wiązanie PALP, 2) większą skuteczność działania PALP związanego z białkiem niż wolnego, 3) brak katalitycznego wpływu jonów metali na reakcję enzymatyczną. Hipotetyczny schemat reakcji transaminacji (rysunek 5) przedstawia wiązanie aldiminowe PALP z białkiem, jego oddziaływanie z aminokwasem przez transaldiminację oraz przypuszczalny przebieg labilizacji i przenoszenia protonów.



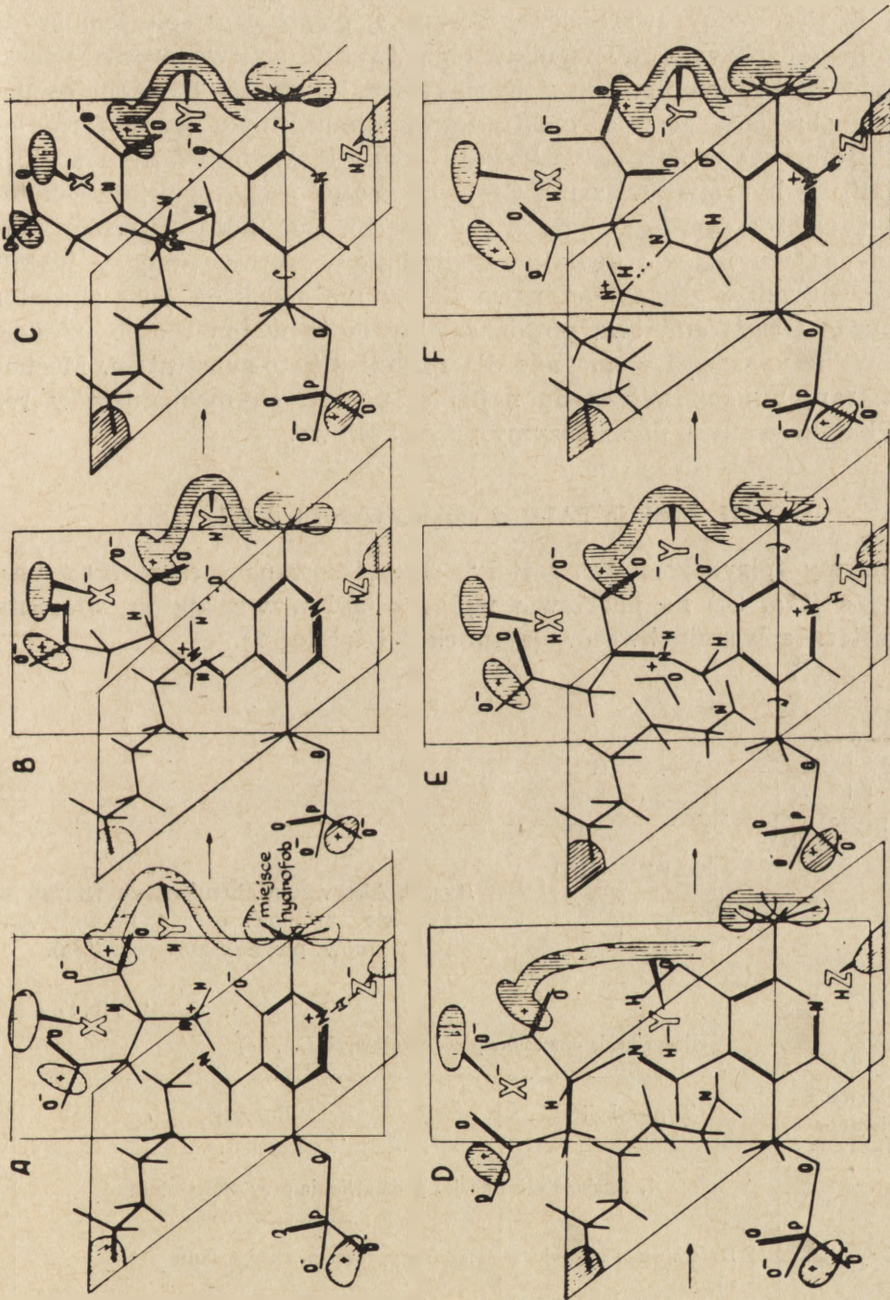
Rys. 5. Prawdopodobny mechanizm reakcji transaminacji (150a). Kompleks enzym-substrat powstaje na drodze transaldiminacji; bliskie położenie grup  $-NH_2$  i  $-NH_2^+$  ułatwia interkonwersję związków pośrednich.

Karpeysky i Ivanow (81) podali molekularny mechanizm enzymatycznej transaminacji, starając się wytłumaczyć rolę każdej grupy cząsteczki koenzymu i rolę białka enzymatycznego w tym procesie. Pierwszy etap reakcji transaminacji polega prawdopodobnie na transaldiminacji na skutek przekształcenia „wewnętrznej” zasady Schiffa PALP z lizyną apoenzymu w zasadę Schiffa I PALP z aminokwasem, (aldiminę), która ulega tautomerycznej przemianie w zasadę Schiffa II (ketiminę). W następnym etapie podwójne wiązanie w zasadzie Schiffa II na skutek hydrolizy zostaje rozerwane i powstaje ketokwas i enzym w formie pirydoksaminy (rysunek 6).



Rys. 6. Schemat reakcji transaminacji (81).

Początkowy stan przed interakcją enzymu z substratem przedstawia schematycznie rysunek 7A. Białko enzymatyczne połączone jest z koenzymem w czterech miejscach: 1) poprzez grupę  $\epsilon$ -aminową lizyny z grupą aldehydową koenzymu; 2) z grupą fosforanową koenzymu; 3) z azotem pierścienia pirydynowego oraz 4) wiązaniem hydrofobowym pomiędzy grupą metylową PALP i alifatycznym łańcuchem bocznym aminokwasowej reszty apoenzymu. Zjonizowana w fizjologicznych warunkach cząsteczka aminokwasów (substratu) związana jest z kationowym miejscem aktywnego centrum leżącego powyżej płaszczyzny pirydynowego pierścienia koenzymu. Oddziaływanie pomiędzy ujemną grupą fenolową koenzymu i dodatnią aminową substratu sprzyja prawidłowemu ułożeniu reagującej cząsteczki. Podczas wytworzenia się wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego między grupą hydroksylową koenzymu i aminową białka, pojawia się dodatni ładunek na formylowym atomie węgla i zmniejsza się zasadowość pirydynowego pierścienia koenzymu, co powoduje rozerwanie wiązania tym pierścieniem i białkiem (rysunek 7B). Przyłączenie grupy aminowej substratu do wiązania  $\text{C}=\text{N}$  enzymu wytwarza czworościenny związek pośredni (rysunek 7C), z którego powstaje następnie kompleks typu zasady Schiffa I z uwolnieniem  $\epsilon$ -aminowej grupy lizyny (rysunek 7C  $\rightarrow$  D). Następną tautomeryczną przemianą zasady Schiffa I wiąże się ze zmianą przestrzennego położenia koenzymu, który obraca się dookoła osi przechodzącej przez grupy 5-metylenową i 2-metylową. Dzięki rozerwaniu kowalencyjnego wiązania między formylową grupą koenzymu i białkiem oraz wiązania wodorowego między azotem pirydyny i białkiem, koenzym połączony z białkiem już tylko w dwóch punktach przy końcu osi, obraca się i ustawia w płaszczyźnie prostopadłej do początkowej. Czworościenny atom węgla w pozycji 4 przechodzi w formę trygonalną (Rysunek 7D). Obrót koenzymu powoduje przemieszczenie grupy karboksylowej aminokwasu, co może przyczynić się do sprowadzenia katalitycznych grup białka X i YH w bliższe sąsiedztwo kompleksu koenzym-substrat. Tautomeryczna konwersja zasady Schiffa I w zasadę

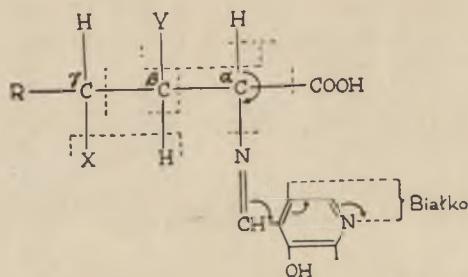


Rys. 7. Molekularny mechanizm enzymatycznej transaminacji (81).

Schiffa II zachodzi prawdopodobnie na drodze zgodnej z ogólnymi prawami katalizy kwas-zasada. Dzięki temu trygonalny atom węgla w pozycji 4 wraca do czworościenej formy a płaszczyzna pierścienia do początkowej pozycji. W wyniku tego tworzy się wodorowe wiązanie między azotem pirydyny i apoenzymem (Rysunek 7D → E), co powoduje obniżenie gęstości elektronowej atomu tlenu grupy formylowej. Proton wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego dysocjuje i katalizuje hydrolizę wiązania C=N na skutek czego powstaje  $\alpha$ -keto-kwas i fosforan pirydoksaminy (Rysunek 7F). Być może w formie aminowej enzymu istnieje dodatkowe wiązanie wodorowe między PAMP i białkiem, gdzie grupa  $\epsilon$ -aminowa lizyny może działać jako akceptor protonów. Grupa aminowa pirydoksaminy może w ten sposób uzyskać nukleofilne własności wymagane dla reakcji z keto-substratem. Mechanizm transaminacji należy do najlepiej poznanych mechanizmów reakcji katalizowanych przez enzymy pirydoksalowe.

## II. Funkcja PALP w enzymatycznej katalizie

Enzymy pirydoksalowe zostały sklasyfikowane przez Brauna i Steinera (22a, 24) na podstawie wpływu jaki wywierają na wiązania w cząsteczkach aminokwasów (rysunek 8 i tablica 2).



Rys. 8. Aktywacja chemicznych wiązań w cząsteczce aminokwasu pod wpływem enzymów pirydoksalowych (22a).

Tablica 2

Klasyfikacja enzymów pirydoksalowych (23, 24)

| Rozerwane wiązanie | Typ reakcji  | Enzymy  |
|--------------------|--|---|
|                    | 1. Reakcje eliminacji i podstawienia przy $\alpha$ -C-atomie |   |
| $\alpha$ -C-H      | a) Racemizacja aminokwasów                                   | Racemazy, racemaza tryptofanu   |
| $\alpha$ -C-H      | b) Kondensacja przy $\alpha$ -C glicyny, seryny lub cysteiny | Transhydroksymetylaza seryny, aldolaza treoniny, syntetaza dehydrosfingozyny, syntetaza $\delta$ -aminolewulinianu, syntetaza aminoacetonu(?), kondensacja cysteiny z pimelylo-CoA w syntezie biotyny (?), aldolaza fenylloseryny |



Ciąg dalszy tablicy 2

| Rozerwane wiązanie  | Typ reakcji   | Enzymy   |
|---|---|--|
| $\alpha$ -C-N i<br>$\alpha$ -C-H                            | c) Transaminacja  | Transaminazy, transaminaza pirydoksaminy, transaminaza aminomalonianu, transaminaza $\gamma$ -hydroksyglutaminianu, transaminaza $\beta$ -alanina — $\alpha$ -alanina      |
| $\alpha$ -C-N   | d) Oksydacyjna dezaminacja  | Histaminaza (?). Oksydaza sperminy   |
| $\alpha$ -C-COOH  | e) $\alpha$ -Dekarboksylacja  | $\alpha$ -dekarboksylazy aminokwasów, dekarboksylazy aminokwasu aromatycznego, sulfinianu cysteiny, leucyny  |
| $\alpha$ -C-COOH  | f) Dekarboksylacja połączona z utlenianiem                                    | Oksydoreduktaza, glicyna: DPN, dekarboksylacja-utlenianie $\alpha$ -aminokwasu   |
| $\alpha$ -C- $\beta$ -C                                     | g) $\alpha$ , $\beta$ -rozpad hydroksyaminokwasów (reakcja odwracalna typu b) | aldolazy seryny i treoniny, aldolaza fosfoseryny   |
| 2. Reakcje eliminacji i podstawienia przy $\beta$ -C atomie |   |  |
| $\beta$ -C-Y<br>(i $\alpha$ -C-H)                           | h) Eliminacja podstawnika na $\beta$ -C (i $\alpha$ -H)                       | Tryptofanaza, dehydrataza treoniny dehydratazy L- i D-seryny, allinaza; dehydrataza kwasu glukozoaminowego, liaza pirazoliloalaniny, liazy siarczku i dwusiarczku cysteiny |
| $\beta$ -C-Y<br>(i $\alpha$ -C-H)                           | i) Wymiana podstawnika na $\beta$ -C (i $\alpha$ -H)                          | Syntetaza tryptofanu, sulfhydraza seryny, sulfhydraza fosfoseryny, syntetazy siarczku i tiosulfonianu, cysteiny, syntetaza cystationiny, I (dehydrataza seryny)            |
| $\beta$ -C- $\gamma$ -C                                     | j) Dekarboksylacja (i odpowiadające reakcje)                                  | $\beta$ -dekarboksylaza asparaginianu, desulfinaza siarczaniu cysteiny   |
| $\beta$ -C- $\gamma$ -C                                     | k) Hydrolityczny rozpad $\gamma$ -keto $\alpha$ -aminokwasów                  | Kinureninaza   |
| 3. Reakcje eliminacji i podstawienia na $\gamma$ -C atomie  |   |  |
| $\gamma$ -C-X-<br>i $\beta$ -C-H                            | l) Eliminacje podstawnika na $\gamma$ -C (i $\beta$ -H)                       | Cystationaza (dezaminaza homoseryny) liaza dwusiarczku cystyny (liaza fosfohomoseryny) syntetaza treoniny, liaza metioniny   |
| $\gamma$ -C-X<br>i $\beta$ -C-H                             | m) Wymiana podstawnika na $\gamma$ -C (i $\beta$ -H)                          | Syntetaza cystationiny II (?) enzym rozszczepiający kanawaninę (?)   |
| 4. Układy nietypowe zależne od PALP                         |   |  |
|   | n) 1,4 fosforylaza poliglukanowa (mięśnie, ziemniaki itd.)                    |  |
|   | o) Jelitowa absorpcja aminokwasów   |  |
|   | p) Indolo-liaza indologlicerofosforanu w <i>Neurospora</i>                    |  |

### 1. Reakcje eliminacji i podstawienia przy $\alpha$ -C

**Racemizacja aminokwasów.** Nieenzymatyczna reakcja racemizacji aminokwasów przebiega w obecności pirydoksalu, jonów metali ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) i przy  $\text{pH} > 9$  (126). Proponowany mechanizm racemizacji jest podobny do mechanizmu transaminacji (106). W obu reakcjach powstaje jako związek pośredni ta sama ketimina, która w przypadku transaminacji ulega hydrolizie (Rysunek 2 (I)  $\leftrightarrow$  (II)  $\leftrightarrow$  (III)  $\leftrightarrow$  (IV)). Przy alkalicznym  $\text{pH}$  reakcja transaminacji przebiega wolniej niż reakcja racemizacji; przy  $\text{pH}$  5 występuje tylko reakcja transaminacji.

Specyficzne racemazy katalizujące przegrupowanie L- i D-izomerów alaniny (177), glutaminianu (7, 117), metioniny (145), kwasu  $\alpha, \epsilon$ -dwuamino pimelinowego (6), treoniny (5), lizyny (60, 61, 158), proliny (150) i hydroksyproliny (1), znaleziono w komórkach wielu bakterii. Udział PALP w reakcjach racemizacji wykazano jednak tylko w kilku przypadkach: w reakcji katalizowanej przez racemazę alaniny, racemazę kwasu glutaminowego i racemazę metioniny. Nie wykazano udziału witaminy  $\text{B}_6$  w racemizacji proliny, lizyny, hydroksyproliny i epimeryzacji kwasu  $\alpha, \epsilon$ -dwuaminopimelinowego. Udział PALP w epimeryzacji hydroksyproliny wykluczono przez bezpośrednie badanie enzymu (1). Nieprawdopodobny wydaje się także udział PALP w racemizacji proliny; jakkolwiek możliwe jest powstawanie związku typu zasady Schiffa pomiędzy tym aminokwasem i pirydoksalem, jednak związek ten nie może ulegać tautomerycznej izomeryzacji.

Możliwe, że w reakcji racemizacji aminokwasów biorą udział nukleotydy flawinowe (39, 156). W reakcji katalizowanej przez racemazę alaniny z *Bacillus subtilis* bierze udział obok PALP również nukleotyd flawino-adenylowy (39). Racemazę alaniny wykryto u *S. faecalis* (177) w 1951 r. Enzym ten uzyskano w częściowo oczyszczonej formie i zaobserwowano, że dodanie PALP powoduje wzrost jego aktywności; PAMP nie aktywuje enzymu.

U *Lactobacillus arabinosus* stwierdzono obecność racemazy kwasu glutaminowego (7, 117), która katalizuje tworzenie racematu z D- lub L-kwasu glutaminowego. Specyficzną racemazę kwasu D-glutaminowego oczyszczoną 300-krotnie otrzymano z ekstraktów *Lactobacillus arabinosus* (45). Nie ma dowodu, że witamina  $\text{B}_6$  jest grupą prostetyczną tego enzymu. Interesujące jest, że racemaza glutaminianu z *L. fermenti* ma widmo typowe dla flawoproteidów. Aktywność enzymu jest hamowana przez ryboflawinę i fosforan ryboflawiny (156) a dodanie dwunukleotydu aktywność tę przywraca. Wyjaśnienie funkcji PALP i flawin w racemazie kwasu glutaminowego wymaga dalszych badań. W mutantach *E. coli* i wielu innych bakteriach (6) występuje układ enzymatyczny katalizujący interkonwersję mezo i L-form kwasu  $\alpha, \epsilon$ -dwuaminopimelinowego. Enzym katalizuje racemizację jednego z dwóch

centrów asymetrii tego kwasu. Epimeraza ta nie działa na D-izomer, PALP nie aktywuje jej, dializa powoduje utratę aktywności enzymu, a przywraca ją dodatek odczynników tiolowych. Obecność racemazy lizyny stwierdzono w autolizatach *Proteus vulgaris* i preparatach innych mikroorganizmów (60, 61, 157). Nie podano jednak bliższych danych o wpływie PALP lub innych kofaktorów na działanie tego enzymu. Adams (1) uzyskał epimerazę 2-hydroksyproliny w wysoko oczyszczonej formie. Wykazano ostatecznie, że enzym ten nie zawiera PALP. Z *Clostridium sticlandii* uzyskano preparat enzymatyczny wykazujący aktywność racemazy proliny i reduktazy proliny (139). Racemaza proliny katalizuje tworzenie racematów i izomerów. Nie ma dowodu świadczącego o udziale PALP. Zaobserwowano, że enzym wykazuje maksymalną aktywność w obecności grup -SH.

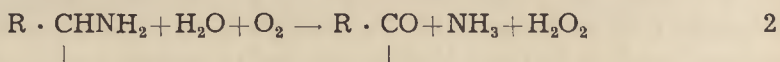
*Transaminacja aminokwasów.* Enzymy katalizujące reakcje transaminacji występują w tkankach roślinnych, zwierzęcych i mikroorganizmach. Chociaż liczba wszystkich transaminaz (aminotransferaz) nie jest znana, zakres enzymatycznych reakcji jest bardzo szeroki. Wykazano, że wszystkie  $\alpha$ -aminokwasy naturalnie występujące mogą ulegać transaminacji (103a). Dawcami grup aminowych mogą być nie tylko  $\alpha$ -aminokwasy, ale także  $\beta$ -,  $\delta$ - i  $\gamma$ -aminokwasy jak również i inne związki, na przykład adenina, guanina, cytozyna, aminocukry i ich estry fosforowe. Akceptorami grup aminowych są ketokwasy, z których najbardziej aktywnym i szeroko rozpowszechnionym jest kwas  $\alpha$ -ketoglutarynowy. Wszystkie zbadane dotąd, oczyszczone transaminazy są optycznie specyficzne. Transaminazy wyodrębnione z tkanek zwierząt, roślin i większości bakterii katalizują reakcje transaminacji między  $\alpha$ -ketokwasami i L-aminokwasami. Thorn i wsp. (158, 160) opisali także transaminację D-aminokwasów z  $\alpha$ -ketoglutaranem katalizowaną przez preparaty z *Bacillus subtilis* i z pirogronianem katalizowaną przez preparaty *Bacillus antracis*. Tylko jedną z D-transaminaz znacznie oczyszczono (101). Katalizuje ona reakcję transaminacji D-alaniny z  $\alpha$ -ketoglutaranem. Jej ciężar cząsteczkowy wynosi 53 000. Enzym zawiera 1 mol PALP na mol białka i działa zgodnie z mechanizmem transaminacji L-aminokwasów. Nie ma dostatecznych dowodów istnienia D-transaminazowej aktywności w tkankach zwierząt wyższych. Wydaje się, że transaminazy tkanek zwierzęcych są specyficzne dla L-aminokwasów. Na podstawie dotychczasowych badań można wyciągnąć wniosek, że specyficzność indywidualnych transaminaz jest szeroka, z drugiej strony znane są transaminazy wysoko specyficzne. Międzynarodowa Unia Komisji Biochemicznej przyjmuje istnienie 16 transaminaz jako odrębnych enzymów (42). Wśród najbardziej rozpowszechnionych są transaminaza asparaginowa i transaminaza alaninowa. Oba enzymy uzyskano w stanie znacznie oczyszczonym. Pierwszy z nich katalizuje reakcję transaminacji między kwasem asparaginowym i  $\alpha$ -ketoglutarynowym, jest

bardzo aktywny w tkankach ssaków, a szczególnie w mięśniu sercowym, z którego też najczęściej go wyodrębniano (50, 68a, 69, 96, 129). Ciężar cząsteczkowy enzymu wynosi  $110\ 000 \pm 11\ 000$  (69); zawiera on 2 mole PALP na 1 mol białka. Turano i wsp. (162) oznaczyli skład aminokwasowy transaminazy asparaginianowej. Zawiera ona 6 grup -SH, których rola polega prawdopodobnie na zachowaniu katalitycznie aktywnej konformacji natywnego enzymu (129). Oczyszczona transaminaza asparaginianowa jest aktywna w stosunku do kwasu asparaginowego i w nieznacznym stopniu do tryptofanu i tyrozyny (68). Polanowski (130) wykazał, że cząsteczka transaminazy asparaginianowej dysocjuje w środowisku zasadowym na dwie podjednostki i uważa, że forma aktywna jest monomerem.

W mięśniach świni i byka stwierdzono obecność dwóch izozymów transaminazy glutaminowej: jeden występuje we frakcji mitochondrialnej, drugi — w sarkoplazmie; różnią się one między innymi własnościami elektroforetycznymi, widmem absorpcji i optimum pH.

Transaminaza alaninowa katalizuje reakcję transaminacji między alaniną i kwasem  $\alpha$ -ketoglutazarowym. Znacznie oczyszczoną transaminazę alaninową uzyskano z serca świni (52, 160) oraz z serca wołu (26). Jej ciężar cząsteczkowy wynosi 100 000, a zawartość PALP — 0,9 mola na mol enzymu. PALP jest mocniej związany z apoenzymem w porównaniu z transaminazą asparaginianową. W cząsteczce enzymu znajduje się 5 reaktywnych grup -SH. Enzym jest aktywny tylko w stosunku do alaniny i kwasu  $\alpha$ -aminomasłowego (26). W znacznie oczyszczonym stanie otrzymano także transaminazę pirydoksamino-pirogrogrianową, którą wykrystalizowano (168).

#### Oksydacyjna dezaminacja

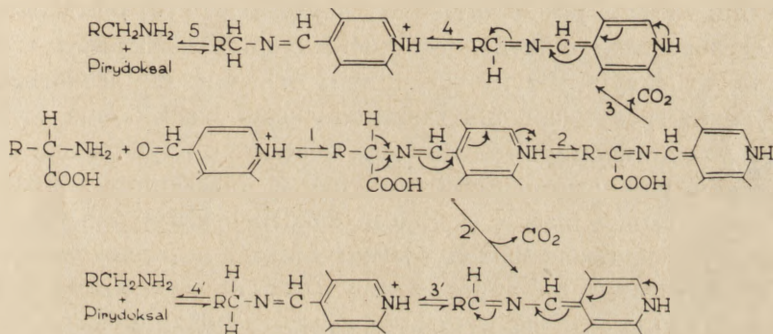


Wiele aminokwasów może ulegać nieenzymatycznej oksydacyjnej dezaminacji (reakcja 2) wskutek ogrzewania z PAL i jonami metali ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) w obecności tlenu i przy  $\text{pH} > 9$ ; w podobnych warunkach PAM może utleniać się do PAL (67). W warunkach biologicznych stwierdzono występowanie enzymów katalizujących oksydacyjną dezaminację D- i L-aminokwasów. Okazało się jednak, że badane oksydazy D- i L-aminokwasów są flawoproteidami (103). Sugerowano, że działanie oksydaz monoamin związane jest także z obecnością flawin lub cytochromów (17, 91). Występująca w osoczu krwi oksydaza amin, wykryta przez Hirscha (56), oczyszczona znacznie przez Tabora i wsp. (155) i Gorkina (49), a wykrystalizowana przez Yasunobu i Yamada (182) jest enzymem pirydoksalowym zawierającym 4 mole siarczynu miedzi na mol białka. PALP oraz jony miedzi znajdują się prawdopodobnie w grupie prostetycznej ponieważ ich dodatek przy-

wraca częściowo aktywność enzymu zahamowaną przez hydroksyloaminę. *Mann* (100) sugerował, że również oksydaza amin z grochu jako grupę prostetyczną zawiera jony miedzi i PALP, chociaż poprzednio przypuszczano, że grupą prostetyczną jest flawina (48, 164).

Natura grupy prostetycznej oksydazy dwuamin jest wciąż nie wyjaśniona. Enzym ten wykryty w nerkach wieprza znaleziono następnie w innych zwierzęcych tkankach, w roślinach i mikroorganizmach (33, 185). Sugerowano, że jest on identyczny z histaminazą (73, 77, 78). Enzym katalizuje utlenienie histaminy agmatyny, sperminy, kadaweryny i etylenodwuaminy. Oksydaza dwuamin w odróżnieniu od oksydazy monoamin jest hamowana przez izoniazyd (186). Niektórzy autorzy podają, że grupą prostetyczną tego enzymu jest flawina (48, 164), według innych zaś rolę tę pełni PALP (79).

**Dekarboksylacja aminokwasów.** *Werle* i *Koch* (172) zaobserwowali tworzenie śladowych ilości histaminy w czasie gotowania histydyny w wodnych roztworach z PALP. Zaproponowany przez nich mechanizm tej reakcji przedstawia rysunek 9 (etapy 1, 2, 3, 4, 5).



Rys. 9. Możliwy mechanizm dekarboksylacji  $\alpha$ -aminokwasów.

Mechanizm I (reakcja 1, 2, 3, 4, 5) związany jest z labilizacją atomu wodoru (20, 172), mechanizm 2 (reakcje 1, 2', 3', 4') — z labilizacją wiązania węgiel-węgiel (106, 99, 171, 151a).

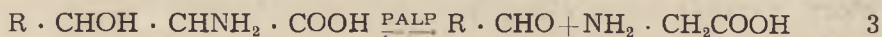
Mechanizm ten jest zgodny z zasadniczym schematem reakcji katalizowanych przez PAL zaproponowanym przez *Braunsteina* i *Szemiacina* (2), jakkolwiek *Braunstein* uważa, że nie we wszystkich przypadkach występuje jonizacja wodoru przy węglu  $\alpha$  i całkowite tautomeryczne przegrupowanie zasad Schiffa.

*Metzler* i wsp. (106, 148) oraz niezależnie *Westheimer* (171) podali nieco inny mechanizm (rysunek 9, etapy 1, 2', 3', 4'), według którego podczas dekarboksylacji atom wodoru pozostaje przy  $\alpha$ -węglu aminokwasu, co zostało potwierdzone badaniami izotopowymi. *Mandel* i wsp. (99) wykazali, że w czasie enzymatycznej dekarboksylacji tyrozyny do tyraminy atom wodoru przy  $\alpha$ -węglu nie uwalnia się, a *Belleau* i *Burba* (11) stwierdzili, że podczas dekarboksylacji tyrozyny proton pobrany z wody zajmuje tę samą pozycję jaką zajmo-

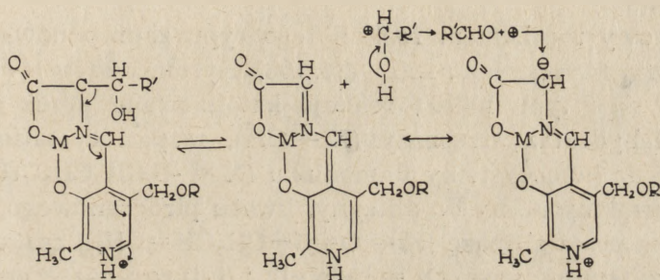
wała grupa karboksylowa. Badania Snella i wsp. (76) nad nieenzymatyczną reakcją dekarboksylacji aminokwasów wykazały, że jest ona wynikiem labilizacji wiązania między  $\alpha$ -węglem aminokwasu i grupą karboksylową (tak jak w enzymatycznej dekarboksylacji) i nie wymaga poprzedniego uwolnienia jonu wodorowego. Jony metali hamują reakcję dekarboksylacji, gdyż chelatując z karboksylowymi grupami przeszkadzają uwolnieniu  $\text{CO}_2$  (76). Dekarboksylazy aminokwasów wykryto w komórkach wielu bakterii, roślin i ssaków. Gale i wsp. (44) zajmowali się badaniem własności i rozmieszczenia bakteryjnych enzymów dekarboksylujących lizynę, ornitynę, argininę, tyrozynę, histydynę i kwas glutaminowy. Żaden gatunek bakterii nie zawiera wszystkich sześciu enzymów, jednak niektóre zawierają więcej niż jeden. Każdy z oczyszczonych preparatów jest specyficzny dla L-izomeru. Optimum działania tych enzymów leży w zakresie  $\text{pH}$  od 2,5—6,0. Wysoka aktywność dekarboksylaz w kwaśnym  $\text{pH}$  pozwala na manometryczne oznaczenie uwolnionego  $\text{CO}_2$ . Bellamy i Gunsalus (12) wykazali, że aktywność dekarboksylazy *S. faecalis* hodowanych w środowisku ubogim w witaminę  $\text{B}_6$ , znacznie wzrasta po dodaniu PAL, a jeszcze więcej po dodaniu PAL i ATP, co sugeruje, że PALP jest koenzymem. PALP jest także koenzymem dekarboksylaz lizyny, argininy i ornityny (9). Dekarboksylazy bakteryjne są specyficzne dla L-aminokwasów i z kilkoma wyjątkami są specyficzne dla jednego aminokwasu. W związku z tym są one używane do oznaczenia pojedynczych aminokwasów w mieszaninie aminokwasów lub w hydrolizatach białek. Ponieważ dekarboksylują one tylko L-izomery mogą być używane także do wyodrębniania D-aminokwasów z mieszanin syntetycznych D,L-aminokwasów (139). Pierwszą dekarboksylazą uzyskaną w stanie jednorodnym była dekarboksylaza z *Escherichia coli* (146, 147). Enzym o ciężarze cząsteczkowym 300 000 zawierał dwie mocno związane reszty PALP na mol białka. Widmo aktywnej formy enzymu wskazuje, że w dekarboksylazie podobnie jak i w transaminazie PALP tworzy aldiminowe wiązanie z apoenzymem i że powstawanie początkowego kompleksu enzym-substrat przebiega drogą transaldiminacji. Specyficzne dekarboksylazy aminokwasowe wykryto nie tylko w bakteriach, ale także w innych mikroorganizmach, na przykład w drożdżach (88), *Chlorella* (136) i *Fusaria* (118).

W odróżnieniu od bakteryjnych dekarboksylaz, które mają optimum  $\text{pH}$  w zakresie kwaśnym, dekarboksylazy występujące u ssaków, mają zazwyczaj optimum w  $\text{pH}$  obojętnym lub lekko zasadowym. Dotąd zbadane dekarboksylazy ssaków mają niższy stopień substratowej specyficzności niż bakteryjne. Niska aktywność w większości tkanek nie pozwala na bezpośrednie manometryczne oznaczenie dekarboksylaz i, z nielicznymi wyjątkami, nie wydaje się, aby reprezentowały one główną metaboliczną drogę w tkankach ssaków.

### Odwracalny rozpad $\beta$ -hydroksyaminokwasów

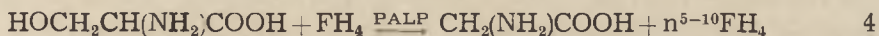


Odwracalny rozpad treoniny do glicyny i acetaldehydu, seryny do glicyny i formaldehydu,  $\alpha$ -metyloseryny do alaniny i formaldehydu i  $\alpha$ -hydroksymetyloseryny do seryny i formaldehydu stwierdzono w układach nieenzymatycznych (97, 111). Wykazano, że reakcje enzymatycznego rozpadu seryny i treoniny nie są związane z labilizacją wodoru przy  $\alpha$ -atomie węgla. Proponowany mechanizm tych reakcji (reakcja 3) (106, 148) przedstawia rysunek 10.



Rys. 10. Mechanizm odwracalnego rozpadu  $\beta$ -hydroksyaminokwasu (106, 148).

Istnieje zasadnicza różnica między reakcjami rozpadu seryny i treoniny:  $\alpha$ -węgiel seryny i jej  $\alpha$ -pochodnych nie uwalnia się jako wolny formaldehyd, lecz jako produkt kondensacji z kwasem tetrahydrofoliowym, prawdopodobnie  $N_5$ ,  $N_{10}$ -metylenotetrahydrofolan (34, 167, 188) (reakcja 4).



W reakcji odwracalnej ten sam produkt działa jako pośredni dawca grup hydroksymetylenowych. O udziale PALP w tych reakcjach donieśli Lascelles i Woods (92). Potwierdzili to inni badacze posługujący się preparatami uzyskanymi z ssaków (3, 15, 62), ptaków (38, 136), bakterii (180) i roślin (176). Jony  $\text{Mn}^{2+}$  katalizują reakcję w układzie wyizolowanym z bakterii (180), natomiast enzymy izolowane z wątroby ssaków lub ptaków są hamowane przez jony metali. Własności spektralne hydroksymetylasy seryny oczyszczonej z wątroby królika wskazują, że PALP jest związany z grupą aminową enzymu w postaci zasady Schiffa (176). Po hydrolizie kwaśnej zredukowanego enzymu uzyskano produkt, który wykazywał własności  $\epsilon$ -pirydoksylolizyny zarówno w badaniach elektroforetycznych, jak i chromatograficznych. Enzym zawiera 4 mole PALP na mol białka.

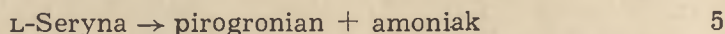
Do omawianego typu reakcji można zaliczyć także syntezę kwasu  $\delta$ -aminolewulinowego, która przebiega przy udziale enzymu zawierającego PALP. Według Szemina i wsp. (142, 143, 144) sukcylny-CoA

kondensuje z  $\alpha$ -węglem glicyny dając kwas  $\alpha$ -amino- $\beta$ -ketoadypinowy, który po dekarboksylacji przechodzi w kwas  $\delta$ -aminolewulinowy — prekursor porfiryń. W reakcji tej prawdopodobnie powstaje związek typu zasady Schiffa: enzym-PALP-glicyna, który reaguje z sukcyńlo-CoA. Kondensacja i wydzielanie  $\text{CO}_2$  może zachodzić jednocześnie.

Podobny może być mechanizm syntezy sfingozyny z seryny i palmitylo-CoA, przebiegającej z udziałem NADP, PALP i jonów magnezu (151, 183).

## 2. Reakcje eliminacji i podstawienia przy $\beta$ -C

Podstawowy mechanizm reakcji tego typu zaproponowano na podstawie nieenzymatycznych reakcji (24, 106) (Rysunek 2 (I)  $\leftrightarrow$  (VIII)  $\rightarrow$  (IX)). Do reakcji tego typu należą reakcje katalizowane przez dehydratazę seryny i dehydratazę treoniny ( $X = \text{OH}$ ), rozpad cystationiny drogą  $\beta$ -eliminacji do homocysteiny i amoniaku ( $X = -\text{S}\cdot\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$ ), reakcja przemiany alliny do allicyny, kwasu pirogronowego i amoniaku katalizowana przez allinazę ( $X = \text{O}=\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), reakcje katalizowane przez tryptofanazę ( $X = \text{indolyl}$ ) i  $\beta$ -tyrozinazę, enzymatyczna konwersja  $\beta$ -chloroalaniny do pirogronianu, amoniaku i jonów chlorkowych. Enzymatyczne i nieenzymatyczne reakcje zachodzą z większą szybkością w środowisku alkalicznym. Dezaminację beztlenową seryny badano w wielu biologicznych preparatach. Przebiega ona następująco (30):



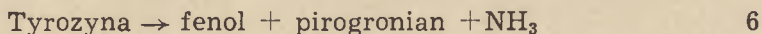
Dehydrataza L-seryny wyodrębniona z *Neurospora crassa* wydaje się zależna od PAL. Preparat ten dezaminuje także L-treoninę (181). Dehydrataza D-seryny uzyskana z *E. coli* jest aktywowana przez PALP (109), lecz dehydrataza L-seryny z tego źródła była aktywowana przez glutation i kwas adenyłowy, a nie przez PALP (160). Dezaminaza L-seryny z *Streptococcus rimosus* katalizuje dezaminację  $\beta$ -chloroalaniny do pirogronianu (153).

Dehydratazy L-seryny i L-treoniny z wątroby owcy są enzymami pirydoksalowymi (137). Najbardziej aktywną dehydratazę seryny izolowano z wątroby szczura (141). Preparat enzymatyczny katalizuje także syntezę cystationiny.

Bezettlenową dezaminację treoniny katalizowaną przez dehydratazę treoniny badano w organizmach różnych zwierząt (121, 141) i bakterii (179). Oczyszczony enzym z wątroby owcy (35, 121) jest zależny od PAL i dezaminuje oprócz L-treoniny również L-allotreoninę i L-serynę. W różnych bakteriach wykryto tryptofanazę powodującą rozpad tryptofanu do indolu, kwasu pirogronowego i amoniaku (54). Reakcję katalizują jony potasowe, amonowe i prawdopodobnie jony żelaza (36). Tryptofanazę



wyodrębniono z *E. coli* i wykazano, że jej koenzymem jest PALP (179). Enzym ten uzyskany w stanie krystalicznym (119), katalizował także reakcję desulfhydratacji cysteiny, dezaminację seryny, konwersję S-metylocysteiny do pirogronianu, metylomerkaptanu i amoniaku i syntezę tryptofanu z indolu i cysteiny. Tyrozyna może w mikroorganizmach ulegać degradacji do fenolu, *p*-krezolu, kwasu *p*-hydroksybenzoesowego itp. Przemiana do fenolu (reakcja 6) katalizowana jest przez enzym pirydoksyłowy — tyrozynazę (163).



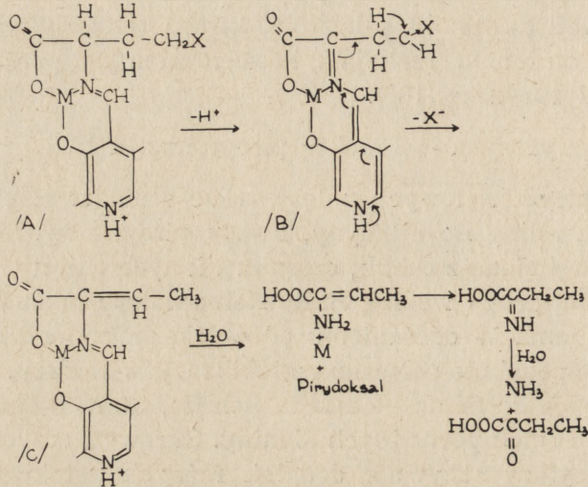
Do enzymów pirydoksalowych należy także alliinaza (46, 90) katalizująca przemianę alliny do allicyny, kwasu pirogronowego i amoniaku. Alliinazę wyodrębniono z cebuli, czosnku i innych roślin (154, 180).

Do reakcji tej grupy według Braunsteina należy także  $\beta$ -dekarboksylacja asparaginianu. W odróżnieniu od  $\alpha$ -dekarboksylacji aminokwasów jest ona prawdopodobnie połączona z labilizacją  $\alpha$ -wodoru. Jako związek pośredni powstaje ketimina — zasada Schiffa, która ulega dekarboksylacji do odpowiednich pochodnych alaniny. Surowe i oczyszczone preparaty dekarboksylazy aktywuje dodatek różnych ketokwasów i PALP (29, 105, 122). Wykazano, że enzym ten działa jako L-aminokwasowa transaminaza o niskiej substratowej specyficzności i jako  $\beta$ -dekarboksylaza asparaginianu. Prawdopodobnie w obu reakcjach biorą udział te same aktywne centra (123, 124). Wysokooczyszczona  $\beta$ -dekarboksylaza asparaginianowa z *Alcaligenes faecalis* (123, 124) i krystaliczny enzym z *Achromobacter* (173, 174) ma duży ciężar cząsteczkowy (około 800 000) i zawiera 16 cząsteczek PALP na mol białka. PALP związany jest z  $\epsilon$ -aminową grupą białka (174). Podobny mechanizm do  $\beta$ -dekarboksylacji przypisywany jest enzymatycznemu rozpadowi kinureniny do kwasu antranilowego (47). Interesujące byłoby wykazanie, czy kinurenaza posiada także, podobnie jak  $\beta$ -dekarboksylaza, aktywność transaminazową. Przemawiałby za tym fakt, że kinurenaza z *Neurospora* jest hamowana przez różne aminokwasy (67).

### 3. Reakcje eliminacji przy $\gamma$ -C

Do reakcji tej grupy należą: rozpad cystationiny ( $X = -S-CH_2CH_2NH_2COOH$ ) do kwasu  $\alpha$ -ketomasłowego, cysteiny i amoniaku, dezaminacja homoseryny ( $X = OH$ ) do kwasu  $\alpha$ -ketomasłowego, rozpad metioniny ( $X = -S-CH_3$ ) do kwasu  $\alpha$ -ketomasłowego, amoniaku i metylomerkaptanu, dezaminacja homocysteiny ( $X = -SH$ ) do kwasu  $\alpha$ -ketomasłowego i siarkowodoru, konwersja *o*-fosfohomoseryny do treoniny. Nie zaobserwowano odpowiednich reakcji nieenzymatycznych, przypuszcza się jednak (148), że ich mechanizm jest taki, jak pokazuje rysunek 11.

Cystationina może być *in vivo* przemieniana do cysteiny i kwasu  $\alpha$ -ketomasłowego (28). Preparaty enzymatyczne z wątroby szczura z niedoborem witaminy B<sub>6</sub> nie katalizują tworzenia cysteiny z homocysteiny i seryny o ile nie doda się PALP (21). Enzym powodujący rozpad jak



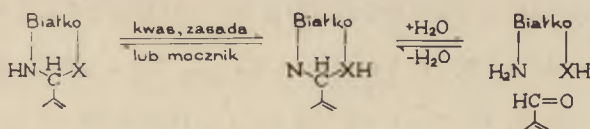
Rys. 11. Mechanizm reakcji eliminacji przy  $\gamma$ -C (106, 148).

i tworzenie cystationiny zawiera PALP (14, 47). Syntetaza cystationiny z wątroby szczura oczyszczona około 35-krotnie również zawiera PALP; katalizuje ona syntezę cystationiny z seryny i homocysteiny i dezaminację L-seryny. Z wątroby szczura uzyskano też preparat, który katalizował rozpad cystationiny i dezaminację homoseryny (13), a także który w formie krystalicznej katalizował rozpad cystationiny do cysteiny, amoniaku i kwasu  $\alpha$ -ketomasłowego (102). Krystaliczny enzym zawierał 4 mole PALP na mol białka, wykazywał maksimum absorpcji przy 427 m $\mu$  w pH 7,5 a w granicach pH 4,0 do 8,4 obserwowano niewielkie zmiany absorpcji. W tkankach ssaków i w *Proteus morgani* znaleziono desulfhydrazę homocysteiny, która katalizuje rozpad homocysteiny do kwasu  $\alpha$ -ketomasłowego, amoniaku i siarkowodoru. Enzym izolowany z bakterii jest zależny od pirydoksalu. Również enzym z *Pseudomonas* powodujący degradację metioniny do kwasu  $\alpha$ -ketomasłowego, amoniaku i metylomerkaptanu wydaje się być enzymem pirydoksalowym.

#### 4. Inne funkcje witaminy B<sub>6</sub>

Poznano dotąd wiele enzymów pirydoksalowych biorących udział w biosyntezie i transformacji aminokwasów i innych azotowych metabolitów, lista ich jednak niewątpliwie jest wciąż niekompletna. Odkrywane są nowe aminotransferazy, dekarboksylazy aminokwasów, racemazy i inne enzymy pirydoksalowe. Przeprowadzono także badania nad możli-

wą rolą witaminy B<sub>6</sub> we wchłanianiu aminokwasów. Mechanizm tego procesu jest nie wyjaśniony i fizjologiczne znaczenie PAL w aktywnym przenoszeniu aminokwasów do komórek zwierzęcych jest sporne (31a). Stwierdzono, że dla utrzymania równowagi jonowej sodu i potasu u szczura konieczne jest podanie określonej ilości witaminy B<sub>6</sub>, lecz natura tego efektu nie jest jasna (59). Przeprowadzono też interesujące badania nad wpływem witaminy B<sub>6</sub> na endogenne wydzielanie się szczawianów w moczu, co wiąże się z tworzeniem kamieni szczawianowych w przewodach moczowych. Zbadano wpływ witaminy B<sub>6</sub> na metabolizm prekursorów kwasu szczawowego u szczura (135) i wykazano, że niedobór witaminy B<sub>6</sub> powoduje wzrost tworzenia się kwasu szczawowego z kwasu glikolowego, etanoloaminy i glikolu etylenowego. Doniesiono, że witamina B<sub>6</sub> odgrywa pewną rolę w biosyntezie kwasów tłuszczowych (169). Nietypową funkcję spełnia PALP w fosforylacji polisacharydów (10). Fosforylaza ta po redukcji NaBH<sub>4</sub> pozostaje aktywna co wykazuje, że PALP nie tworzy zasad Schiffa z substratem (84). Zredukowany enzym po hydrolizie trypsyną daje peptyd, z którego po hydrolizie kwaśnej wyodrębniono ε-N-pirydoksylo-lizynę. Późniejsze prace wykazały, że sekwencja trójpeptydu wyodrębnionego po trawieniu chymotrypsyną jest następująca: ε-N-pirydoksylo-Liz-Liz. Fen (63). Fosforylaza zawiera 4 reszty PALP związanego z resztą lizyny czterech podjednostek białkowych (43). Krystaliczna fosforylaza b zawiera 2 cząsteczki PALP na mol białka i wykazuje maksimum absorpcji przy 333 mμ z małymi zmianami w pH 5—9,5. W bardziej kwaśnym lub zasadowym środowisku lub przy działaniu na enzym 7M mocznikiem, pojawia się szczyt przy około 415 mμ. Wywnioskowano, że maksimum absorpcji przy 330 mμ wskazuje na wiązanie aldiminowe między apo- i koenzymem (rysunek 12).



Rys. 12. Prawdopodobne wiązanie fosforanu pirydoksalu z białkiem w fosforylacji i zachowanie się tego wiązania pod wpływem kwasu, zasady lub mocznika (43).

Oczyszczone fosforylasy a i b nie zawierają aktywności charakterystycznych dla innych enzymów pirydoksalowych (55). Wydaje się prawdopodobnie, że witamina B<sub>6</sub> fosforylasy służy jako składnik strukturalny i nie ma funkcji koenzymu. Być może następne prace nad innymi białkami wykażą, że witamina B<sub>6</sub> występuje bardziej powszechnie w białkach niż to wykazano dotychczas. Każdy enzym posiadający PALP jako koenzym może zawierać także PALP jako składnik strukturalny i możliwe jest, że PALP w różnych enzymach spełnia obie funkcje (104). Znany jest fakt, że PALP może tworzyć zasady Schiffa z grupami aminowymi różnych białek, na przykład z albuminą surowicy wołu (37).

Resumując, PALP zajmuje wyjątkowe miejsce wśród koenzymów ze względu na bezprzykładną różnorodność katalizowanych reakcji biorąc udział nie tylko w transformacji aminokwasów, ale i w metabolizmie tłuszczów i węglowodanów, biosyntezie porfiryn, puryn, kwasu nikotynowego, ryboflawiny, kwasu foliowego, kwasu pantotenowego i być może innych witamin zawierających azot (24).

## LITERATURA

1. Adams E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 327 (1963).
2. Adams E., Norton I. L., *J. Biol. Chem.* **239**, 1525 (1964).
3. Alexander N., Greenberg D. M., *J. Biol. Chem.* **220**, 775 (1965).
4. Ambe L., Sohnie K., *Chem. Abstr.* **54**, 4729a (1960).
5. Amos H., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 3856 (1954).
6. Antia M., Hoare D. S., Work E., *Biochem. J.* **65**, 448 (1957).
7. Ayengar P., Roberts E., *J. Biol. Chem.* **197**, 452 (1952).
8. Baddiley J., *Nature* **176**, 711 (1952).
9. Baddiley J., Gale E. F., *Nature* **155**, 727 (1945).
10. Baranowski T., Illingworth B., Brown D. H., Cori C. F., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 16 (1957).
11. Belleau B., Burba J., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 5751 (1960).
12. Bellamy W. D., Gunsalus I. C., *J. Bacteriol.* **46**, 573 (1943), **48**, 191 (1944).
13. Binkley F., Olson C. K., *J. Biol. Chem.* **185**, 881 (1950).
14. Binkley F., Christensen G. M., Jensen W. N., *J. Biol. Chem.* **194**, 109 (1952).
15. Blakely R. L., *Biochem. J.* **61**, 315 (1955).
16. Blaschko H., *Advances in Comparative Physiology and Biochemistry*, t. I, Academic Press, New York, 1962, str. 68.
17. Blaschko H., *Pharmacol. Rev.* **4**, 415 (1962).
18. Borkenhagen L. F., Kennedy E. P., Felding L., *J. Biol. Chem.* **236**, PC 28 (1961).
19. Braunstein A. E., Vilenkina G. Y., *Dokł. Akad. Nauk SSSR* **66**, 243 (1949).
20. Braunstein A. E., Szemiakin M. M., *Biochimia* **18**, 393 (1953).
21. Braunstein A. E., Goriaczekowa V. V., *Dokł. Akad. Nauk SSSR* **74**, 529 (1956).
22. Braunstein A. E., *Molecular Basis of Enzyme Action and Inhibition*, red. P. A. E. Desnuelle, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, 1963, str. 280.
- 22a. Braunstein A. E., *Ukrain. Biochim. Žurn.* **27**, 421 (1955), *Sowjetwiss. Naturwiss. Beitr.* Nr 3, str. 28 (1957).
23. Braunstein A. E., *Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis*, red. E. E. Snell, P. M. Fasella, A. Braunstein, A. Rossi, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1963, str. 579.
24. Braunstein A. E., *The Enzymes*, wyd. P. Boyer H. Lardy, K. Myrbäck, Academic Press, wyd. II 1960, str. 116.
25. Bruice T. C., Toppling R. M., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 2448 (1962).
26. Bulos B., Randler Rh., *J. Biol. Chem.* **240**, 3283 (1965).
27. Brown G. W. Jr., Cohen P. P., *Biochem. J.* **75**, 82 (1960).

28. Carrol W. R., Stacy C. W., Vigneand V., *J. Biol. Chem.* **180**, 357 (1949).
29. Cattaneo J., Senez J. C., Beaumont P., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 458 (1958).
30. Chargaff E., Sprinson D. B., *J. Biol. Chem.* **151**, 273 (1943).
31. Christensen H. N., Collius S., *J. Biol. Chem.* **220**, 279 (1956).
- 31a. Christensen H. N., Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis, red. E. E. Snell, P. M. Fasella, A. Braunstein, A. Rossi, Pergamon Press Oxford, London, New York, Paris, 1963, str. 533.
32. Cordes E. M., Jencks W. D., *Biochemistry* **1**, 773 (1962).
33. Cotzias G. C., Dole V. P., *J. Biol. Chem.* **196**, 235 (1952).
34. Crawford L. V., *Biochem. J.* **68**, 221 (1958).
35. Davis L., Metzler D. E., *J. Biol. Chem.* **238**, 1883 (1962).
36. Daves A. E., Happold F. C., *Biochem. J.* **44**, 349 (1949).
37. Dempsey C. B., Christensen H. N., *J. Biol. Chem.* **237**, 1113 (1962).
38. Deodhar S., Sakami W., *Federation Proc.* **12**, 195 (1953).
39. Diven W. F., Johuston R. B., Scholz J. J., *Biochim Biophys. Acta* **67**, 161 (1963).
40. Elödi P., Szorényi E., *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **9**, 367 (1956).
41. Flavin E. H., Kent A. B., Snyder T. R., Krebs F. G., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2906 (1958), *J. Biol. Chem.* **232**, 543 (1958).
42. Florkin M., Stolz E. H., (wyd.) *Comprehensive Biochemistry*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York, 1964, t. 13, str. 82.
43. Fischer E. H., Kent A. B., Snyder T. R., Krebs E. G., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2906 (1958), *J. Biol. Chem.* **232**, 549 (1958).
44. Gale E. F., *Adv. Enzymol.* **6**, 1 (1946).
45. Glaser L., *J. Biol. Chem.* **235**, 2095 (1960).
46. Goriaczenkowa E. W., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **87**, 457 (1952).
47. Goriaczenkowa E. W., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **85**, 603 (1952).
48. Goriaczenkowa E. W., *Biochimia* **21**, 247 (1956).
49. Gorkin V. Z., *Biochimia* **7**, 632 (1961).
50. Green D. E., Leloir L. F., Noctio V., *J. Biol. Chem.* **161**, 559 (1945).
51. Gregerman R. I., Christensen H. N., *J. Biol. Chem.* **220**, 765 (1956).
52. Grein L., Pfleiderer G., *Biochem. Z.* **330**, 433 (1958).
53. György J., *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 983 (1938).
54. Happold F. C., *Edv. Enzymol.* **10**, 51 (1950).
55. Hedrick J. L., Fischer E. H., *Biochemistry* **4**, 1337 (1965).
56. Hirsch J. G., *J. Exptl. Med.* **97**, 345 (1953).
57. Hoare D. S., Snell E. E., Proc. Int. Symp. Enzyme Chemistry Tokyo, Kyoto 1957, str. 142.
58. Hopper S., Segal H. L., *J. Biol. Chem.* **237**, 3189 (1962).
59. Hsu J. M., Davis R. L., Chow B. F., *J. Biol. Chem.* **230**, 889 (1958).
60. Huang H. T., Kita D. D., Davison J. W., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1005 (1958).
61. Huang H. T., Davisson J. W., *J. Bacteriol.* **76**, 495 (1958).
62. Huennkens F. M., Hacefi Y., Kayl D., *J. Biol. Chem.* **224**, 435 (1957).
63. Hughes R. C., Jenkins W. T., Fischer E. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **48**, 1615 (1962).
64. Hurwitz J., *J. Biol. Chem.* **205**, 935 (1953), **217**, 513 (1955).
65. Hurwitz J., *J. Biol. Chem.* **212**, 757 (1955).
66. Hurwitz J., *J. Biol. Chem.* **205**, 935 (1953), **217**, 513 (1955).
67. Ikawa M., Snell E. E., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4900 (1954).
- 67a. Jacoby W. B., Bomer D. M., *J. Biol. Chem.* **205**, 709 (1955).
68. Jaroszewicz L., Niewiarowski S., *Bull. Acad. Polon.* **13**, 455 (1965).
- 68a. Jaroszewicz L., *Bull. Acad. Polon.* **13**, 459 (1965).

69. Jenkins W. T., Yphantis D. A., Sizer I. W., *J. Biol. Chem.* **234**, 51 (1959).
70. Jenkins W. T., Sizer I. W., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2385 (1957).
71. Jenkins W. T., Sizer I. W., *J. Biol. Chem.* **234**, 1179 (1959).
72. Jenkins W. T., Sizer I. W., *J. Biol. Chem.* **235**, 620 (1960).
73. Jenkins W. T., Orłowski S., Sizer I. W., *J. Biol. Chem.* **234**, 2657 (1959).
74. Jenkins W. T., *J. Biol. Chem.* **236**, 471 (1961).
75. Kallio R. F., Larson A. D., *Amino Acid Metabolism*, W. D. Mc Elroy B. Glass (wyd.) Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland 1955, str. 616.
76. Kalyankar G. D., Snell E. E., *Biochemistry* **1**, 594 (1962).
77. Kapeller-Adler R., *Biochem. J.* **48**, 99 (1951).
78. Kapeller-Adler R., Macfarlane H., *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 542 (1963).
79. Kapeller-Adler R., *Biochem. J.* **44**, 70 (1949).
80. Karasek M. A., Greenberg D. M., *J. Biol. Chem.* **227**, 191 (1957).
81. Karpeysky M. J., Ivanov V. I., *Nature* **210**, 493 (1966).
82. Kating H., *Planta* **51**, 635 (1958).
83. Kennedy F. P., *Federation Proc.* **20**, 934 (1961).
84. Kent A. B., Krebs E. G., Fischer E. H., *J. Biol. Chem.* **232**, 549 (1958).
85. Keresztesy J. C., Stevens J. R., *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 1267 (1938).
86. Klein P., Sonverein C., *Biochem. Z.*, **326**, 123 (1954).
87. Kormendy L., Gartner G., Hann., *Naturwissenschaften* **52**, 209 (1965).
88. Krishnaswamy P. P., Giri K. V., *Biochem. J.* **62**, 301 (1956).
89. Kuhn R., Westphal K., Wendt G., Westphal O., *Naturwissenschaften* **27**, 469 (1939).
90. Kupiecki F. P., Virtanen A. I., *Acta Chem. Scand.* **14**, 1913 (1960).
91. Languado J. R., Sourkes T. L., *Can. J. Biochem. Physiol.* **34**, 1095 (1956).
92. Lascelles J., Woods D. D., *Nature* **166**, 649 (1950).
93. Lederer F., Conthis S. M., Laursen R. A., Westheimer F. H., *Biochemistry* **3**, 823 (1966).
94. Lepkowsky S., *Science* **87**, 169 (1938).
95. Levine M., Traver H., *J. Biol. Chem.* **184**, 427 (1950).
96. Lis H., *Biochim Biophys. Acta* **28**, 191 (1958).
97. Longenecker J. B., Ikawa M., Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **226**, 663 (1957).
98. Luch J. M., Wilcox A., *J. Biol. Chem.* **205**, 859 (1953).
99. Mandeles R. S., Koppelman R., Hanke M. E., *J. Biol. Chem.* **209**, 327 (1954).
100. Mann P. J. G., *Biochem. J.* **70**, 623 (1961).
101. Martinez-Carrion M., Jenkins W. T., *J. Biol. Chem.* **240**, 3538 (1965).
102. Matsuo Y., Greenberg D. M., *J. Biol. Chem.* **230**, 561 (1958), **234**, 507, 516 (1959).
103. Meister A., Wellner D., *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, Academic Press, New York 1962, t. 6, str. 609.
- 103a. Meister A., *Adv. Enzymol.* **16**, 185 (1955).
104. Meister A., *Biochemistry of the Amino Acids*, Academic Press, New York, London, 1965, t. I, str. 407.
105. Meister A., Sober H. A., Fice S. V., *J. Biol. Chem.* **189**, 577, 591 (1951).
106. Metzler D. E., Ikawa M., Snell E. E., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 648 (1954).
107. Metzler D. E., Snell E. E., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 979 (1952).
108. Metzler D. E., Olivard J., Snell E. E., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 644 (1954).
109. Metzler D. E., Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **198**, 353 (1952).
110. Metzler D. E., Longenecker J. B., Snell E. E., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 639 (1954).

111. Metzler D. E., Longenecker J. B., Snell E. E., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 2786 (1953).
112. Mix H., *Z. Physiol. Chem.* **315**, 1 (1959).
113. Mix H., Welcke F. W., *Naturwissenschaften* **47**, 133 (1960).
114. Morino Y., Sakamoto Y., *J. Biochem.* **48**, 733 (1960).
115. Morino Y., Wada H., Mori T., Sakamoto Y., Ichikara K., *J. Biochem.* **48**, 18 (1960).
116. Nakada H. J., *J. Biol. Chem.* **204**, 831 (1953).
117. Narrod S. A., Woow W. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **35**, 462 (1952).
118. Natarajan S., *Chem. Abstr.* **58**, 715 (1963).
119. Newton W. A., Snell E. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 328 (1964).
120. Newton W. A., Morino Y., Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **240**, 1211 (1965).
121. Nishimura J. S., Greenberg D. M., *J. Biol. Chem.* **236**, 2684 (1961).
122. Nishimura J. S., Manning J. M., Meister A., *Biochemistry* **1**, 422 (1962).
123. Novogrodsky A., Nishimura J. S., Meister A., *J. Biol. Chem.* **238**, PC 1903 (1963).
124. Novogrodsky A., Meister A., *J. Biol. Chem.* **239**, 879 (1964).
125. O'Kane D., Gunsalus I. C., *J. Biol. Chem.* **170**, 425 (1947).
126. Olivard J., Metzler D. E., Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **199**, 669 (1952).
127. Pilgeram E. O., Gal E. M., Sasseuroth E. N., Greenberg D. M., *J. Biol. Chem.* **204**, 367 (1953).
128. Pitot H. C., Peraino C., *J. Biol. Chem.* **238**, PC 1910 (1963).
129. Polanowski O. L., *Biochimia* **27**, 734 (1962).
130. Polanowski O. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 364 (1960).
131. Rabinowitz J. C., Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **176**, 1157 (1948).
132. Raczyńska-Bojanowska K., Bełżecka K., *Post. Biochem.* **6**, 163 (1960).
133. Reddy S. K., Reynolds M. S., Price J. M., *J. Biol. Chem.* **233**, 691 (1958).
134. Rosenberg H. R., *Chemistry and Physiology of the Vitamins*, Interscience, New York 1945.
135. Runyan T. J., Gershaff S. N., *J. Biol. Chem.* **240**, 1889 (1965).
136. Sakami W., *Amino Acid Metabolism*, red. W. D. Mc Elroy, H. B. Glass, Johns Hopkins, Baltimore 1955, str. 658.
137. Sayre F. N., Greenberg D. M., *J. Biol. Chem.* **220**, 787 (1956).
138. Schales O., *The Enzymes*, red. J. B. Sumner, K. Myrback, Academic Press, New York 1945.
139. Schirch L., Mason M., *J. Biol. Chem.* **237**, 2578 (1962), **238**, 1032 (1963).
140. Schwarz R., Kjeldgaard N. O. *Biochem. J.* **48**, 333 (1951).
141. Selim A. S. M., Greenberg D. M., *J. Biol. Chem.* **234**, 1474 (1959).
142. Shemin D., Russel C. S., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4873 (1953).
143. Shemin D., Abramsky T., Russel C. S., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 1204 (1954).
144. Shemin D., Russel C. S., Abramsky T., *J. Biol. Chem.* **215**, 613 (1955).
145. Shockman G. D., Toennies G., *Arch. Biochem. Biophys.* **50**, 9 (1954).
146. Shukuya R., Schwart G. W., *J. Biol. Chem.* **235**, 1649 (1959).
147. Shukuya R., Schwart G. W., *J. Biol. Chem.* **235**, 1653 (1959).
148. Snell E. E., *Vitamins and Hormones* **16**, 77 (1958).
149. Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **154**, 313 (1955).
150. Snell E. E., *Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis*, red. E. E. Snell, P. M. Fasella, A. Brunstein, A. Rossi, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1963, str. 1.
- 150a. Snell E. E., *Brookhaven Symp. Biol.* **15**, 32 (1962).

151. Sprinson D. B., Conlon A., *J. Biol. Chem.* **207**, 585 (1954).
152. Stadtman T. C., Elliot P., *J. Biol. Chem.* **228**, 983 (1957).
153. Stoll A., Seebeck E., *Adv. Enzymol.* **11**, 377 (1951).
154. Szentirman A., Horwath I., *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung* **9**, 23 (1962).
155. Tabor C. W., Tabor H., Rosenthal S. M., *J. Biol. Chem.* **208**, 645 (1954).
156. Tanaka M., Kato Y., Kinoshita S., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **4**, 114 (1961).
157. Thayer P. S., *J. Bacteriol.* **78**, 150 (1959).
158. Thorne C. B., Gomez C. B., Honsewright C. D., *J. Bacteriol.* **69**, 357 (1955).
159. Thorne C. B., Molnar D. M., *J. Bacteriol.* **70**, 420 (1955).
160. Torczyński I. M., *Biochimia* **27**, 916 (1962).
161. Tołosa E. A., Goriaczenkowa E. W., *Biochimia* **31**, 98 (1966).
162. Turano C., Giartosio A., Riva F., Vecchini P., Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis, red. E. E. Snell, P. M. Fasella, A. Braunstein, A. Rossi, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1963, str. 149.
163. Uchida U., Takemoto Y., Kalihara Y., Ichikara K., *Med. J. Osaka Univ.* **3**, 509 (1953).
164. Uspenskaia V. D., Goriaczenkowa E. W., *Biochimia* **23**, 212 (1958).
165. Velick S. F., Vavra J., The Enzymes, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, Academic Press, New York 1960, str. 219, t. 6.
166. Velick S. F., Vavra J., *J. Biol. Chem.* **237**, 2109 (1962).
167. Virtanen A. I., Laine T., *Enzymologia* **3**, 266 (1937).
168. Wada H., Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **237**, 133 (1962).
169. Wakil S. J., *Comp. Biochem. Physiol.* **4**, 123 (1962).
170. Warren S., Zerner B., Westheimer F. H., *Biochemistry* **3**, 817 (1966).
171. Westheimer F. H., The Enzymes, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, Academic Press, New York, 1960, t. I, str. 259.
172. Werle E., Koch W., *Biochem. Z.* **319**, 305 (1949).
173. Wilson E. M., *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 345 (1963).
174. Wilson E. M., Kornberg H. L., *Biochem. J.* **88**, 578 (1963).
175. Wilson E. M., Snell E. E., *Biochem. J.* **83**, IP (1963).
176. Wilkinson A. P., Davies D. D., *Nature* **181**, 1070 (1958).
177. Wood W. A., Gunsalus I. C., *J. Biol. Chem.* **190**, 403 (1951).
178. Wood W. A., Gunsalus I. C., *J. Biol. Chem.* **181**, 171 (1949).
179. Wood W. A., Gunsalus I. C., Umbreit W. W., *J. Biol. Chem.* **170**, 313 (1947).
180. Wright B. E., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 165 (1955).
181. Yanofsky C., Reissig I. L., *J. Biol. Chem.* **202**, 567 (1953).
182. Yasunobu K. T., Yamada H., Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis, red. E. E. Snell, P. M. Fasella, A. Braunstein, A. Rossi, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1963.
183. Zabin J., Mead J. F., *J. Biol. Chem.* **24**, 87 (1954).
184. Zeller E. A., *Helv. Chim. Acta* **21**, 880 (1942).
185. Zeller E. A., *Adv. Enzymol.* **2**, 93 (1942).
186. Zeller E. A., Barsky J., Fontz J. R., Kirchheimer W. F., Van Orden L. L., *Experientia* **8**, 349 (1952).
187. Zerner B., Couthis S. M., Lederer F., Waters H. H., Westheimer F. H., *Biochemistry* **5**, 813 (1966).
188. Zink M. W., Sanawal B. D., *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 72 (1962).



ANDRZEJ LEONOWICZ\* I JERZY TROJANOWSKI\*\*

## Biologiczny rozkład ligniny

### The Biological Decomposition of Lignin

A review of the literature concerned with the studies of the biological mechanism of lignin degradation, including the authors' own results, is given.

Nazwę „lignina” wprowadził Anselme Payen w roku 1838 dla oznaczenia substancji inkrustującej celulozę w zdrewniałych ścianach komórek roślin (38, 39). Drewnienie, czyli lignifikacja ściany komórkowej łączy się ze zmianą funkcji biologicznej komórki, której plazma po zakończeniu tego procesu zamiera. Najwięcej ligniny zawierają martwe komórki sklerenchymy i części naczyniowej wiązek przewodzących. Zawartość ligniny wzrasta wraz z wiekiem rośliny i dosięgać może w drzewach iglastych do 29%, a w liściastych do 26% suchej masy.

W rozwoju filogenetycznym roślin lignina pojawiła się po raz pierwszy u paprotników; glony i mchy nie zawierają tej substancji.

Lignina przy rozkładzie martwych resztek roślin znacznie trudniej ulega atakowi mikroflory niż celuloza. Produkty jej rozkładu nagromadzają się w glebie tworząc tak zwaną próchnicę. Zagadnienie biogenezy humusu z ligniny było omawiane w *Postęпах Biochemii* z roku 1961 (51), oraz w *Wiadomościach Botanicznych* z roku 1966 (50).

### I. Chemiczna struktura ligniny

Ogólnie przyjęto uważać ligninę za polimer jednostek fenylopropanowych. Bardziej wnikliwe badania struktury ligniny napotykają na duże trudności metodyczne. Silne powiązanie ligniny z hemicelulozami w kompleks lignino-węglowodanowy poważnie utrudnia izolowanie ligniny z materiału roślinnego. W skład komponenty węglowodanowej wchodzi: ksylany, mannany, arabany, glukany i galaktany (2). Powiązanie ligniny

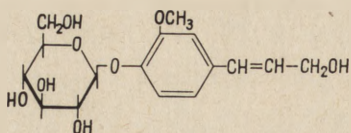
---

\* Dr, adiunkt Katedry Biochemii Uniwersytetu im. Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

\*\* Doc. dr, kierownik Katedry Biochemii Uniwersytetu im. Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

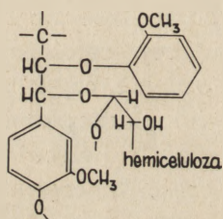
Wykaz stosowanych skrótów: DIECA — dwuetylodwutiokarbaminian sodu.

z węglowodanami ma w głównej mierze charakter glikozydowy, jak na przykład w przypadku rozpowszechnionej w świecie roślin koniferyny (24) (rysunek 1).



Rys. 1. Wiązanie glikozydowe w koniferynie jako przykład typu wiązań występujących między ligniną a hemicelulozami.

Stwierdzono również wiązania eterowe pomiędzy węglem  $\alpha$  łańcucha bocznego podjednostki fenylopropanowej ligniny a resztą hemicelulozy (1) (rysunek 2).



Rys. 2. Wiązanie eterowe pomiędzy węglem  $\alpha$  łańcucha bocznego podjednostki fenylopropanowej ligniny a resztą hemicelulozy.

Współczesne metody wydrębnienia ligniny z materiału roślinnego polegają na stosowaniu łagodnych środków rozrywających wiązania lignino-hemicelulozowe. Głównie stosuje się bądź metodę enzymatyczną polegającą na hydrolizie celulozy i hemicelulozy, bądź metodę ekstrakcyjną.

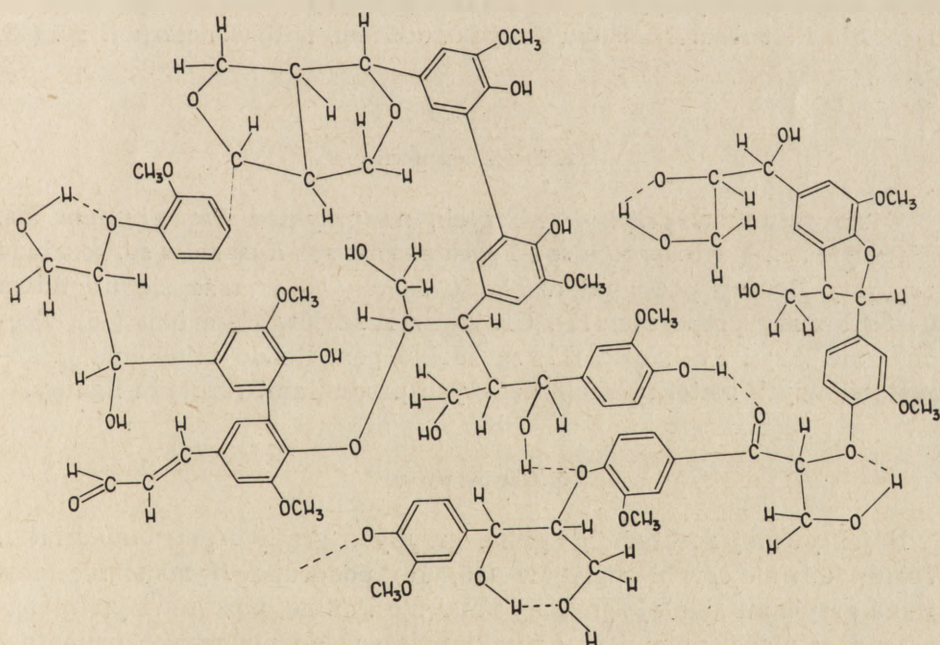
W metodzie enzymatycznej opracowanej w 1950 r. przez Norda i Schuberta (37) oddziałuje się na sproszkowany materiał drzewny grzybami celulolitycznymi. Pod działaniem celulaz otrzymuje się pozbawioną węglowodanów „ligninę biochemiczną”. Jednakże, jak wynika z doniesień z ostatnich lat, grzyby celulolityczne zawierają enzymy oddziaływające utleniająco na ligninę, między innymi lakazę i peroksydazę (42—44), zatem „lignina biochemiczna” zapewne nie jest zupełnie identyczna z naturalną. Metoda ekstrakcji ligniny, opracowana przez Björkmana (2—6) i Pew (40), polega na starannym rozdrobnieniu w młynie kulowym mączki drzewnej zawieszanej w toluenie. Dyfundujący do komórek toluen powoduje według Björkmana ich pęcznienie i pęknięcie ścian przy jednoczesnym rozluźnieniu wiązań między ligniną a hemicelulozą. Ze zmielonego produktu ekstrahuje się ligninę wodnym roztworem dioksanu, a następnie wytrąca się ją eterem etylowym. Za pomocą metody Björkmana można uzyskać do 30% ligniny zawartej

w zdrewniałych tkankach. Zawartość węglowodanów w preparacie nie przekracza 2<sup>o</sup>o.

Badania oczyszczonych preparatów ligniny wykazały, że jest ona polimerem podjednostek fenylopropanowych, zawierających podstawniki hydroksylowe, karbonylowe i karboksylowe. Zawartość grup funkcyjnych jest zmienna i zależy w pewnym stopniu od materiału wyjściowego i sposobu wyodrębniania preparatu.

Elementarna analiza ligniny otrzymanej metodą Björkmana z drewna jodły wykazuje 83,84<sup>o</sup> C, 6,04<sup>o</sup> H, 29,68<sup>o</sup> O, 15,79<sup>o</sup> OCH<sub>3</sub>. Masa cząsteczkowa ligniny Björkmana jest rzędu 11 000, co odpowiada około 60 jednostkom fenylopropanowym. Obliczony na podstawie analizy wzór podjednostki fenylopropanowej jest następujący: C<sub>9</sub>H<sub>8,83</sub>O<sub>2,37</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>0,96</sub> co w przybliżeniu odpowiada rodnikowi koniferyłowemu (alkohol koniferylowy minus jeden wodór): C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>.

Preparat Björkmana mimo zanieczyszczenia polisacharydami jest obecnie uznany za najbardziej zbliżony do ligniny naturalnej. W wyniku ostatnich badań, prowadzonych głównie przy użyciu preparatu Björkmana jako modelu, osiągnięto znaczne postępy w poznaniu budowy



Rys. 3. Struktura ligniny według Braunsa z uwzględnieniem wiązań wodorowych.

makrocząsteczki ligniny. Ostatnio podjęto próby określenia drugorzędowej struktury ligniny, zakładając obecność mostków wodorowych. Mostki wodorowe mogą występować na przykład pomiędzy grupami hydroksylowymi a tlenem tworzącym wiązanie eterowe (7) (rysunek 3).

## II. Mikroorganizmy biorące udział w rozkładzie ligniny

W rozkładzie ligniny w naturze biorą udział niektóre gatunki bakterii, *Fungi imperfecti* i grzyby z grupy *Hymenomycetales*.

### 1. Bakterie

Spośród bakterii glebowych według Fischera (17) zdolne do wykorzystywania ligniny jako źródła węgla są: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas statzeri*, *Pseudomonas tabaci* oraz kilkanaście innych gatunków nie notowanych w systematyce Bergeya. Bakterie te rozkładają preparaty ligniny, uprzednio przeprowadzane działaniem fenolu w formę rozpuszczalną. Higuchi i wsp. (28) wykazali, że również preparaty ligniny Braunsa (8) mogą być źródłem węgla dla kilku gatunków *Flavobacterium*. Ligninę Braunsa otrzymuje się na drodze ekstrakcji drewna metanolem, jest ona mieszaniną niskocząsteczkowych polimerów fenylopropanowych typu lignanów. Według Sundman (40) kultury *Mycobacterium rhodochrous* i *Mycobacterium fortunatum* demetylują ligninę Braunsa. Lignany mogą być źródłem węgla dla *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.* i *Agrobacterium sp.* (48, 49).

### 2. Fungi imperfecti

Wiele gatunków grzybów niższych, na przykład *Stemphylium sp.*, *Alternaria sp.*, *Macrosporium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Fusarium sp.* rozkłada preparaty ligniny poddanej działaniu fenolu co wyraża się ubytkiem 10—60% masy preparatu (17). Grzyby z rodzajów *Fusarium* (46), *Trichoderma* (23) i *Pullularia* (27) są zdolne ponadto do utleniania niskocząsteczkowych metoksyfenoli, będących produktami rozkładu ligniny.

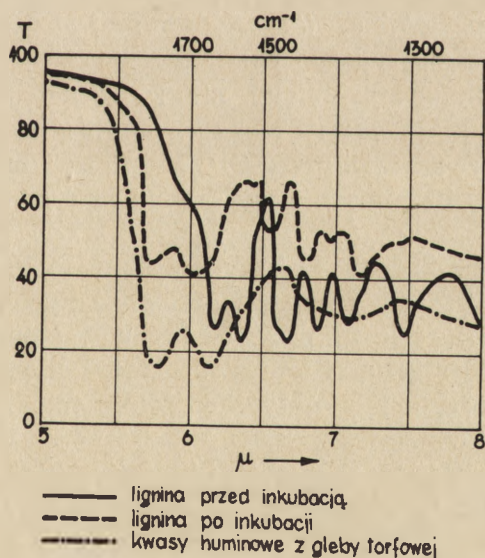
### 3. Grzyby wyższe

Najaktywniej rozkładają ligninę grzyby z grupy *Hymenomycetales*. Według dawniejszych poglądów (15, 16) podgrupa *Hymenomycetales* zwana grzybami „białej zgnilizny” atakuje ligninę, pozostawiając nienaruszoną celulozę, natomiast gatunki należące do podgrupy „brunatnej zgnilizny” rozkładają celulozę nie działając na ligninę. W obrębie podgrupy „białej zgnilizny” na podstawie nowszych badań (9—12) można wyróżnić trzy typy grzybów: 1) grzyby rozkładające w pierwszym stadium ligninę i wolne pentozany, później zaś w mniejszym stopniu celulozę, na przykład *Polyporus versicolor*, 2) grzyby rozkładające na początku celulozę, później zaś ligninę i wolne pentozany, na przykład

*Armillaria mellea*, 3) grzyby działające na ligninę i celulozę równocześnie, na przykład *Ganoderma applanatum*. Jedynie grzyby „białej zgnilizny” wydzielają do środowiska enzymy powodujące rozbitcie cząsteczki ligniny. Natomiast grzyby „brunatnej zgnilizny” mogą powodować tylko częściowe utlenianie tego polimeru, co objawia się brunatną barwą podłoża. Do najaktywniejszych destruktorów ligniny zalicza się grzyby „białej zgnilizny” z rodzajów: *Polyporus*, *Trametes* i *Collybia*. Obecnie znamy ponad 200 gatunków grzybów zdolnych do rozkładu ligniny. Obszerną monografię grzybów rozkładających drewno opracował R y p a c e k (45).

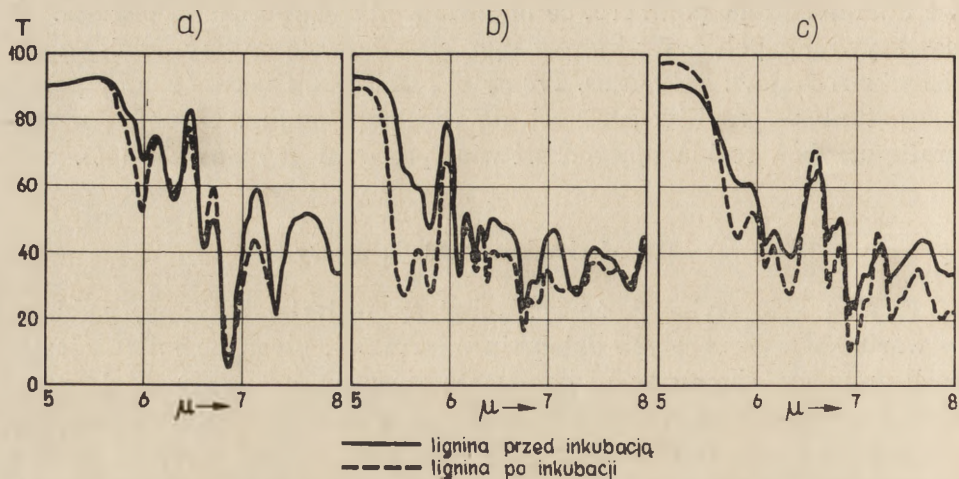
### III. Mechanizm rozkładu ligniny

Flaig (18) wykazał, że rozdrobniony materiał roślinny, poddany w warunkach aerobowych działaniu mikroflory, ulega po kilku miesiącach zmianom chemicznym: obniża się znacznie zawartość węglowodanów, a w mniejszym stopniu także ligniny, wzrasta natomiast ilość azotu aminowego i hydroksyli fenolowych. Następuje również wyraźny spadek zawartości grup metoksyowych. Według Flaiga (18) krzywa absorpcji w podczerwieni dla ligniny wyekstrahowanej z materiału roślinnego po inkubacji z mikroflorą wykazuje przebieg zbliżony do krzywych charakterystycznych dla typowych preparatów humusowych (rysunek 4).



Rys. 4. Krzywe absorpcji w podczerwieni dla ligniny wyekstrahowanej metodą Björkmana przed i po inkubacji materiału roślinnego z mikroflorą glebową (czas inkubacji 410 dni) oraz krzywa absorpcji dla preparatu huminowego według Flaiga (8).

Podobnym zmianom ulega czysta lignina Björkmana inkubowana z czystymi kulturami grzybów *Polyporus versicolor* (30), *Poria subacida* (20) i *Pholiota mutabilis* (54) (rysunek 5).



Rys. 5. Krzywe absorpcji w podczerwieni dla ligniny przed i po inkubacji z czystymi kulturami *Hymenomycetales*.

a) *Polyporus versicolor* (wg 30), b) *Poria subacida* (wg 20) c) *Pholiota mutabilis* (wg 54).

Na ogół w miarę postępu biologicznego rozkładu wzrasta intensywność pasma  $5,8 \mu$ , co wskazuje na przybywanie grup  $C=O$  oraz zmniejsza się intensywność pasma  $7,3 \mu$ , co spowodowane jest drganiami deformacyjnymi układów  $CH$  w grupach  $CH_2$ .

W przypadku inkubacji ligniny nie związanej z hemicelulozami zwiększa się absorpcja w pasmach  $7-7,1 \mu$  oraz  $7,9 \mu$  (rysunek 5) co wskazuje na wzrastanie zawartości grup  $-OH$ ; efektu tego nie zaobserwowano gdy rozkładowi ulega lignina nie wyodrębniona z materiału roślinnego (rysunek 4).

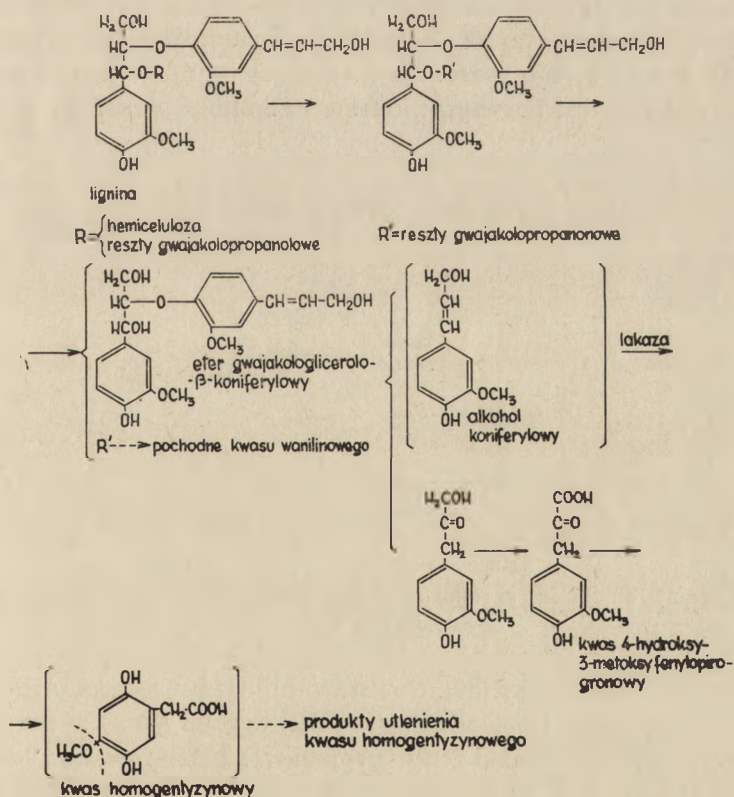
Szeroko zakrojone badania nad wykorzystaniem ligniny jako źródła węgla przeprowadzili Day i wsp. (13). Z 35 badanych gatunków *Hymenomycetales* tylko 11 rosło na pożywce ligninowej pozbawionej innego źródła węgla. Niektóre gatunki (*Poria subacida*, *Polyporus abietinus*) po kilkutygodniowej adaptacji dawały szczególnie intensywny wzrost na pożywce ligninowej (22).

Badania przeprowadzone w ostatnich kilkunastu latach, rzucają nowe światło na mechanizm biologicznego rozkładu ligniny. W 1954 r. van Vliet (55) zauważył, że nie tylko kultura grzybowa, ale również wolny od mycelium przesącz powoli utlenia preparat ligniny Braunsa. Pani Kathleen Law (33) wykazała, że surowy preparat enzymatyczny uzyskany przez wysolenie przesączu po hodowli *Polyporus sanguineus* utlenia powoli ligninę Norda. Trojanowski i Leonowicz (52)

inkubując przesącz po hodowli *Pholiota mutabilis* z ligniną Björkmana po 64 godz. stwierdzili prawie 2% ubytku masy nierozpuszczalnej ligniny w porównaniu z kontrolą. Z badań tych wynika, że grzyby oddziałują na ligninę za pomocą enzymów wydzielanych do podłoża. Efektem tego oddziaływania jest częściowe utlenienie i depolimeryzacja ligniny.

W ostatnich latach zajęto się identyfikacją metabolitów pojawiających się podczas tych procesów.

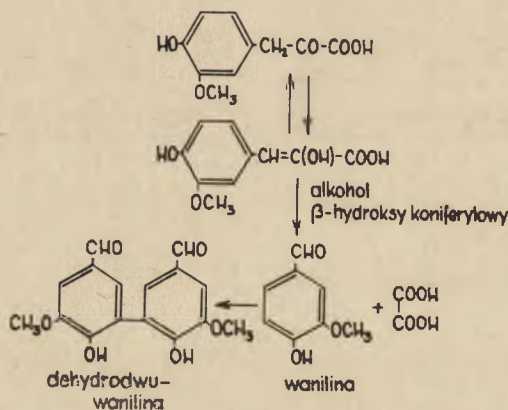
W 1960 r. F u k u z u m i (20) metodą chromatografii bibułowej zidentyfikował w kulturze grzyba *Poria subacida*, hodowanego na pożywce płynnej z dodatkiem ligniny Norda, kwas *p*-hydroksy-*m*-metoksyfenylopirogronowy. W kulturze tego grzyba hodowanego przez 6 miesięcy na maczce drzewnej wykrył on nadto eter gwajakologlicerolo- $\beta$ -koniferylowy i kwas wanilinowy. Na podstawie tych obserwacji oraz dawniej uzyskanych danych F u k u z u m i wysunął pierwszą koncepcję mechanizmu biologicznego rozkładu ligniny (20). Założył on, że pierwszymi produktami depolimeryzacji ligniny są gwajakolopropanony (R'), które pod wpływem oksydaz przechodzą w związki pozbawione łańcucha propanowego, na przykład w kwas wanilinowy. Udział lakazy sprowadza się według tego schematu do utleniania grup -OH w koniferolu (rysunek 6).



Rys. 6. Schemat rozkładu ligniny według F u k u z u m i (20).

Kilka lat później Fukuzumi i Shibamoto (21) wyodrębnili z hodowli grzyba *Poria subacida* na mączce drzewnej, bliżej nieokreślony enzym, który katalizuje rozrywanie wiązania arylo-eterowego w związkach uważanych za model ligniny. Częściowo oczyszczony preparat tego enzymu katalizuje rozkład cząsteczki eteru weratroglicerolo- $\beta$ -gwajakolowego na gwajakol i weratroglicerol lub odpowiedni hydroksydwumetoksyfenylopropanon. Doniesienie to wymaga potwierdzenia i weryfikacji metodycznej, gdyż warunki ekstrakcji nie dawały gwarancji czy enzym ten pochodzi z grzybni, czy z mączki drzewnej.

W pracowni Norda (30) identyfikowano produkty rozkładu ligniny przez kultury *Polyporus versicolor*, *Polyporus hirsutus*, *Poria subacida*, *Fomes fomentarius* i *Trametes pini*. W hodowlach tych organizmów na pożywkach zawierających preparaty ligniny Björkmana, Norda i Braunsa, zidentyfikowano chromatograficznie w podłożu następujące metabolity: eter gwajakologlicerolo- $\beta$ -koniferylowy, aldehyd koniferylowy,  $\alpha$ -hydroksypropanowanillon, keton wanilloilometylowy, kwas ferulowy, kwas 4-hydroksy-3-metoksyfenylopirogronowy, kwas wanilinowy, wanilinę, dehydrodwuwanilinę i kwas szikimowy. W 1963 Ishikawa i wsp. (31) stwierdzili u grzyba *Fomes fomentarius* przemianę eteru weratroglicerolo- $\beta$ -gwajakolowego na gwajakologlicerol, wanilinę i kwas wanilinowy. Inny gatunek grzyba — *Polyporus versicolor* — nie wytwarza gwajakologlicerolu z tego eteru. Na uwagę zasługuje wykrycie związków o skróconym łańcuchu bocznym: kwasu i alkoholu wanilinowego, wani-

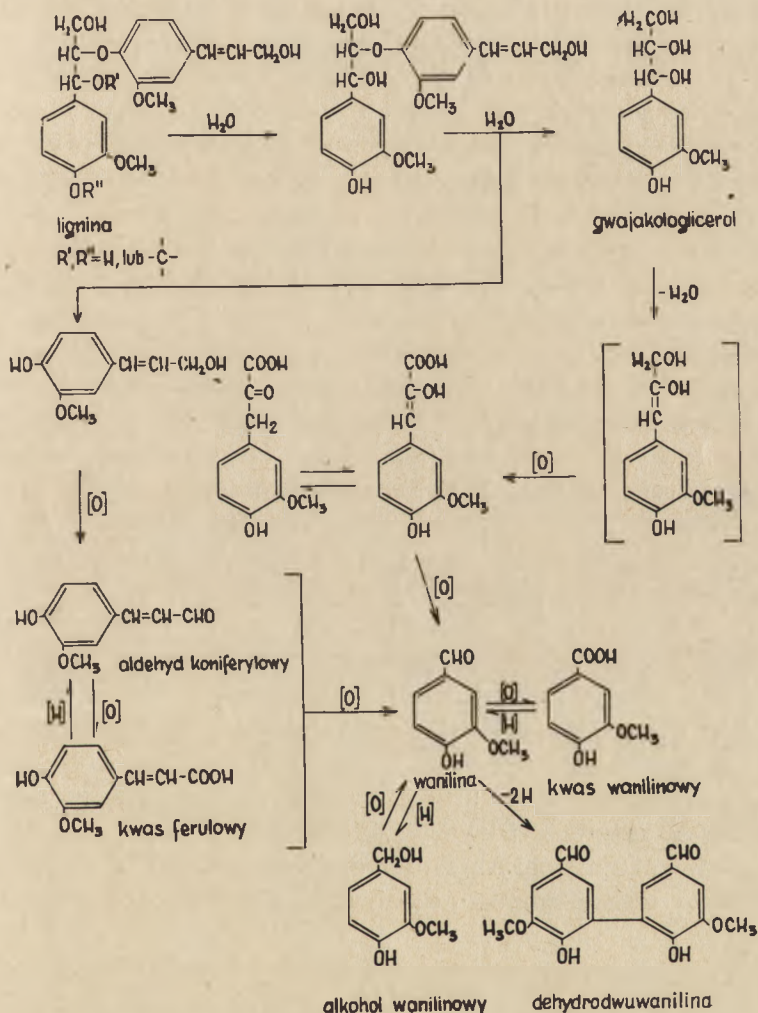


Rys. 7. Schemat działania peroksydazy na produkty rozkładu ligniny według Ishikawa (29).

liny i dehydrodwuwaniliny (30). Powstawanie tych produktów przypisują Ishikawa i wsp. (32) oddziaływaniu egzoenzymów: peroksydazy i częściowo lakazy na związki fenylpropanowe. Enzymy te wyodrębniono z kultur grzybowych i oczyszczono częściowo metodą chromatografii na DEAE-celulozie. Zarówno peroksydaza z grzybów, jak i peroksydaza



z chrzanu, a także lakaza z pieczarek, katalizowały skracanie łańcuchów bocznych w związkach fenylopropanowych, natomiast tyrozynaza z grzybów nie wykazywała tej aktywności. Preparaty peroksydazy powodowały nadto dimeryzację waniliny do dehydrowaniliny (29) (rysunek 7). Na podstawie tych wyników Ishikawa i wsp. (31) zaproponowali inny schemat rozkładu ligniny, który uwzględnia wśród produktów rozkładu ligniny związki o skróconym łańcuchu bocznym. (rysunek 8).



Rys. 8. Schemat rozkładu ligniny według Ishikawa (31).

Za pierwsze produkty depolimeryzacji ligniny przyjęto gwajakoglicerol i alkohol koniferylowy. Założenie to opiera się jednak tylko na doświadczeniach nad grzybem *Fomes* i nie jest potwierdzone u innych gatunków. Podkreślić też należy nikłą wydajność wymienionych produktów w wa-

runkach doświadczenia. Proponowany przez Ishikawę schemat wymaga zatem dalszych potwierdzeń.

Schematy podane przez Fukuzumi i przez Ishikawę i wsp. nie wyjaśniają mechanizmu demetylacji makrocząsteczki ligniny, która zachodzi zawsze podczas biologicznego rozkładu ligniny, lub jej związków modelowych. Demetylację makrocząsteczek ligniny stwierdzili na przykład Ishikawa i wsp. (30) w kulturze *Poria subacida* rosnącego na pożywce płynnej zawierającej ligninę. Wykryli oni ponadto aromatyczne metabolity pozbawione grup metoksylowych, na przykład kwas *p*-hydroksybenzoesowy, kwas *p*-hydroksycynamonowy i aldehyd *p*-hydroksycynamonowy, jednakże w swoim schemacie rozkładu ligniny pomijają proces demetylacji.

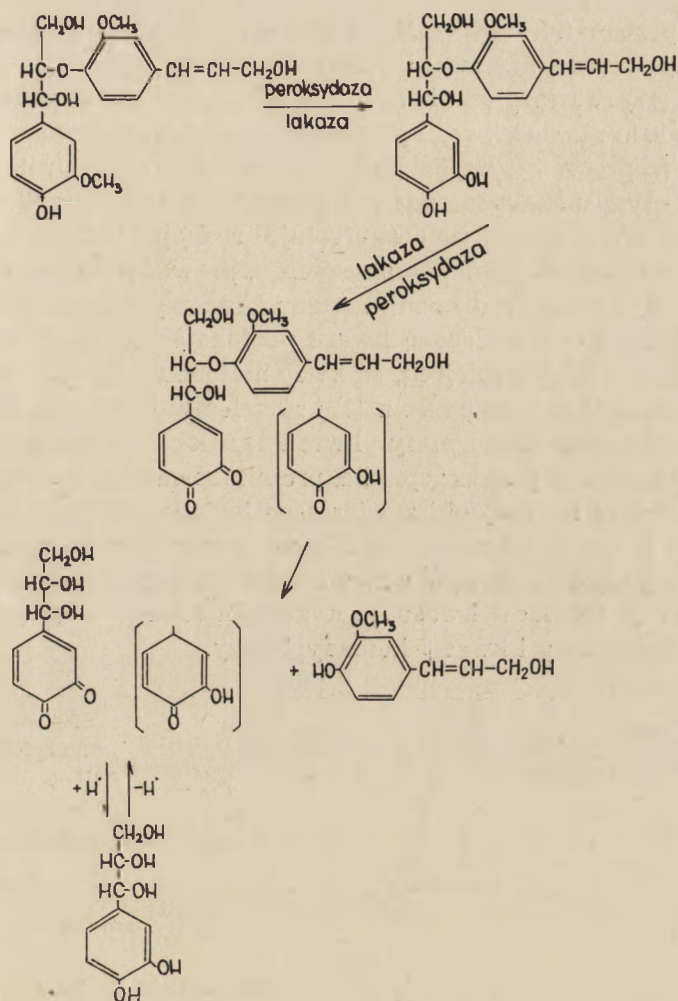
Demetylację związków modelowych ligniny pod wpływem kultur, lub przesączu po kulturach grzybowych, wykazali również inni autorzy (25, 26, 36, 53). Procesowi demetylacji ulegają zarówno związki modelowe ligniny z jednym ugrupowaniem  $-OCH_3$  (np. kwasy *o*-, *m*-, *p*-metoksybenzoesowe, wanilina, kwas ferulowy), jak i z dwoma grupami  $-OCH_3$  (np. aldehyd lub kwas weratrowy).

W naszej pracowni (53) stwierdzono, że przesącz po kulturze *Pholiota mutabilis* inkubowany przez 24 godz. z ligniną bądź kwasem wanilinowym zmniejsza zawartość  $-OCH_3$  w ligninie o 12%, a w kwasie wanilinowym o 27%. Dodatek nadtlenu wodoru zwiększa demetylację, natomiast hydroksylamina, inhibitor peroksydazy, i DIECA, inhibitor lakazy, w stężeniu 1 mM hamują częściowo ten proces. Jednocześnie wprowadzenie do środowiska reakcji obu inhibitorów powodowało całkowite zahamowanie demetylacji.

Wyniki tych doświadczeń nasuwają przypuszczenie, że proces demetylacji ligniny może być katalizowany przez peroksydazę bądź przez lakazę. Dalsze badania (35) wykazały, że w przesączu po czterotygodniowej hodowli *Pholiota mutabilis* poziom aktywności peroksydazy jest rzędu 10 jednostek PZ, a poziom aktywności lakazy sięga 1120 jednostek. Wprowadzenie ligniny do kultury grzyba powodowało jednak tylko 2-krotny wzrost aktywności lakazy i aż 9-krotny peroksydazy. Wyodrębniona w stanie znacznie oczyszczonym peroksydaza (34) wydzielana przez grzyb *Pholiota mutabilis* miała aktywność właściwą 675 jednostek PZ (aktywność krystalicznej peroksydazy z roślin wyższych wynosi 1150 jednostek PZ). Preparat peroksydazy z grzyba katalizował demetylację ligniny, kwasu wanilinowego i waniliny w obecności  $H_2O_2$ . Podobnie, lecz słabiej działa peroksydaza z chrzanu. Produktem demetylacji waniliny był kwas protokatechusowy, z kwasu ferulowego powstał kwas kawowy (34).

Na podstawie tych doświadczeń przypuszczamy, że główną rolę w depolimeryzacji ligniny odgrywa demetylacja, a następnie utlenianie wytworzonych *o*-dwufenoli. Zakładamy, że demetylacja ligniny katalizowana

lizowania jest głównie przez peroksydazę, zaś produkty demetylacji z ugrupowaniem *o*-dwufenolowym utleniane są przez lakazę. Rozrywanie wiązań eterowych przypisujemy nie działaniu nieznanego enzymu „lignazy”, lecz wpływowi elektrofilnemu ugrupowania *o*-chinonowego powstającego po demetylacji i utlenieniu (rysunek 9).



Rys. 9. Hipotetyczny schemat rozkładu ligniny według Trojanowskiego i wsp. (53) na przykładzie eteru gwajakologlicerolo- $\beta$ -koniferylowego, związku modelowego ligniny.

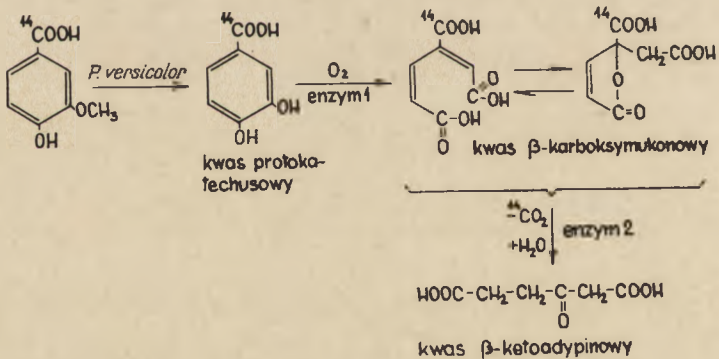
Badania innych autorów potwierdzają tę koncepcję. Rozrywanie wiązania eterowego przy węglu- $\beta$  łańcucha bocznego eteru weratroliglicerolo- $\beta$ -gwajakolowego jest połączone z demetylacją reszty weratrolowej. Po czterech dniach inkubacji kultury *Fomes fomentarius* z tym eterem Ishikawa i wsp. (31) zidentyfikowali chromafograficznie

w środowisku kultury eter gwajakologlicerolo- $\beta$ -gwajakolowy oraz wani-  
linę i kwas wanilinowy.

#### IV Metabolizm niskocząsteczkowych produktów rozkładu ligniny

Dalsze przemiany niskocząsteczkowych produktów rozkładu ligniny rozpoczynają się od rozerwania pierścienia aromatycznego. W 1950 r. St a n i e r (47) zauważył, że homogenat z komórek *Pseudomonas fluorescens* powoduje rozkład kwasu protokatechusowego do kwasu  $\beta$ -ketoadypinowego. W procesie tym działają oksygenazy kwasu protokatechusowego, przy czym u *Pseudomonas* wykazano dwie drogi metaboliczne (41). Pierwsza z nich, którą zapoczątkowuje reakcja katalizowana przez 3-4-oksygenazę kwasu protokatechusowego, prowadzi do kwasu bursztynowego i acetylokoenzymu A. Produktami końcowymi drugiej drogi katalizowanej przez 4-5-oksygenazę kwasu protokatechusowego rozszczepiającą pierścień w innym miejscu, są kwas malonowy i pirogronowy.

W 1961 r. pani H e n d e r s o n (27) również w kulturach grzybowych wykazała obecność oksygenazy kwasu protokatechusowego stosując oryginalną technikę przeszczepiania preinkubowanego mycelium z pożywki glikozowej na pożywki zawierające badane aromatyczne związki. Umożliwiło to analizę środowiska nie zanieczyszczonego pokarmowymi składnikami pożywki. H e n d e r s o n chromatograficznie zidentyfikowała produkty rozkładu kwasu protokatechusowego z grzybów: kwas  $\beta$ -karboksymukonowy i kwas  $\beta$ -ketoadypinowy.



Rys. 10. Schemat wyjaśniający rozrywanie pierścienia aromatycznego w związkach modelowych ligniny u *Polystictus versicolor* według H a i d e r a (26).

Mechanizm rozerwania pierścienia aromatycznego przez grzyby w związkach modelowych ligniny badali H a i d e r i w s p. (25) w pracowni Flaiga. Wprowadzali oni kwas wanilinowy znakowany  $^{14}\text{C}$  w grupie karboksylowej do kultury *Polystictus versicolor*. Po 10-dniowej inkubacji

w homogenacie z mycelium chromatograficznie zidentyfikowali radioaktywny kwas protokatechusowy, radioaktywny kwas  $\beta$ -karboksymukonowy i jego lakton oraz nieradioaktywny kwas  $\beta$ -keto-adypinowy (rysunek 10). Wytworzony kwas  $\beta$ -ketoadypinowy oraz inne kwasy dwukarbo sylowe zużytkowywane są w cyklu Krebsa.

Przypuszcza się, że również odszczepione od ligniny grupy metoksylo we przyswajane są przez grzyby. Być może są one przenoszone w postaci fragmentu jednowęglowego na serynę i metioninę. Jak wykazali Flaig i Haider (19) grzyb *Polystictus* wbudowuje radioaktywny atom węgla z kwasu wanilinowego zawierającego piętnowaną  $^{14}\text{C}$  grupę metoksyłową do tych aminokwasów. Nie wiadomo, czy odgrywa tu rolę także katecholo-o-metylo-transferaza zidentyfikowana dotychczas tylko u zwierząt i roślin wyższych (14).

### V. Uwagi końcowe

Dotychczasowe wyniki badań nad biologicznym rozkładem ligniny wskazują, że proces ten ma charakter enzymatyczny, przy czym ważną rolę odgrywają tu peroksydaza, lakaza i oksigenaza kwasu protokatechusowego. W początkowym etapie rozkładu ligniny istotną rolę odgrywa demetylacja. W łańcuchu reakcji uczestniczących w biologicznym rozkładzie ligniny wyróżniają się dwa etapy: w pierwszym powstają niskocząsteczkowe związki o charakterze aromatycznym (proces odbywa się pozakomórkowo, w reakcji bierze udział peroksydaza i lakaza), w drugim zaś, na skutek oddziaływania enzymów wewnątrzkomórkowych, następuje rozerwanie pierścienia aromatycznego, a także wbudowywanie grup  $-\text{CH}_3$  do odpowiednich akceptorów.

### LITERATURA

1. Adler E., Lindgren B., *Svensk. Papperst.* **55**, 563 (1952).
2. Björkman A., *Ind. Eng. Chem.* **49**, 1395 (1957).
3. Björkman A., *Nature* **174**, 1057 (1954).
4. Björkman A., Person D., *Svensk. Papperst.* **60**, 158 (1957).
5. Björkman A., *Svensk. Papperst.* **59**, 477 (1956).
6. Björkman A., *Svensk. Papperst.* **60**, 243 (1957).
7. Brauns F. E., *Holzforsch.* **16**, 97 (1962).
8. Brauns F. E., *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 2120 (1939).
9. Campbell W. G., *Biochem. J.* **24**, 1235 (1930).
10. Campbell W. G., *Biochem. J.* **25**, 2023 (1931).
11. Campbell W. G., *Biochem. J.* **26**, 1829 (1932).
12. Campbell W. G., *Biochem. J.* **29**, 1318 (1935).
13. Day W. C., Pelczar M. J., Gottlieb S., *Arch. Biochem.* **23**, 360 (1949).
14. El Basyouni, *Can. J. Biochem.* **42**, 493 (1964).

15. Falck R., *Cellulosechemie* **11**, 198 (1930).
16. Falck R., Haag W., *Ber. Deut. Botan. Ges.* **60**, 225 (1927).
17. Fisher G., *Arch. Mikrobiol.* **18**, 397 (1953).
18. Flaig W., *Fourth Intern. Congress of Biochemistry*, London Pergamon Press **2**, 227 (1958).
19. Flaig W., Haider K., Estratto degli Atti del V Simposio Internazionale di Agrochimica su „Lo zolfo in agricoltura” Palermo, 1964.
20. Fukuzumi T., *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* **24**, 728 (1960).
21. Fukuzumi T., Shibamoto T., *J. Jap. Wood Res. Soc.* **11**, 248 (1965).
22. Gottlieb S., Day W. C., Pelczar M. J., *Phytopathology* **40**, 926 (1950).
23. Gottlieb S., Pelczar M. J., *Bacteriol Rev.* **15**, 55 (1951).
24. Haggroth S., Lindeberg B., *Svensk. Papperst.* **59**, 870 (1956).
25. Haider K., Lim S., Flaig W., *Landwirtsch. Forsch.* **15**, 1 (1962).
26. Henderson M. E. K., *J. Gen. Microbiol.* **26**, 149 (1961).
27. Henderson M. E. K., *J. Gen. Microbiol.* **26**, 155 (1961).
28. Higuchi T., Kawamura J., Morito J., *Japan Forestry Soc.* **37**, 446 (1955).
29. Ishikawa H., Oki T., *J. Jap. Wood Res. Soc.* **10**, 207 (1964).
30. Ishikawa H., Schubert W., Nord F. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 131 (1963).
31. Ishikawa H., Schubert W. J., Nord F. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 140 (1963).
32. Ishikawa H., Schubert W., Nord F. F., *Biochem. Zeitschr.* **338**, 153 (1963).
33. Law K., *Physiol. Plantarum* **12**, 854 (1959).
34. Leonowicz A., rozprawa doktorska, Lublin (1965).
35. Leonowicz A., Trojanowski J., *Acta Microbiol. Polon.* **14**, 55 (1965).
36. Minami K., Tsuchiya M., Fukuzumi T., *J. Jap. Wood Res. Soc.* **11**, 179 (1965).
37. Nord F. F., Schubert W. L., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 977 (1950).
38. Payen A., *Compt. Rend.* **7**, 1052 (1838).
39. Payen A., *J. Prak. Chem.* **16**, 436 (1838).
40. Pew J., *Tappi* **40**, 553 (1957).
41. Ribbons D. W., Evans W. C., *Biochem. J.* **83**, 482 (1962).
42. Rösch R., *Arch. Microbiol.* **43**, 392 (1962).
43. Rösch R., *Arch. Microbiol.* **44**, 344 (1963).
44. Rösch R., *Naturwissenschaften* **49**, 44 (1962).
45. Rypacek V., *Biologie Drewokaznych Hub. C. A. V.*, Praha 1957.
46. Seegerer A., *Z. Pfl. Ernähr. Dung. B.* **61**, 251 (1953).
47. Stanier R. I., *J. Bacter.* **59**, 527 (1950).
48. Sundman V., *Finska Kemistsamfundets Medd.* **71**, 26 (1962).
49. Sundman V., *J. Gen. Microbiol.* **36**, 171 (1964).
50. Trojanowski J., *Wiadomości Botaniczne* **11**, 113 (1967).
51. Trojanowski J., *Post. Biochem.* **10**, 93 (1964).
52. Trojanowski J., Leonowicz A., *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. C*, **18**, 441 (1963).
53. Trojanowski J., Leonowicz A., Hampel B., *Acta Microbiol. Polon.* **15**, 17 (1966).
54. Trojanowski J., Leonowicz A. (praca nieopublikowana).
55. van Vliet W. F., *Biochim. Biophys. Acta* **15**, 211 (1954).

## RECENZJE

### **A. E. Needham, The Uniqueness of Biological Materials, Oxford 1965, Pergamon Press, str. 593, 20 alb.**

Recenzowana książka jest kolejną dwudziestą piątą pozycją sekcji zoologii międzynarodowej serii monografii w dziedzinie biologii czystej i stosowanej. Autor jest wykładowcą zoologii uniwersytetu w Oxfordzie.

„Unikalność materiałów biologicznych” nosi charakter nieczęsto spotykany wśród książek z zakresu nauk przyrodniczych. Jest to esej, nosi bowiem wyraźne piętno subiektywizmu, ponadto forma pracy, zawierającej liczne cytaty z literatury pięknej a także biblii, również skłania do zakwalifikowania jej do tego gatunku twórczości. Książka jest interesującym zbiorem ocen znaczenia wszystkich głównych rodzajów związków chemicznych wchodzących w skład organizmów żywych. Autor brał pod uwagę przede wszystkim te cechy fizyczne i chemiczne biogennych związków, które odgrywają ważną rolę w przemianie, zwracał często uwagę na te homologie czy analogie, które nie wchodzi w skład żywej materii. Pod tym względem książka jest najzupełniej oryginalnym sposobem przedstawienia biochemii statycznej. Drugim ważnym aspektem, szeroko uwzględnionym przez autora, jest traktowanie przedmiotu ze stanowiska ewolucyjnego.

Pomysł stworzenia takiego opracowania powstał (o czym Autor wspomina w przedmowie) z dwóch powodów. Pierwszy był natury filozoficznej, dotyczył pytania, czy unikalność życia polega na unikalności materiałów chemicznych, będących składnikami organizmów. Drugi miał charakter bardziej praktyczny. Chodziło o przekonanie słuchaczy uniwersyteckich, że „esej omawiający własności materiałów pochodzenia biologicznego, węglowodanów, lipidów, białek i kwasów nukleinowych, może być równie interesujący, jak ważny”.

W pierwszych jedenastu rozdziałach Autor omawia biogenne związki bezazotowe, następnym siedem rozdziałów poświęca azotowym związkom alifatycznym. W bardzo interesujący sposób przedstawiono aminokwasy i białka. Następne rozdziały zawierają rozważania na temat heterocyklicznych związków, omówiono tu zasady nukleinowe, nukleotydy i kwasy nukleinowe. Grupę tę jednak potraktowano bardziej zwięźle niż na to zasługuje. Ostatnie rozdziały poświęcono kolejno związkom siarkowym, fosforowym, nieorganicznym kationom i anionom, metalom o znaczeniu katalitycznym i wreszcie chlorowcom. Każdy z rozdziałów jest jak gdyby wędrówką wśród biogennych związków, które Autor przedstawia czytelnikowi z aspektu ewolucyjnego, podkreśla te ich cechy, które odróżniają je od innych tego rodzaju niebiogennych związków i które mają istotne znaczenie dla funkcji komórki czy organizmów. Książka nie mogłaby być zapewne polecana jako podręcznik dla początkujących biochemików, choć może być przez nich zrozumiana, co prawda z pewnymi trudnościami. Lektura książki nasuwa wiele dotychczas nierozwiązanych problemów, które chyba nieczęsto stają przed badaczami. Słusznie zauważył N. W. Pirie, autor sławnej pracy z lat trzydziestych pod tytułem *The Meaninglessness of the Terms „Life” and „Living”*, również recenzent tej samej książki (*Nature* 209, 230 (1966)), że wiele odpowiedzi na pytania postawione przez Autora

może wynikać po spenetrowaniu przez człowieka innych planet. Unikalność życia w sensie jedyności życia ziemskiego może okazać się nieprawdziwa, jeżeli jakieś formy życia zostaną znalezione na innych planetach. Mogą one być albo podobne do ziemskich, albo też mogą to być twory zbudowane według zupełnie innych zasad.

Najważniejszymi częściami książki są jej ostatnie trzy rozdziały. Omówiono tam wyższe stopnie organizacji, jak błony i organelle subkomórkowe. Podano znalezienie doświadczeń ze spontanicznym wytwarzaniem *in vitro* wielu ważnych biologicznie związków w mieszaninie tak prostych ciał, jak na przykład metan, amoniak, woda. Szczegółowo omówiono doświadczenia z powstawaniem *in vitro* wysokomolekularnych związków o charakterze białka z mieszaniny aminokwasów pod wpływem ogrzewania w obecności fosforanów.

Prawdopodobnie jedną z najlepszych ilustracji zapatrywań Autora na zagadnienie unikalności życia jest zdanie zaczerpnięte z ostatniego rozdziału książki (str. 527): „Co najwyżej nieznaczna tylko część biologicznego chemizmu mogłaby być uznana jako wyraźnie nieprawdopodobna, przeciwnie, większość biologicznych reakcji chemicznych należy uważać za reakcje, których rozwój był spontaniczny i najbardziej prawdopodobny”.

Jednym z dowodów, że sposób traktowania przedmiotu przez Autora ma cechy dużej aktualności jest niedawno opublikowany artykuł Bernala w *New Scientist* (33, 12 (1967)) pod tytułem *Definitions of Life*. Sposób traktowania problemu życia przez tego fizyka i krystalografa jest bardzo zbliżony do sposobu zastosowanego przez zoologa, Autora *Uniqueness of Life Materials*.

Rozmyślenia Autora są wynikiem bardzo głębokiej i wszechstronnej lektury piśmiennictwa naukowego. Rozległość jednak opracowywanego zagadnienia, musiała zaważyć na dokładności, która zresztą nie była zamierzeniem Autora. Cytowana literatura, obok prac oryginalnych, zawiera z konieczności prace referatowe o różnym stopniu wartości.

Główną zaletą książki jest fakt, że może skutecznie pobudzić myślenie czytelnika — biologa, biochemika, a zapewne jej główną wadą, że stosunkowo szybko może ulec dezaktualizacji.

Tadeusz Korzybski

**Progress in Biophysics and Molecular Biology, vol. 16, red. J. A. V. Butler i H. E. Huxley. Pergamon Press 1966, str. 276.**

Tom obejmuje osiem artykułów omawiających niektóre współcześnie stosowane techniki badawcze oraz ostatnie osiągnięcia w zakresie badań molekularnych mechanizmów zjawisk odporności, dziedziczenia oraz struktury i właściwości błon biologicznych.

Problem „Rozpoznawania antygeny przez komórki” dyskutuje interesująco N. A. Mitchison (Nat. Inst. for Med. Res. Mill Hill, London) na tle badań nad specyficzną wtórnej odpowiedzi i opóźnionej nadwrażliwości na działanie antygeny oraz badań nad tak zwanym paraliżem immunologicznym (stron 11, około 75 pozycji piśmiennictwa).

Spośród artykułów poświęconych biochemii genetycznej jako pierwszy warto przeczytać artykuł pt. „Genetyka molekularna bakterii i bakteriofagów”. Autor, Simon Silver (Virus Lab. Univ. of California, Berkeley) z bogatego materiału rzeczowego wybrał interesujący materiał ilustracyjny przedstawiając go zwięźle i jasno (stron 50, około 230 pozycji piśmiennictwa). Gajanan V. Sherbet



(Chester Beatty Res. Inst., London) opatrzył swój artykuł efektownym tytułem „Cybernetyczne współzależności w epigenecie”. Artykuł jest raczej ogólnikowy, zakończony oczywistą konkluzją, że mechanizmy kontrolujące uruchomienie i szybkość syntezy różnych RNA informacyjnych stanowią molekularną podstawę współzależności jądro-cytoplazma i indukcji embrionalnej (stron 15, około 100 pozycji piśmiennictwa). Obszerny, szczegółowy i wyczerpujący przegląd badań nad „Transkrypcją genetyczną, czyli nad syntezą RNA uzależnioną od DNA” przedstawia A. Sibatani (Res. Inst. for Nuclear Med. and Biol., Hiroshima). Autor kolejno omawia: modele przenoszenia informacji genetycznej, metody stosowane dla charakterystyki RNA, własności tak zwanej „transkryptazy”, syntezę RNA o różnych funkcjach oraz mechanizmy transkrypcji i translacji kodu, zestawiając dane dotyczące bakterii oraz organizmów eukarionicznych (drożdże, rośliny, zwierzęta). Przegląd obejmuje około 500 pozycji bibliograficznych z lat 1961—1965 (stron 74).

Bieżące poglądy na „Molekularną organizację błon komórkowych” przedstawia w swym przejrzystym skonstruowanym artykule J. B. Finean (Dept. of Medical Biochemistry and Pharmacology, Univ. of Birmingham), podając jako ilustrację prócz schematów również kilka oryginalnych zdjęć elektronomikroskopowych (stron 30, około 70 pozycji piśmiennictwa). Nieprzeciętnie interesujący jest artykuł E. J. Ambrose (Chester Beatty Res. Institute, London) o „Elektroforetycznym zachowaniu się komórek”. Autor nie ogranicza się do opisanie techniki elektroforezy komórek zwierzęcych, lecz wskazuje jak na podstawie różnic w elektroforetycznej ruchliwości komórek można badać na przykład wiązanie antygenów, czy wirusów przez powierzchnię komórki oraz niektóre efekty transformacji komórek prawidłowych w nowotworach. Artykuł kończą wnioski dotyczące molekularnej struktury błon komórkowych i perspektywy dalszych osiągnięć w tej dziedzinie, które mogą rzucić nieco światła na takie procesy, jak kontrola wzrostu, różnicowanie i zezłośliwienia (stron 21, około 70 pozycji piśmiennictwa). „Organizację i funkcję sarkoplazmatycznego retikulum i tak zwanego systemu T w komórkach mięśniowych kręgowców i różnych bezkręgowców przedstawia David S. Smith (Dept. of Biology, Univ. of Virginia), zestawiając dla ilustracji świetne fotografie elektronomikroskopowe (stron 36, około 160 pozycji piśmiennictwa). Lucian Caro (Biology Div., Oak Ridge National Lab. Oak Ridge, Tennessee) opisuje technikę autoradiografii o dużej sile rozdzielczej, podając szereg użytecznych informacji technicznych (stron 22, około 75 pozycji piśmiennictwa).

*Z. Zielińska*

**The Structure and Function of Animal Cell Components — An Introductory Text.**  
**P. N. Campbell przy udziale M. A. Epsteina. Pergamon Press 1966, stron 153,**  
**rysunków 33, tabel 4, zdjęć elektronomikroskopowych 18.**

Rozwój współczesnych metod badawczych umożliwia w latach ostatnich spotkania przy jednym stole laboratoryjnym naukowców różnych specjalności badających ten sam materiał z odmiennych, właściwych sobie, punktów widzenia. Monograficzna książeczka P. N. Campbella o strukturze i funkcji komponentów komórkowych zestawia wyniki badań biochemicznych i cytologicznych ilustrując efekty współpracy badaczy tych dwóch specjalności. Po ogólnym wstępie dotyczącym biologii komórki i najczęściej stosowanych metod badawczych w dalszych rozdziałach książki, w oparciu o licznie cytowane dane doświadczalne, przedstawia Autor aktualnie poglądy na ultrastrukturę i funkcję mitochondriów, rybosomów

i endoplazmatycznego retikulum, jądra komórkowego oraz lizosomów. Ciekawy dobór cytowanych wyników, ich ilustracja oraz umiejętność jasnego przedstawienia omawianych zagadnień sprawia, że monografię Campbella czyta się z przyjemnością, jaką daje lektura dobrze napisanej książki popularnonaukowej. Autor przeznaczając swą książkę dla czytelników znających podstawy biochemii i cytologii, bardziej zainteresowanym poleca przeczytanie szeregu zacytowanych artykułów przeglądowych i prac oryginalnych.

*Z. Zielińska*

## SPRAWOZDANIA

### SYMPOZJUM MIĘŚNIOWE

W dniach 12—16 września 1966 r. odbyło się w Budapeszcie międzynarodowe sympozjum poświęcone biochemii i biofizyce mięśni, zorganizowane przez Węgierskie Towarzystwo Biochemiczne i Węgierskie Towarzystwo Biofizyczne pod auspicjami Międzynarodowej Unii Biofizyki Czystej i Stosowanej. Wzięło w nim udział 80 osób, w tym 6 osób z Polski.

Sympozjum miało dość niestereotypowy charakter. Na każdej z półdziennych sesji, poświęconych poszczególnym problemom, wygłoszono jeden referat wprowadzający. Tezy tych referatów były rozesłane przez organizatorów dużo wcześniej. Natomiast streszczenia, czy nawet tylko tytuły komunikatów, nie były wcześniej zgłaszane przez uczestników. Po każdym referacie wystarczająco duży okres czasu przeznaczono na prowadzoną przez osobę wygłaszającą referat spontaniczną dyskusję, w czasie której każdy z uczestników mógł zarówno dyskutować na temat referatu, jak i przedstawić wyniki swoich prac w tej dziedzinie.

Uczestników powitał w imieniu Węgierskiej Akademii Nauk prof. B. Straub, który wygłosił również referat wstępny. Chociaż prof. Straub od szeregu lat nie zajmuje się już mięśniami, to jednak jest on jak wiadomo odkrywcą strukturalnego białka mięśniowego — aktyny i referat swój poświęcił przypomnieniom dawnych prac ośrodka w Szeged, w latach kiedy kierował nim Albert Szent-Györgyi, prac, które położyły podwaliny pod nowoczesną biochemię mięśni.

Pierwszy wykład Prof. Coureaux z Zakładu Cytologii, Uniwersytetu Paryskiego poświęcony był strukturalnym aspektom mięśni prądkowanych, głównie badaniom lat ostatnich nad różnicami strukturalnymi między mięśniami szybkimi (białymi) a wolnymi (czerwonymi).

Z wystąpień w dyskusji nad tym referatem należy wspomnieć o wypowiedzi prof. Gutmanna z Instytutu Fizjologii Czechosłowackiej Akademii Nauk, który omówił na przykładzie prowadzonych w swoim Zakładzie od lat badań niektóre aspekty zróżnicowania biochemicznego obu typów mięśni, takie jak różna zawartość glikogenu, różna aktywność proteolityczna itp. Dr Sreter zreferował wyniki badań Zakładu Badania Mięśni z *Retina Foundation* w Bostonie nad różnicami we właściwościach ATP-azowych między miozyną z mięśni białych i czerwonych.

Następna z sesji poświęcona była strukturalnym białkom mięśniowym. W ostatnich latach badacze japońscy wykryli w mięśniach poprzecznie prądkowane nowe białka strukturalne, które, choć występują raczej w niewielkich ilościach, wydają się spełniać bardzo istotną rolę. Tym właśnie białkom poświęcony był referat prof. Ebashiego z Uniwersytetu w Tokio, badacza szczególnie zasłużonego w tej dziedzinie. Według panujących obecnie poglądów na temat sprzężenia mechanicznego w mięśniu, stan skurczu i rozkurczu regulowany jest zmianą stężenia wolnych jonów Ca uwalnianych w wyniku bodźca z sarkoplazmatycznego retikulum. Przy badaniu tych zagadnień w układach modelowych wykorzystuje się między innymi zjawisko superprecypitacji aktomiozyny pod wpływem ATP w obecności niewielkich ilości jonów wapnia. Otóż, jak się okazało, EGTA (analog EDTA

wiązący selektywnie wapń) działa rozkurczająco na aktomiozynę tylko wówczas, gdy w układzie obecne jest inne białko, odkryte przez Ebashiego. Białko to jest podobne do tropomiozyny, ale nie identyczne, stąd nazwano je „rodzimą” tropomiozyną. Natomiast tropomiozyna otrzymywana według powszechnie stosowanych metod nie działa na aktomiozynę. Poza tym Ebashi wykrył inne białko, nazwane  $\alpha$ -aktyniną, podobne składem aminokwasowym do aktyny, przyspieszające superprecypitację aktomiozyny, jak również powodujące żelifikację F-aktyny. W dyskusji nad referatem dr Maruyama z Uniwersytetu w Tokio omówił właściwości innego odkrytego przez siebie strukturalnego białka aktynopodobnego,  $\beta$ -aktyniny, regulującego, jak się wydaje, długość filamentów F-aktyny. Drabikowski przedstawił wyniki prowadzonych przez siebie badań, z których wynika, że wpływ  $\alpha$ -aktyniny na F-aktynę zostaje całkowicie zniesiony przez tropomiozynę. Z kolei Dr Guba z Budapesztu omówił badania nad innym, odkrytym przez siebie, strukturalnym białkiem mięśniowym, fibriliną, które według tego autora tworzy cieniutkie nitki, na których osadzone mają być filamenty miozyny. Nitki te zapewniałyby ciągłość między filamentami miozyny a liniami Z. Bardzo ożywioną dyskusję wywołało wystąpienie Dr Hoyle z Uniwersytetu w Eugene w stanie Oregon, który przedstawił swoją teorię skurczu mięśnia opartą na wynikach uzyskanych przez siebie zdjęć z mikroskopu elektronowego. Teoria ta różni się w sposób zasadniczy od powszechnie przyjętej teorii Huxleya i Hanson, postulującej przesuwanie się w skurczu względem siebie filamentów aktyny i miozyny.

Następny referat na tej sesji wygłosił Prof. I. I. Ivanov z Leningradu przedstawiając wyniki długoletnich badań swojego zakładu nad frakcjonowaniem białek mięśniowych oraz nad biogenezą poszczególnych białek mięśniowych w rozwoju ontogenetycznym.

Sesję następną otworzył referat Dr E. Page z Chicago pod tytułem „Jony jednowartościowe i woda w mięśniu sercowym. Ocena teorii membranowej i teorii niezmiennego ładunku”. Referat dotyczył różnych aspektów badań fizykochemicznych związanych z użyciem mięśnia sercowego do eksperymentalnego sprawdzenia tej teorii, zamiast jak dotychczas głównie mięśnia prądkowanego żaby. Dyskusja po referacie koncentrowała się między innymi wokół takich zagadnień, jak przestrzenie pozakomórkowe mięśni oraz dyfuzja elektrolitów i nieelektrolitów przez błonę mięśniową.

Na kolejnej sesji Dr F. Jöbbsis z Uniwersytetu Duke w Durham, Północna Karolina, wygłosił referat dotyczący swoich badań nad mechaniczną aktywnością mięśni prądkowanych. Autor pracujący na mięśniach ropuchy amerykańskiej wykazał możliwość spektrofotometrycznych pomiarów niewielkich zmian gęstości optycznej w nietkniętym mięśniu przy użyciu techniki Chance'a z dwuwiązkowym spektrofotometrem i pomiarze przechodzących wiązek światła na fotopowielaczach. Ostatnio Jöbbsis zastosował tę technikę do badania kinetyki uwalniania wapnia z sarkoplazmatycznego retikulum w wyniku bodźca. Jöbbsis wykorzystał do badań kolorymetryczną reakcję wapnia z mureksydem i obserwacje Ebashiego, że tylko wapń wolny, a nie wapń związany w mięśniach, reaguje z mureksydem. Wyniki obliczono na maszynach elektronowych i wykazano zgodność z współczesnymi teoriami sprzężenia mechano-chemicznego w czasie skurczu, postulującymi aktywną rolę jonów wapnia przy regulacji stanu skurczu i rozkurczu mięśni.

Sesja następną obejmowała referat Dr D. R. Wilkiego z *University College* w Londynie o energetyce mięśni szkieletowych. Poszczególne punkty referatu dotyczyły między innymi bilansu energetycznego i porównania pomiarów energii (praca wykonana + ciepło wydzielone) z ilością zużytej w skurczu fosfokreatyny. Prelegent wysunął potrzebę badań nad skorelowaniem wydatków energetycznych w poszczególnych fazach skurczu z zachodzącymi w tym czasie reakcjami chemicznymi. Tak na przykład, brak jest danych na temat zużycia energii związanej z po-

nowym wiązaniem Ca przez sarkoplazmatyczne retikulum po skurczu. Innym zagadnieniem jest zbadanie przyczyny stosunkowo niskiej wydajności pracy mięśni oraz określenie, w której fazie skurczu następuje strata energii. W bardzo ciekawej dyskusji wielokrotnie zabierał głos Prof. R. E. Davies z Filadelfii, badacz szczególnie zasłużony w badaniach nad pomiarami zużycia fosfokreatyny i ATP przy pojedynczym skurczu.

Symposium zamknął referat Prof. E. Ernsta z Instytutu Biofizycznego w Pecs pod tytułem „Fakty, implikacje i perspektywy”, w którym prelegent koncentrując się głównie na zagadnieniach biofizycznych omówił — z właściwą sobie werwą — kierunki badań najważniejsze do rozwiązania w najbliższej przyszłości. Należą tu zdaniem Prof. Ernsta, badania nad wydajnością pracy mięśni oraz dokładniejszym poznaniem ultrastruktury mięśni.

Po czterodniowych obradach organizatorzy zorganizowali w ramach sympozjum całodzienną wycieczkę do Tihany połączoną między innymi ze zwiedzaniem znajdującego się tam Instytutu Biologicznego Węgierskiej Akademii Nauk.

W sumie sympozjum było nadzwyczaj pożyteczne, choć nawet mimo tak specjalistycznego charakteru, nie wszystkie zagadnienia z biochemii mięśni zostały na nim omówione. Należy na tym miejscu podkreślić sprawność organizacyjną sympozjum. Nie można również nie wspomnieć, mimo że jest to rzecz powszechnie znana, o nadzwyczajnej gościnności i serdeczności gospodarzy okazywanej przez cały czas pobytu.

W. Drabikowski



## KRONIKA PTBioch

Przypominamy, że materiały zamieszczone w Kronice nie mają charakteru kompletnych sprawozdań. Aktualność Kroniki zależy od uprzejmości osób nadsyłających informacje z życia P T Bioch.

### I. Zebrania naukowe w Oddziałach

Oddział w Gdańsku:

19.XI.66. Współczesne poglądy na mechanizm działania wazopressyny (Dr med. J. Rogalski)

16.XII.66 Zmiany biochemiczne we wczesnych okresach rozwoju jaja jeźowca (Doc. dr L. Żelewski)

W dniach od 8.II do 26.IV.1967 r. zorganizowano cykl dziesięciu wykładów, pt. „Dziedziczenie i wrodzone wady metaboliczne”, przeznaczonych dla szerokiego grona biochemików, biologów i lekarzy. Wykłady prowadzili pracownicy naukowci A. M. w Gdańsku. Słuchacze otrzymywali powielone materiały pomocnicze podające uproszczone schematy głównych szlaków metabolizmu.

Oddział na Górnym Śląsku:

3.III.66. Metabolizm związków siarki (Doc. dr T. Szczepkowski z Krakowa)

17.VI.66. Some thoughts on secondary structure of DNA (Prof. dr A. Bendich z N. Jorku)

W ramach akcji popularyzacji biochemii wygłoszono ponadto 5 wykładów dla nauczycieli oraz szereg publicznych wykładów akademickich na tematy współczesnych osiągnięć nauk biologiczno-medycznych.

Oddział w Krakowie

8.XI.66. Biochemia związków chelatujących (Doc. dr T. Szczepkowski)

8.XI.66. Lecznicze aspekty związków chelatujących (Dr J. Zabicki)

Oddział w Lublinie:

11.X.66. Mitochondrial Changes Induced by Fluoroacetate in Living Cells (Prof. dr P. Buffa z Modeny)

21.X.66. Budowa i biosynteza przeciwciał (Prof. dr K. Zakrzewski z Warszawy)

1.XII.66. Metabolizm kolagenu (Dr M. Sanecka-Obacz)

1.XII.66. Synteza DAHP u *E. coli* (Dr J. Łobarzewski)

6.XII.66. Niektóre zagadnienia z biochemii gronkowców (Dr Z. Tynecka)

27.II.67. Badania nad tyrozynazą nowotworu *melanoma* (Mgr E. Dernałowicz-Malarczyc)

27.II.67. Embriogeneza i ultrastruktura komórek barwnikowych u ssaków (lek. med. A. Bomirski)

Oddział w Łodzi:

23.XI.66. Dehydrogenaza alaninowa i glutaminianowa w pałeczkach bakterii mlekowych (Dr E. Galas)

28.XI.66. Biochemia dynamiczna morza jak nowy kierunek badań biologicznych (Dr B. Różycki)

5.I.67. Promieniowanie żywych organizmów (Dr J. Sławiński)

Oddział w Warszawie:

7.III.67. Błony komórkowe u bakterii (Dr E. Janczura)

4.IV.67. Lokalizacja i właściwości proteinaz mięśni szkieletowych (doc. dr W. Drabikowski)

Oddział we Wrocławiu:

26.X.66. Sprawozdanie z VIII Europ. Sympozjum Peptydowego (Dr I. Siemion)

26.X.66. Omówienie letniej szkoły FEBS 1966 (Doc. dr A. Morawiecki)

30.XI.66. Oczyszczanie i niektóre właściwości  $\alpha$ -amylazy mięśni szkieletowych królika (Mgr M. Krzyżanowski)

14.XII.66. Mechanizm aktywacji i inhibicji proteolizy w ziarniakach żyta (Dr A. Polanowski)

## II. Kronika personalna

### 1. Oddział w Gdańsku:

Tytuł doktora nauk medycznych uzyskała Lucyna Michalska na podstawie pracy „Wpływ laktozy na wchłanianie i wydalanie wapnia w przewodzie pokarmowym szczura”, wykonanej w Katedrze Chemii Fizjologicznej A.M. w Gdańsku. Promotor: prof. dr Włodzimierz Mozołowski. Uchwała Rady Wydziału Lekarskiego A.M. z dn. 1 grudnia 1966.

### 2. Oddział na Górnym Śląsku:

Tytuł docenta uzyskał dr T. Jerzykowski z Katedry Chemii Fizjologicznej Śląskiej A.M.

Doc. dr T. Wilczok powołany został decyzją Ministra Zdrowia na stanowisko Kierownika Katedry Chemii Śląskiej A.M. w Katowicach.

### 3. Oddział w Lublinie:

Tytuł docenta uzyskali: dr H. Kraczkowski z Katedry Chemii Fizjologicznej WSR, dr J. Borkowska-Madecka i dr E. Gąsior z Katedry Chemii Fizjologicznej A.M.

Tytuł doktora uzyskali: M. Sanecka-Obacz z Katedry Chemii Fizjologicznej A.M. i J. Tomaszewski z Centralnego Laboratorium P.S.K. Nr 4 w Lublinie.

### 4. Oddział w Łodzi:

Stopień doktora nauk przyrodniczych uzyskali: Andrzej Dmitruk na podstawie pracy pt. „Wpływ chlorku chlorocholiny i kwasu giberelinowego na zawartość i przemieszczanie się związków azotu w siewkach grochu”. Pracę wykonano w Katedrze Fizjologii Roślin Uniw. Łódzkiego. Promotor: Doc. dr W. Maciejewska-Potapczyk. Uchwała Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniw. Łódzkiego z dnia 14 czerwca 1966 roku.

Marek Gniazdowski na podstawie pracy: „Badania nad biosyntezą kwasów rybonukleinowych drożdży”, wykonanej w Katedrze Chemii Ogólnej i Fizjologicznej A.M. w Łodzi. Promotor: prof. dr B. Filipowicz. Uchwała Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego z dn. 21 czerwca 1966. Stopień doktora nauk medycznych uzyskał w dniu 14.II.67 r. lek. med. B. Zachara na podstawie pracy pt. „Zawartość estrów fosforanowych w krwinkach czerwonych u dzieci zdrowych i u dzieci z chorobą reumatyczną”. Promotor: doc. dr M. Kański. Pracę wykonano w Katedrze Chemii Fizjologicznej WAM w Łodzi.

### 5. Oddział w Poznaniu:

Stopień doktora nauk rolniczych uzyskał Tadeusz Kotik na podstawie pracy: „Wpływ rasy, płci, wieku oraz żywienia na poziom frakcji białkowych surowicy krwi”, wykonanej w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN,



Oddział w Bydgoszczy. Promotor: prof. dr *L. Działoszyński*. Uchwała Rady Wydziału Zootechnicznego WSR w Poznaniu z dnia 16 czerwca 1965 r.

6. Oddział w Szczecinie:

Tytuł docenta uzyskał dr *L. Feliński* z Katedry Fizjologii Zwierząt WSR.

7. Oddział w Warszawie:

Stopień doktora nauk rolniczych uzyskały: *Lidia Danuta Wasilewska* na podstawie pracy pt. „Uracyl i urydyna w biosyntezie nukleotydów pirymidynowych w roślinach wyższych”, wykonanej w Katedrze Biochemii SGGW w Warszawie i Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Promotor: prof. dr *I. Reifer*. Uchwała Rady Wydziału Rolniczego SGGW z dnia 8.VI.1966 r.

*Janina Dröse* na podstawie pracy pt. „Lupanina i inne pochodne chinolizydyny jako induktory i substraty indukowanych enzymów *Pseudomonas lupanini*”, wykonanej w Katedrze Biochemii SGGW w Warszawie. Promotor: doc. dr *W. Brzeski*. Uchwała Rady Wydziału Rolniczego SGGW z dnia 28.IX.1966 r.

*Jerzy Makowski* na podstawie pracy pt. „Badania nad degradacją 2-<sup>14</sup>C-uracylu w kielkach pszenicy”, wykonanej w Katedrze Biochemii SGGW w Warszawie. Promotor: prof. dr *I. Reifer*. Uchwała Rady Wydziału Rolniczego SGGW z dnia 26.X.1966.

### III. Z polskich pracowni biochemicznych

Katedra Biochemii UMCS w Lublinie, kierownik doc. dr *Jerzy Trojanski*.

Katedra powstała w r. 1953, początkowo w oparciu o Zakład Fizjologii Roślin UMCS, z którego pomieszczeń i aparatury korzystano przez pierwszych kilka lat dzięki uprzejmości prof. dr *A. Paszewskiego*. Obecnie Katedra Biochemii dysponuje lokalem o powierzchni 260 m<sup>2</sup> oraz aparaturą naukową wartości ponad 1 milion zł. Personel naukowy Katedry liczy 7 osób, techniczny — 4 osoby.

Prowadzone są wykłady i ćwiczenia dla studentów kierunków biologii, mikrobiologii i biochemii. Ten ostatni kierunek studiów liczy sobie dopiero 3 lata i cieszy się dużym zainteresowaniem młodzieży.

Tematyka naukowa Katedry Biochemii obejmuje 2 problemy:

1. biochemiczny mechanizm degradacji ligniny przez grzyby i bakterie,
2. badania porównawcze nad tyrozinazą zwierzęcą w tkankach zdrowych i nowotworach.

W związku z pierwszym problemem prowadzone są szczegółowe badania peroksydazy grzybowej i bakteryjnej oraz doświadczenia ze związkami modelowymi ligniny, które otrzymano na drodze syntezy chemicznej. Wysunięto nową hipotezę tłumaczącą mechanizm depolimeryzacji oksydatywnej związków typu lignin, z uwzględnieniem roli peroksydazy. Interesuje nas również biosynteza związków huminowych z produktów rozkładu ligniny.

W zakresie drugiego problemu zajmowano się oczyszczaniem tyrozinazy z owadów, stwierdzając jej heterogenność chromatograficzną. Badając tyrozinazę w nowotworze zwierzęcym „melanoma” wykazano obecność naturalnego inhibitora tego enzymu, oddziałającego się po zaddziałaniu trypsyną.

Ponadto w zakresie zainteresowań Zakładu wchodzi zagadnienie powstawania narośli tumorowych na ziemiakach pod wpływem niektórych grzybów i związane z tym zmiany w aktywności oksydaz oraz poziomu IAA.

Katedra Biochemii SGGW, Warszawa, ul. Rakowiecka 8. Kierownik: doc. dr *Witold Brzeski*.

Podstawowa problematyka naukowa Katedry — to biochemia białek biologicznie czynnych, w ramach której rozwijane są zarówno badania podstawowe o znaczeniu

teoretycznym, jak i badania stosowane o znaczeniu dla różnych gałęzi rolnictwa. Głównymi problemami są:

1. Mechanizm indukowanej syntezy specyficznych enzymów u bakterii *Pseudomonas lupanini* (doc. dr W. Brzeski i dr Maria Toczko).
2. Optymalne warunki biosyntezy pleśniowych amylaz, proteaz i oksydazy glikozowej jako enzymów o znaczeniu technologicznym (doc. dr J. Kączkowski).
3. Skład białek i niektórych innych związków w roślinach uprawnych (ziarno pszenicy, korzeń buraka cukrowego i in.) jako kryterium przydatności prób zwiększenia ich produkcyjności i poprawy jakości (doc. dr J. Kączkowski i doc. dr W. Brzeski).
4. Biochemia odporności roślin (pomidor) na choroby infekcyjne (doc. dr W. Brzeski).

W powyższych badaniach stosowana jest między innymi następująca metoda: indukowanie bakterii, preparatyka enzymów z materiału bakteryjnego i pleśniowego (techniką chromatografii adsorpcyjnej, jonowymiennej i na żelu dekstranowym), frakcjonowanie białek glutenu pszenicy (techniką chromatografii adsorpcyjnej i jonowymiennej).

## SPIS TREŚCI

|   |     |
|---|-----|
| W. Hendrich — Struktura chloroplastów a biochemia fotosyntezy . . .                               | 311 |
| D. Frąckowiak — Fizyczne badanie procesu fotosyntezy . . . . .                                    | 335 |
| W. Turski i M. Gross — Kwasy nukleinowe i biosynteza białka w mitochondriach . . . . .            | 359 |
| A. Bardoń — Wewnątrzkomórkowe rybonukleazy zwierzęce i ich naturalny inhibitor . . . . .          | 389 |
| M. Kamińska-Zyła — Zastosowanie warstw jednomolekularnych w badaniu kwasów nukleinowych . . . . . | 401 |
| M. Stahl — Oznaczanie ciężaru cząsteczkowego białek za pomocą sączenia molekularnego . . . . .    | 407 |
| L. Korniszewski, A. Krotkiewski — Metabolizm trójglicerydów tkanki tłuszczowej . . . . .          | 421 |
| L. Jaroszewicz — Reakcje katalizowane przez fosforan pirydoksalu . . .                            | 439 |
| A. Leonowicz, J. Trojanowski — Biologiczny rozkład ligniny . . . . .                              | 465 |
| Recenzje książek (T. Korzybski, Z. Zielińska) . . . . .   | 479 |
| Sprawozdanie z Sympozjum Mięśniowego w Budapeszcie (W. Drabikowski)                               | 483 |
| Kronika PTBbioch. . . . .   | 487 |

W 4-tym zeszycie 13 tomu ukażą się

1. Pamięci Marii Skłodowskiej-Curie w setną rocznicę Jej urodzin, *J. Święcki, B. Lubas-Librant*
2. Hormonalna regulacja czynności genów, *I. Szumiel*
3. Niektóre właściwości kazeiny i jej genetycznych odmian, *S. Poznański, J. Jakubowski, J. Rymaszewski, A. Reps*
4. Biologia przeszczepów narządowych, *M. Trenkner, T. J. Otto*
5. Koenzymatyczne funkcje biotyny, *B. Bartosiński, B. Zagalak*
6. Cykl fotosyntetycznej redukcji węgla u bakterii, *Z. Wojciechowski*
7. Metody elektrochromatograficzne, *J. Opieńska-Blauth*

# POSTĘPY BIOCHEMII

July 1967

## ARTICLES IN POLISH

Volume 13

Number 3

|  |     |
|--|-----|
| W. Hendrich — Structure of Chloroplasts and Biochemistry of Photosynthesis (Dep. Biochem. Inst. Immunol. and Exp. Therap. PAN, Wrocław)                              | 311 |
| D. Frąckowiak — The Physical Research in Photosynthesis (Chair of Physics, High Agric. School, Poznań)   | 335 |
| W. Turcki i M. Gross — Nucleic Acids and Protein Synthesis in Mitochondria (Dep. Chem. Physiol. Med. School, Łódź)   | 359 |
| A. Bardoń — Intracellular Animal Ribonucleases and Their Natural Inhibitor (Dep. Chem. Physiol. Med. School, Gdańsk)   | 389 |
| M. Kamińska-Zyła — Application of Monomolecular Films in the Investigation of Nucleic Acids (Lab. Virusol. Dep. Plant Physiol. PAN, Kraków)                          | 401 |
| M. Stahl — Determination of Molecular Weight of Protein by Molecular Sieving on Gels (Dep. Radiobiol. Inst. Nucl. Res., Warszawa)                                    | 407 |
| L. Korniszewski, M. Krotkiewski — The Metabolism of Adipose Tissue Triglycerides (I Clin. Ped. Med. School and II Clin. Intern. Dis. Postgrad. Med. School Warszawa) | 421 |
| L. Jaroszewicz — Reactions Catalyzed by Pyridoxal Phosphate (Dep. Chem. Physiol. Med. School, Białystok)   | 439 |
| A. Leonowicz, J. Trojanowski — The Biological Decomposition of Lignin (Chair Biochem. Univ. Lublin)  | 465 |
| Chronicle  | 487 |

Należy podawać kolejno: L. p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginalnej), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202 793 (1953). Wykaz skrótów tytułów czasopism podają *Post. Biochem.*, 7, 601 (1961). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, miejsce i rok wydania; np.: Przyłęcki S. J., *Podręcznik Chemii Fizjologicznej*, Łódź, 1947. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule tom i nazwiska wydawców, oraz na końcu stronicę; np. Schneider W. C., w *Methods in Enzymology*, tom III, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, New York 1957, str. 680.

## SPIS TREŚCI

|   |     |
|---|-----|
| W. Hendrich — Struktura chloroplastów a biochemia fotosyntezy . . .                               | 311 |
| D. Frąckowiak — Fizyczne badanie procesu fotosyntezy . . . . .                                    | 335 |
| W. Turski i M. Gross — Kwasy nukleinowe i biosynteza białka w mitochondriach . . . . .            | 359 |
| A. Bardoń — Wewnątrzkomórkowe rybonukleazy zwierzęce i ich naturalny inhibitor . . . . .          | 389 |
| M. Kamińska-Żyła — Zastosowanie warstw jednomolekularnych w badaniu kwasów nukleinowych . . . . . | 401 |
| M. Stahl — Oznaczanie ciężaru cząsteczkowego białek za pomocą sączenia molekularnego . . . . .    | 407 |
| L. Korniszewski, A. Krotkiewski — Metabolizm trójglicerydów tkanki tłuszczowej . . . . .          | 421 |
| L. Jaroszewicz — Reakcje katalizowane przez fosforan pirydoksalu . . .                            | 439 |
| A. Leonowicz, J. Trojanowski — Biologiczny rozkład ligniny . . .                                  | 465 |
| Recenzje książek (T. Korzybski, Z. Zielińska) . . . . .   | 479 |
| Sprawozdanie z Sympozjum Mięśniowego w Budapeszcie (W. Drabikowski)                               | 483 |
| Kronika PTBbioch. . . . .   | 487 |