

P.939

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

1969  
tom 15  
nr 4

KWARTALNIK

## INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIŁKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1969  
tom XV  
zeszyt 4

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

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

Komitet Redakcyjny

Redaktor — Zofia Lassota

Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1969

Nakład 2060 (1935 + 125)	Oddano do składania 28.VII.1969 r.
Ark. wyd. 9,5 ark. druk. 8,25	Podpisano do druku w listopadzie 1969
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono w listopadzie 1969 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 1434 69. P-95.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

ROMAN JUSIAK \*, PIOTR POCZOPKO \*\*

## Metabolizm zwierząt stałocieplnych a metabolizm izolowanych tkanek

### Metabolism of Homeothermic Animals and Metabolism of Their Isolated Tissues

Basic phenomena of metabolism of the homeothermic animals are described and the relationship between metabolic rates of the intact animals and isolated tissues is discussed.

#### I. Pojęcia podstawowe

Życie organizmów jest nierozzerwalnie związane z pobieraniem różnych substancji z zewnątrz, ich przeróbką i częściowym przyswojeniem oraz z rozpadem i wydalaniem substancji składowych i zapasowych organizmu. Tę przemianę materii i towarzyszącą jej przemianę energii nazywamy z grecka metabolizmem. Ilość pobranych przez organizm substancji oraz produktów pośrednich i końcowych ich przemiany możemy wyrazić ich ciepłem spalania. Każdą z zachodzących w organizmie reakcji chemicznych możemy również rozpatrywać od strony energetycznej. Ponieważ są one przeważnie egzotermiczne, w procesach życiowych powstaje ciepło w ilości wprost proporcjonalnej do szybkości tych procesów u danego organizmu. Jeżeli nie interesują nas losy pobranych przez zwierzę substancji, a jedynie szybkość metabolizmu, w zupełności wystarczą pomiary ilości wytwarzanego przez zwierzę ciepła. Pomiary te przeprowadza się metodami kalorymetrii bezpośredniej lub pośredniej omawianymi w podręcznikach fizjologii (na przykład 13, 22, 63, 67). Tutaj wspomnimy tylko, że w częściej stosowanej kalorymetrii pośredniej ilość ciepła powstającego w organizmie oblicza się z ilości pobranego tlenu. Wartość cieplnego równoważnika tlenu zależy od tego jakie substancje ulegają utlenieniu

\* Mgr, Zakład Fizjologii Środowiskowej, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, Jabłonna

\*\* Dr habil., Zakład Fizjologii Środowiskowej, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, Jabłonna

w organizmie i zmienia się w granicach od 4,7 do 5,1 kcal/l. Jaka wartość przyjąć przy obliczeniach wskazuje iloraz oddechowy (R.Q), czyli stosunek wydalonego przez zwierzę CO<sub>2</sub> do pobranego O<sub>2</sub>. Gdy mierzy się jedynie pobieranie tlenu, produkcję ciepła oblicza się na podstawie założenia, że R.Q wynosi 0,8, a cieplny równoważnik tlenu w przybliżeniu 4,8 kcal/l. Dzięki znajomości cieplnego równoważnika tlenu produkcję ciepła w procesach metabolicznych można wyrazić nie w kaloriach lecz jako ilość pobranego tlenu, co szczególnie często stosuje się w badaniach nad metabolizmem tkanek.

## II. Czynniki wpływające na szybkość metabolizmu

Szybkość metabolizmu nawet u jednego i tego samego osobnika zmienia się w szerokich granicach pod wpływem warunków, w których znajduje się zwierzę. Utrudnia to porównywanie aktywności metabolicznej różnych osobników zarówno jednego gatunku, jak i należących do różnych gatunków. Poszukiwania wspólnej podstawy do porównań doprowadziły do powstania pojęcia przemiany podstawowej. Aby oznaczyć szybkość przemiany podstawowej należy dbać, by badane zwierzę znajdowało się: w możliwie najdalej posuniętym spokoju fizycznym i psychicznym, w stanie na czczo i w warunkach termicznie neutralnych. W praktyce trudno jest czasem określić czy zwierzę jest już na czczo, czy też przed przystąpieniem do oznaczeń winno być jeszcze przez pewien czas głodzone. Podobnie bywa trudno zdecydować czy temperatura, w której przeprowadza się oznaczenia, leży na pewno w strefie neutralnej dla danego zwierzęcia. Dlatego też już Krogh (47) kwestionował słuszność posługiwania się pojęciem przemiany podstawowej i proponował bardziej konwencjonalną standaryzację warunków pomiarów oraz zastąpienie terminu „przemiana podstawowa” terminem „przemiana standardowa”. Mimo zastrzeżeń Krogha termin przemiana podstawowa jest dotychczas powszechnie stosowany, a teoretycznie biorąc ma on dobrze określone znaczenie biologiczne. Właściwie oznaczona przemiana podstawowa informuje bowiem z jaką intensywnością przebiegają tylko te z przemian, które są niezbędne do podtrzymania życia zwierzęcia.

Prócz terminów „przemiana podstawowa” i „przemiana standardowa” w literaturze spotyka się dość często termin „przemiana spoczynkowa”. W niektórych podręcznikach (13, 28, 63) termin ten jest traktowany jako synonim przemiany podstawowej. Wielu jednak autorów, w szczególności amerykańskich (na przykład 9, 11, 12, 61) terminem przemiana spoczynkowa (ang. *resting metabolism*) określa nieco odmienne pojęcie. Oznacza ono bowiem szybkość produkcji ciepła przez zwierzę w stanie spokoju, lecz nie będące na czczo i znajdujące się w temperaturze zbliżonej do przeciętnej temperatury jego normalnego środowiska. Ta temperatura

środowiska leży zazwyczaj nieco poniżej dolnej granicy temperatur neutralnych. Ponieważ pokarm i obniżona temperatura środowiska zwiększają produkcję ciepła, przemiana spoczynkowa z reguły jest nieco wyższa od podstawowej.

Gdy poza podtrzymaniem życia organizm wykonuje jakąkolwiek pracę, jako skutek konieczny następuje przyspieszenie procesów metabolicznych, dzięki czemu przewyższają one poziom podstawowy.

### 1. Wpływ pracy fizycznej

Czynnikiem najsilniej wpływającym na metabolizm jest praca fizyczna. Produkcja ciepła u owiec i krów stojących jest o 9% wyższa niż u leżących (33), owce pasące się wytwarzają 5 razy tyle ciepła, co owce trzymane i karmione w klatkach (30), człowiek przy długotrwałej bardzo ciężkiej pracy fizycznej produkuje 20 razy tyle ciepła co w warunkach podstawowych (19), a przy maksymalnym wysiłku, na przykład podczas 100-metrowego sprintu, na krótki okres czasu szybkość metabolizmu zwiększa się stokrotnie (10).

### 2. Wpływ pokarmu

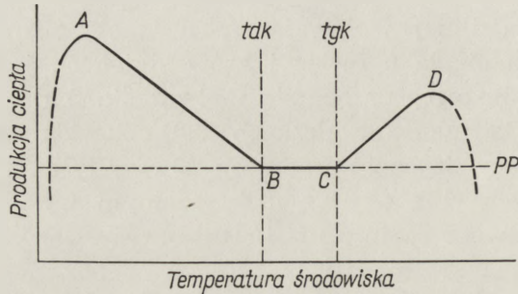
Spożycie pokarmu przez zwierzę wywołuje dość znaczne przyspieszenie metabolizmu. Doświadczenia R u b n e r a (58) wskazują, że nie może być ono tłumaczone wysiłkiem fizycznym związanym z jedzeniem, lecz kosztem energetycznym przyswojenia spożytego pokarmu. Koszt ten został nazwany przez Rubnera swoistym dynamicznym działaniem pokarmu. Wielu autorów podkreślało nielogiczność tego terminu, niemniej jest on do dziś często używany. Ostatnio jednak w literaturze anglosaskiej rozpowszechnia się drugi termin *calorigenic effect of food*, który można by oddać po polsku terminem „ciepłotwórcze działanie pokarmu”. Zestawienie literatury dotyczącej ciepłotwórczego działania pokarmu można znaleźć u B r o d y' e g o (9) i K l e i b e r a (42). Dla rozważań prowadzonych w niniejszym artykule wystarczy informacja, że metabolizm zwierzęcia najedzonego, w przypadku gdy spożywa ono przeciętną mieszaną dietę, jest o 4,5 do 20% szybszy od przemiany podstawowej (7, 55).

### 3. Wpływ temperatury otoczenia

Zależność produkcji ciepła od temperatury otoczenia ilustruje krzywa ABCD na rysunku 1. Krzywa ta, którą G e l i n e o (28) nazywa krzywą termogenezy, na odcinku BC pokrywa się z produkcją ciepła w warunkach podstawowych.

W tym zakresie temperatur środowiskowych, zwanym zakresem temperatur neutralnych, straty ciepła z organizmu są w równowadze z minimalną produkcją ciepła. W miarę obniżania się temperatury środowiska

zwiększa się różnica między nią a temperaturą powierzchni ciała, dzięki czemu straty ciepła wzrastają. Gdy temperatura środowiska osiągnie pewną wartość krytyczną, straty zaczynają przewyższać ilość ciepła produkowanego w warunkach podstawowych. Prowadziłoby to do obniżenia temperatury ciała, lecz zwierzęta stałocieplne zwiększają wówczas produkcję ciepła dla zbilansowania rosnących strat. W pewnym zakresie temperatur fizjologicznie niskich (poniżej dolnej krytycznej) produkcja ciepła nadąża za jego zapotrzebowaniem, mianowicie do osiągnięcia poziomu szczytowego (ang. *summit metabolism*) oznaczonego punktem A



**Rys. 1.** Zależność produkcji ciepła od temperatury otoczenia

ABCD — krzywa termogenezy, tdk — temperatura dolna krytyczna, tgk — temperatura górna krytyczna, PP — poziom przemiany podstawowej

na krzywej termogenezy. Przy dalszym obniżeniu temperatury środowiska ciepło powstające w organizmie nie pokrywa straty. Następuje wówczas obniżenie temperatury ciała, co pociąga za sobą zmniejszenie szybkości metabolizmu (zgodne z regułą Van't Hoffa) i w dalszej konsekwencji śmierć z zimna. Metabolizm szczytowy u sześciu badanych gatunków zwierząt był od 3 do 5,6 razy szybszy od przemiany podstawowej (9).

Gdy temperatura środowiska wzrasta, straty ciepła z organizmu maleją. W rezultacie nawet podstawowa produkcja ciepła przewyższa ilość potrzebną na podtrzymanie stałej temperatury ciała. Organizm broni się przed przegrzaniem zmniejszając izolacyjną wartość okrywy ciała (reakcje naczynioruchowe i pilomotoryczne, oraz zmiany postawy ciała) i zwiększając straty przez parowanie (pocenie się lub zianie). Przy pewnej jednak temperaturze, zwanej górną krytyczną, środki te nie wystarczają. Następuje wówczas podwyższenie temperatury ciała i towarzyszące mu przyspieszenie metabolizmu, zgodne z regułą Van't Hoffa, jeszcze bardziej pogarszające sytuację. Jeżeli fizjologicznie wysoka temperatura utrzymuje się przez czas dłuższy następuje śmierć z przegrzania.

Zarówno zakres jak i położenie strefy temperatur neutralnych zależą od gatunku i od wieku zwierząt. Dla szczura strefa ta mieści się w granicach 28—30°C (9), a dla dorosłej kury 18—26°C, podczas gdy dla kurczęcia w pierwszym tygodniu po wylęgu w granicach od 29 do 32°C (2). U lisa polarnego nie zanotowano wzrostu metabolizmu nawet przy temperaturze -30°C (60).



#### 4. Wpływ rozmiarów ciała

Nie może być wątpliwości co do tego, że w ciągu danego okresu czasu duże zwierzę produkuje więcej ciepła niż zwierzę małe. Innymi słowy, szybkość metabolizmu jest dodatnio skorelowana z rozmiarami ciała. Można by przypuszczać, że wytwarzanie ciepła jest wprost proporcjonalne do rozmiarów ciała: gdy na przykład stosunki ciężarowe poszczególnych zwierząt będą się miały do siebie jak 1 : 2 : 3 : 4, to i produkcja ciepła u tych zwierząt będzie wzrastała w tym samym stosunku. Tak jest istotnie w przypadku niektórych bezkręgowców (3). U wszystkich jednak kręgowców i wielu bezkręgowców zwierzę dwukrotnie cięższe produkuje w ciągu doby czy godziny nie dwa razy więcej ciepła lecz nieco mniej. A zatem między rozmiarami ciała a metabolizmem przeliczonym na jednostkę ciężaru istnieje ujemna korelacja. Można się łatwo o tym przekonać porównując stosunki ciężarów ciała różnych zwierząt ze stosunkami ich przemiany podstawowej. Z zawartych w tablicy 1 danych wynika, że jakkolwiek ważąca 600 kg krowa jest 28571 razy cięższa od 21 gramowej myszy, to jej dobowa produkcja ciepła jest tylko 2188 razy większa. W przeliczeniu zaś na kilogram ciężaru ciała produkcja ciepła myszy jest ponad 13 razy większa niż krowy.

Tablica 1

Przemiana podstawowa dorosłych zwierząt a rozmiary ich ciała

Gatunek	Ciężar ciała kg	kcal/dobę	kcal/kg/dobę	% metabolizmu myszy (w kcal/kg/dobę)	kcal/kg <sup>3/4</sup> /dobę
Mysz	0,021	3,6	171,4	100,0	65,4
Szczury	0,282	28,1	99,6	58,1	73,0
Świnka morska	0,410	35,1	85,6	50,0	68,4
Królik	1,520	83,0	54,6	31,8	61,2
Kot	3,000	152,0	50,7	29,5	66,7
Pies	24,800	875,0	35,3	20,6	78,1
Owca	46,400	1254,0	27,0	15,7	70,8
Krowa	600,000	7877,0	13,1	7,6	65,0

Tablica opracowana w oparciu o dane zebrane przez Kleibera (42).

Istnienie korelacji dodatniej między rozmiarami zwierzęcia a jego przemianą podstawową oraz korelacji ujemnej między rozmiarami ciała a przemianą podstawową przeliczoną na jednostkę ciężaru stanowiło bodziec do poszukiwania takiego sposobu określenia rozmiarów zwierzęcia, by metabolizm przeliczony na jednostkę rozmiarów był jednakowy u dużych i małych zwierząt. Poszukiwania te doprowadziły do wykrycia zależności zwanej „prawem powierzchni”. Według tego „prawa” prze-

miana podstawowa jest wprost proporcjonalna do powierzchni zwierzęcia. Bliższe informacje o historii powstania tego prawa oraz jego uzasadnienia i krytyki podają prace przeglądowe (3 36, 41, 42, 71, 72).

Rubner (57) tłumaczył prawo powierzchni przystosowaniem do stałocieplności. Temperatura ciała wszystkich zwierząt stałocieplnych jest bliska 37°C. Rozpraszanie ciepła zachodzi na powierzchni ciała, zatem dla utrzymania stałej temperatury zwierzęta muszą wytwarzać jednakowe ilości ciepła na jednostkę powierzchni. Ilość ta według oszacowania Rubnera wynosi 1000 kcal na metr kwadratowy na dobę. Wartość tę ustalili Rubner (57) badając przemianę podstawową psów różnej wielkości. W 18 lat później Voit (66) zestawił dane uzyskane dla różnych gatunków zwierząt, potwierdzające wyniki Rubnera. Sugestywność takiego tłumaczenia „prawa powierzchni” i zgodność z nim wielu otrzymanywnych wyników sprawiły, że zostało ono szybko powszechnie uznane. W miarę nagromadzania się danych pojawiły się jednak z jednej strony próby uzasadnienia „prawa powierzchni” działaniem innych czynników poza przystosowaniem do stałocieplności, z drugiej strony jego krytyki (41, 42).

W niniejszym artykule omówimy tylko niektóre krytyki. Poważna krytyka nie tyle samego „prawa powierzchni”, co zasady przeliczania szybkości metabolizmu na jednostkę powierzchni opiera się na fakcie, że powierzchnia zwierzęcia nie da się dokładnie zmierzyć. Mimo istnienia wielu sposobów mierzenia powierzchni, wyniki pomiarów nawet osobników jednego gatunku mogą się różnić o 20 do 50% (43). Z tego względu najczęściej powierzchnię oblicza się z ciężaru, stosując wzór Meeha (52):

$$S = kW^{1/3} \quad 1$$

gdzie S — powierzchnia w  $\text{dm}^2$

k — stała zależna od kształtu ciała zwierzęcia

W — ciężar ciała w kilogramach.

Obliczając powierzchnię ciała człowieka powszechnie stosuje się zmodyfikowany wzór wyprowadzony przez Du Bois i Du Bois (20). Wzór Meeha zawiera stałą k, której wartość zależy od kształtu ciała. W przypadku kuli wynosi ona 4,84, a w przypadku sześcianu 6,00. Wartości tego współczynnika ustalone empirycznie dla różnych gatunków zwierząt mieszczą się w granicach od 7 do 13. Ponieważ bezpośrednie pomiary powierzchni są mało dokładne, współczynnik k nie może być dokładnie ustalony. W literaturze podaje się na przykład dla szczura 11 różnych wartości k w granicach od 7,15 do 11,6 (61). Gdy obliczając powierzchnię ciała szczura posłużymy się skrajnymi wartościami, wyniki będą się różnić o około 30% (54). W rozwoju pozapłodowym zwierząt często zachodzą poważne zmiany kształtu ciała, co pociąga za sobą zmiany współczynnika k. Współczynnik ten dla nowonarodzonych szczurów wynosi 7,40, podczas gdy dla dorosłych 10,83 (54). Jeżeli więc dla

nowonarodzonych szczurów przyjmie się wartość współczynnika  $k = 10$ , jak to czynił Brody (9), obliczona powierzchnia będzie o około 29% większa od rzeczywistej.

Ze względu na łatwość popełnienia błędu sięgającego 30% w oszacowaniu wielkości powierzchni, takie określenie szybkości metabolizmu jak 1000 kcal/m<sup>2</sup>/dobę jest w pewnym stopniu fikcją. Porównanie szybkości metabolizmu dwu różnych gatunków zwierząt w przeliczeniu na jednostkę powierzchni, oszacowaną za każdym razem z innym błędem, może doprowadzić do błędnych wniosków. Gdybyśmy nawet potrafili dokładnie zmierzyć powierzchnię ciała zwierzęcia możemy słusznie zapytać czy istnieją podstawy ku temu by szybkość przemiany podstawowej była ściśle proporcjonalna do powierzchni? Nawet przyjmując, że tłumaczenie „prawa powierzchni” przez Rubnera jest w zasadzie słuszne, moglibyśmy na to pytanie odpowiedzieć przecząco. Dosłowne przyjęcie wspomnianego tłumaczenia wymagałoby przyjęcia również dwu założeń: 1) że straty ciepła zachodzą zawsze z całej powierzchni i 2) że gęstość strumienia cieplnego z powierzchni wszystkich zwierząt jest jednakowa. Z codziennych obserwacji wiemy, że wielkość tak zwanej powierzchni promieniującej zależy w dużym stopniu od pozycji zwierzęcia: jest ona znacznie mniejsza u skulonego, leżącego zwierzęcia niż u biegnącego. Pierwsze z założeń nie może więc być słuszne. Nie może też być słuszne drugie założenie, ponieważ powierzchnie ciała różnych zwierząt mają różne właściwości izolacyjne. Gdyby były one jednakowe, wówczas strefa temperatur neutralnych dla różnych zwierząt o tych samych rozmiarach winna by leżeć w tych samych granicach. Tak jednak nie jest. Jak wspomnieliśmy, dla lisa polarnego temperatura  $-30^{\circ}\text{C}$  leży jeszcze powyżej dolnej krytycznej, podczas gdy dla znacznie większej owcy (zwierzęcia mającego względnie mniejszą powierzchnię) dolna temperatura krytyczna leży około  $-5^{\circ}\text{C}$  gdy grubość runa wynosi około 5 cm (38), a  $+28^{\circ}\text{C}$  dla owcy strzyżonej (8). Zatem nie ma podstaw do przyjęcia, że szybkość metabolizmu musi być ściśle proporcjonalna do wielkości powierzchni. Do takiego właśnie wniosku doszedł Kleiber (41, 42). Sądzi on jednak, że mimo wszystko przystosowanie do stałocieplności jest najlepszym tłumaczeniem prawa powierzchni, a szybkość metabolizmu w przybliżeniu jest proporcjonalna do powierzchni. Ta druga część stwierdzenia Kleibera nie ulega wątpliwości, ponieważ jest to prawda stwierdzona empirycznie. Bertalanffy (3) słusznie jednak zwraca uwagę na fakt, że również u wielu zwierząt zmiennocieplnych, na przykład ryb, szybkość metabolizmu jest proporcjonalna do powierzchni. Nie możemy zatem dać zadowalającej odpowiedzi na pytanie w jaki sposób ewolucja doprowadziła do tego, że szybkość metabolizmu zwierząt jest w przybliżeniu proporcjonalna do powierzchni ich ciała.

Istnienie tej proporcjonalności uzasadnia posługiwanie się jakąś metaboliczną jednostką rozmiarów ciała. Krogh (47) uważał, że w przy-

blizieniu miarą powierzchni ciała może być jego ciężar podniesiony do potęgi  $2/3$ . Wówczas prawo powierzchni dla dorosłych zwierząt stałocieplnych można ująć wzorem:

$$M = kW^{2/3} \quad 2$$

gdzie  $M$  — szybkość przemiany podstawowej,  $k$  — stała ustalona doświadczalnie dla danej grupy zwierząt, a  $W$  — ciężar ciała w kilogramach. W ten sposób rozumiał prawo powierzchni *Stoeltzner* (62).

Okazało się jednak, że szybkość metabolizmu przeliczona na taką jednostkę rozmiarów ciała jest nadal większa u zwierząt dużych niż u małych (39). Ta dodatnia korelacja zanika jednak, gdy wykładnik potęgowy  $2/3$  zastąpi się wykładnikiem  $3/4$  (39, 41, 42, 43). Zatem kilogram podniesiony do potęgi  $3/4$  stanowi najlepszą empirycznie ustaloną metaboliczną jednostkę rozmiarów ciała, a zależność między szybkością przemiany podstawowej dorosłych zwierząt stałocieplnych od ich rozmiarów można ująć równaniem

$$M = kW^{3/4} \quad 3$$

w którym znaczenie symboli jest takie samo jak w równaniu 2. Kalkulacje przeprowadzone przez *Kleibera* w 1932 roku w oparciu o dane dotyczące 10 grup zwierząt i ponownie w 1947 o dane dotyczące 26 grup zwierząt wykazały, że szybkość przemiany podstawowej dorosłych ssaków (od myszy do wołu) wynosi średnio  $70 \text{ kcal/kg}^{3/4}/\text{dobę}$ . Znajomość tej średniej pozwala dość dokładnie przewidzieć szybkość przemiany podstawowej danego zwierzęcia na podstawie jego ciężaru, bez uciekania się do oznaczeń. Jeszcze większa korzyść ze znajomości średniej międzygatunkowej płynie stąd, że jest ona dobrą podstawą do porównań. Możemy na przykład twierdzić, że przemiana podstawowa psa wynosząca  $78,1 \text{ kcal/kg}^{3/4}/\text{dobę}$  jest stosunkowo szybka, podczas gdy królika wynosząca  $61,2 \text{ kcal/kg}^{3/4}/\text{dobę}$  stosunkowo powolna (tablica 1).

Ze średnią międzygatunkową możemy porównywać również szybkość metabolizmu zwierząt nie znajdujących się w warunkach podstawowych, na przykład: najedzonych, wykonujących pracę fizyczną, czy przebywających w chłodzie. Pozwala to stwierdzić w jakim stopniu dany czynnik przyspiesza przemianę w stosunku do średniej międzygatunkowej. Warto dodać, że metaboliczna jednostka rozmiarów ciała ( $\text{kg}^{3/4}$ ) może być również przydatna jako podstawa porównań metabolizmu wielu zwierząt zmiennocieplnych. Według *Hemmingsena* (36) szybkość metabolizmu zwierząt zmiennocieplnych jest również ściślej proporcjonalna do  $3/4$  niż do  $2/3$  potęgi ciężaru ciała. Metabolizm zwierząt zmiennocieplnych (przy temperaturze ciała  $20^\circ\text{C}$ ) jest jednak dziesięciokrotnie wolniejszy niż zwierząt stałocieplnych. Wynosi on bowiem nie 70 lecz około 7  $\text{kcal/kg}^{3/4}/\text{dobę}$ .

Zalety proponowanej przez Kleibera metabolicznej jednostki rozmiarów ciała i obliczonej przez niego średniej międzygatunkowej sprawiły, że uczestnicy III Międzynarodowego Sympozjum na temat przemiany energii (Troon, Szkocja, maj 1964 r.) jednomyślnie głosowali za przyjęciem tej jednostki. Przyjęcie jej jako podstawy do porównań szybkości metabolizmu różnych zwierząt nie narzuca obowiązku posługiwania się nią we wszystkich pracach nad przemianą energii u zwierząt. Inne sposoby wyrażania szybkości metabolizmu nie tylko są dopuszczalne, lecz mogą być nawet niezbędne przy rozważaniu niektórych problemów bioenergetycznych. Kleiber (45), twórca i orędownik omawianej jednostki, pisze:

„Żadna spośród różnych jednostek rozmiarów ciała, na które można przeliczyć szybkość metabolizmu nie ma bezwzględnej wyższości nad pozostałymi. Jeżeli interesuje nas produkcja ciepła danej kolonii szczurów, wówczas najlepsze informacje daje nam przeliczenie szybkości metabolizmu na sztukę. Jeżeli badamy funkcję izolacyjną okrywy ciała, wówczas najwygodniej jest przeliczać szybkość metabolizmu na jednostkę powierzchni. Dla porównania szybkości procesów enzymatycznych w izolowanych tkankach lub zawiesinach z szybkością metabolizmu całych zwierząt najodpowiedniejsze jest przeliczanie ich na jednostkę ciężaru”.

Sposób wyrażania szybkości metabolizmu zależy więc od rozwiązywanego zagadnienia. Wyniki muszą jednak być publikowane tak, by zawsze istniała możliwość przeliczania ich w zależności od potrzeby. Jeżeli praca będzie zawierać wyłącznie wyniki przeliczone na sztukę, na jednostkę ciężaru lub na  $\text{kg}^{3/4}$  możliwość wykorzystania tych wyników będzie ograniczona. Kleiber (41, 42) uważa, że publikacje traktujące o metabolizmie zwierząt powinny jako minimum podawać ciężar badanych zwierząt i szybkość metabolizmu przeliczoną bądź na sztukę, bądź na jednostkę ciężaru ciała. Tak przedstawione dane istotnie umożliwiają wszelkiego rodzaju przeliczenia.

### III. Metabolizm tkanek

#### 1. Uwagi ogólne

Nie ma wątpliwości, że metabolizm zwierzęcia stanowi sumę metabolizmu jego komórek czy tkanek, oraz że procesy metaboliczne w tkankach *in situ* przebiegają wolniej u zwierząt dużych niż u małych. Możemy też założyć *a priori*, że aktywność metaboliczna poszczególnych tkanek nie jest jednakowa i dzięki temu udział poszczególnych tkanek w metabolizmie całego zwierzęcia nie jest proporcjonalny do udziału masy danej tkanki w organizmie. Jaki jednak udział przypada na poszczególne tkanki dotychczas dokładnie nie określono, a liczne prace dotyczące tego zagadnienia podają różne i często sprzeczne wyniki. Wiele też sprzecznych zdań

wypowiedziano w kwestii czy proporcjonalność szybkości metabolizmu zwierząt do  $3/4$  potęgi ciężaru ciała jest wynikiem działania czynników komórkowych, czy też centralnych regulatorów.

Badania nad metabolizmem tkanek *in vitro* z reguły przeprowadzano mikrorespiracyjnym aparatem Warburga i wyrażano jako  $Q_{O_2}$ , to znaczy w  $mm^3$  pobranego tlenu na mg suchej masy tkanki w ciągu godziny. Ponieważ szybkość metabolizmu tkanek przelicza się na jednostkę ich ciężaru, dla ułatwienia porównań wygodnie jest również zależność szybkości metabolizmu od rozmiarów ciała zwierząt wyrażać w przeliczeniu na jednostkę ich ciężaru ciała. W tym celu równanie 3 przekształcamy:

$$\frac{M}{W} = kW^{3/4-1}$$

czyli

$$\frac{M}{W} = kW^{-1/4} = kW^{-0,25} \quad 4$$

## 2. Przegląd danych o zależności między metabolizmem tkanek a metabolizmem całych zwierząt

Terroine i Roche (64) stwierdzają, że „homologiczne tkanki różnych zwierząt wykazują jednakową intensywność oddychania”. Również Grafe (29) utrzymuje, że „żywa protoplazma zwierząt ciepłokrwistych, a możliwe, że i wielu zwierząt zimnokrwistych, wykazuje dużą jednolitość pod względem oddychania, a osiąga swoją odrębność dzięki systemom regulacyjnym zwierzęcia”. Grafe uważa ponadto, że *in vitro* metabolizm tkanek jest szybszy niż *in vivo*, szczególnie u zwierząt dużych, u których jest on regulowany przez mechanizmy centralne, działające jako hamulce. Po wykryciu przez Krogha (49) naczynioruchowej regulacji ukrwienia tkanek zaczęto te spostrzeżenia tłumaczyć racjonalnym zaopatrzeniem komórek w tlen. Im mniej bowiem jest otwartych kapilar, tym większa między nimi odległość, a zatem i odległość, którą w tlen. Jeżeli dostawa tlenu byłaby czynnikiem ograniczającym można by się spodziewać, że *in vitro* szybkość metabolizmu homologicznych tkanek będzie jednakowa, ponieważ dostęp tlenu do komórek jest jednakowy. Przeprowadzone przez Kleibera (40) badania nad metabolizmem tkanki wątrobowej szczurów, królików i owiec nie potwierdziły jednak tego przypuszczenia. Zależność pobierania tlenu przez skrawki wątroby od rozmiarów ciała zwierzęcia była bowiem taka sama jak przemiany podstawowej. Taką samą zależność stwierdzono również dla skrawków nerek i mózgu królików i szczurów (70). Dokładniejsze badania nad metabolizmem 5 tkanek z 9 różnych gatunków zwierząt przeprowadził

Krebs (46), który znacznie ulepszył technikę pomiarów. Jego dane dla tkanki mózgowej i wątrobowej przedstawia tablica 2.

Tablica 2

Pobieranie  $O_2$  przez skrawki kory mózgowej i wątroby w  $mm^3/godz.$   
/mg suchej masy. Środowisko Krebsa III (wg 46)

Gatunek	Średni ciężar ciała (kg)	Kora mózgowa	Wątroba
Mysz	0,032	22,9	19,3
Szczur	0,26	19,2	14,6
Świnka morska	0,44	17,4	9,5
Królik	1,21	15,1	7,6
Kot	2,75	15,5	10,2
Pies	18,3	14,8	10,8
Owca	35,0	11,3	6,2
Krowa	320,0	12,1	3,6
Koń	760,0	10,5	2,6

Wyniki Krebsa nie potwierdziły w zupełności ani poglądu Terroine'a i Roche'a (64) ani Kleibera (40).  $Q_{O_2}$  tkanek ze zwierząt dużych, ogólnie biorąc, jest mniejszy niż małych, lecz ta różnica jest mniejsza niż różnica między ich przemianą podstawową. Na przykład  $Q_{C_2}$  kory mózgowej i nerki konia stanowił około 47%  $Q_{O_2}$  tych tkanek myszy, podczas gdy szybkość przemiany podstawowej konia (na jednostkę ciężaru) stanowi zaledwie 12 do 13% szybkości przemiany podstawowej myszy. Pobieranie tlenu przez skrawki śledziony i płuc wykazywało większą zależność od rozmiarów ciała, lecz również nie tak dużą jak przemiana podstawowa. Jedynie  $Q_{O_2}$  tkanki wątrobowej zmniejszał się przy wzroście rozmiarów zwierzęcia mniej więcej w tym samym stopniu co przemiana podstawowa. W tym względzie wyniki Krebsa (46) są w pełni zgodne z wynikami Kleibera (40).

Krebs (46) przypuszczał, iż charakterystyczna zależność przemiany podstawowej od rozmiarów ciała wynika z analogicznej zależności  $Q_{O_2}$  tkanki mięśniowej, która stanowi podstawową masę tkanek metabolicznie aktywnych w organizmie.

Badania nad oddychaniem *in vitro* mięśni szkieletowych szczurów (5) nie potwierdziły tego przypuszczenia. Spadek  $Q_{O_2}$  mięśni przy wzroście ciężaru ciała był bowiem bardzo nieznaczny. Wykładnik potęgowy w równaniu ujmującym zależność  $Q_{O_2}$  od rozmiarów ciała wynosił  $-0,1$  a nie  $-0,25$ , jak w przypadku przemiany podstawowej (porównaj równanie 4).

Badania nad zależnością  $Q_{O_2}$  tkanek od rozmiaru ciała zwierząt tego samego gatunku przeprowadzili Bertalanffy i Pirozynski (4, 6) oraz Schmidt-Nielsen (59). Jako reprezentatywne można przyjąć wyniki badań (4) na siedmiu tkankach szczurów o ciężarze od 9 do

392 g. Są one w zasadzie zgodne z danymi Krebsa (46) uzyskanymi na różnych gatunkach.  $Q_{O_2}$  większości tkanek pochodzących ze zwierząt dużych był niższy niż osobników małych. Różnice te jednak nie były równoległe do różnic w przemianie podstawowej. Szybkość metabolizmu skrawków nerki i kory mózgowej ze zwierząt dużych była nawet nieco wyższa niż ze zwierząt małych (odwrotnie niż w międzygatunkowych porównaniach dokonanych przez Krebsa).

Metabolizm skrawków nerki i wątroby badano również u kur różnego wieku (18). W przypadku nerki nie stwierdzono wpływu rozmiarów na  $Q_{O_2}$ . Metabolizm skrawków wątroby, podobnie jak u ssaków, był wolniejszy u kur dorosłych niż u kurcząt, jednak różnica była mniejsza niż różnica między ich przemianą podstawową.

Wielu autorów badało zależność między rozmiarami ciała zwierząt a stężeniem glutationu (32, 53) i enzymów: cytochromu c (56), oksydazy cytochromowej (50) oraz oksydazy bursztynianowej i dehydrogenazy kwasu malonowego (26). Okazało się, że ich stężenie było ujemnie skorelowane z rozmiarami ciała, ale nie w tym stopniu co przeliczona na jednostkę ciężaru ciała przemiana podstawowa.

Field i wsp. (24) oznaczali *in vitro* szybkość metabolizmu poszczególnych tkanek szczura i obliczali sumaryczną szybkość metabolizmu całego zwierzęcia. Stanowiła ona zaledwie 66% szybkości przemiany podstawowej szczurów. W podobnych doświadczeniach przeprowadzonych na psach (51) suma wynosiła ponad 70%. Fuhrman i wsp. (27) oznaczali szybkość metabolizmu szczurów o normalnej temperaturze ciała (38°C) oraz szczurów w stanie hipotermii (temperatura ciała 18°C), a następnie szybkość metabolizmu w poszczególnych tkankach. Sumaryczna szybkość metabolizmu tkanek szczurów badanych przy 38°C wynosiła 72,5% szybkości metabolizmu normalnych szczurów, a tkanek badanych przy 18°C była większa niż całego zwierzęcia w stanie hipotermii, wynosiła bowiem 106%. Huston i Martin (37) obliczyli, że sumaryczna szybkość metabolizmu tkanek inkubowanych w środowisku fosforanowym Krebsa-Ringera wynosi 78,7% szybkości przemiany podstawowej, a w środowisku Krebsa III — 90,7%. Gdy jednak skrawki trzymano w naczyniach na specjalnych wkładkach z włókna szklanego, dzięki czemu dostęp tlenu do tkanki był lepszy, w środowisku Krebsa III otrzymano 101,8%.

Wyniki te nie potwierdziły ani poglądu (29, 64), że *in vitro* metabolizm tkanek ze zwierząt dużych i małych jest jednakowy ani tezy (29), że *in vitro* tkanki oddychają intensywniej niż *in vivo*. Stwierdzono natomiast, że istnieje duże podobieństwo między metabolizmem tkanek *in vitro* a metabolizmem całego zwierzęcia. Podobieństwo to wyraża się zarówno podobną zależnością szybkości metabolizmu tkanek od rozmiarów ciała jak i dużą zbieżnością sumy metabolizmu tkanek danego zwierzęcia z jego przemianą podstawową.



Wiele danych wskazuje, że metabolizm tkanek zwierzęcia można porównywać nie tylko z jego przemianą podstawową, lecz i czynnościową. Kleiber (42) podaje diagram zawierający porównanie metabolizmu trzech tkanek wyizolowanych ze zwierząt najedzonych i głodzonych.  $Q_{O_2}$  tkanek ze zwierząt najedzonych był wyższy niż z głodzonych, w przypadku wątroby o 59%, przepony o 31% i mózgu o 53%. Przyspieszenie metabolizmu zwierząt przez ciepłotwórcze działanie pokarmu zachowuje się więc i w izolowanych tkankach. Poprzednio wspomnieliśmy, że metabolizm zwierząt stałocieplnych, trzymany w chłodzie, jest znacznie szybszy niż trzymany w warunkach termicznie neutralnych. To przyspieszenie wykazują również tkanki wyizolowane ze zwierząt, które przez dostatecznie długi czas przebywały w chłodzie. Weiss (68, 69) stwierdził to na skrawkach wątroby, przepony, serca i mięśni szkieletowych szczurów trzymany przed badaniem przez 5 dni w temperaturze  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ . Szybkość metabolizmu najbardziej zwiększała się w tkance wątrobowej, natomiast w tkance mózgowej, śledziony i mięśni gładkich jelit pozostawała bez zmiany.  $Q_{O_2}$  mięśni szkieletowych lemingów trzymany w  $1^\circ\text{C}$  był o 40% wyższy niż lemingów kontrolnych (25). Hannon i Vaughan (34) stwierdzili, że w tkankach szczurów aklimatyzowanych do zimna zwiększa się stężenie oksydazy bursztynianowej.

Zbieżność wartości sumarycznego metabolizmu izolowanych tkanek i metabolizmu całych zwierząt przeczy przypuszczeniom (29, 64), że metabolizm tkanek *in vivo* jest hamowany przez mechanizmy centralne i regulowany racjonowanym zaopatrzeniem komórek w tlen. Nie znaczy to jednak, że jak utrzymują dość zdecydowanie Weymouth i wsp. (70), Schmidt-Nielsen (59) i Fuhrman i wsp. (27) oraz mniej zdecydowanie Krebs (46), szybkość metabolizmu zwierząt i jej zależność od rozmiarów ciała muszą być uwarunkowane czynnikami tkwiącymi w samych komórkach i odziedziczonymi przez te komórki. Komórki różnych zwierząt z pewnością przystosowały się w drodze ewolucji do metabolizowania z taką szybkością, że metabolizm przeliczony na jednostkę ciężaru jest większy u zwierząt małych niż u dużych. Stąd na przykład wynikają różnice w stężeniu enzymów. Komórki zwierząt mają jednak potencjalną możliwość wykonania znacznie większej „pracy metabolicznej” niż tego wymaga przemiana podstawowa. Ich metabolizm maksymalny może być bowiem przez pewien czas nawet stokrotnie większy od przemiany podstawowej (10). Tak szybki metabolizm komórek, jak się zdaje, jest możliwy tylko przy działaniu centralnych regulatorów. Regulatory te mogą działać nie jako hamulce, jak to sobie wyobrażał Grafé (29), lecz jako stymulatory. Za stymulującym działaniem centralnego regulatora przemawia metabolizm tkanki mięśniowej. Wspominaliśmy już, że produkcja ciepła w organizmie zwierząt trzymany w środowisku fizjologicznie chłodnym znacznie wzrasta. Ten wzrost zachodzi głównie

dzięki wzmożeniu pracy mięśniowej (zwiększenie tonusu, widoczne drżenie). Wystarczy jednak pozbawić tkankę mięśniową impulsów nerwowych wprowadzając do organizmu 10% letalnej dawki kurary (35), by temperatura ciała spadła znacznie poniżej normalnej i to nawet wówczas, gdy zwierzę przebywa w warunkach termicznie neutralnych. Znane są też zaburzenia termoregulacji po uszkodzeniu rdzenia kręgowego (21), a najgorliwszy nawet obrońca niezależności metabolicznej komórek od systemów centralnych nie ośmielił się twierdzić, że w izolowanych tkankach zwierząt stałocięplnych szybkość metabolizmu zwiększa się pod wpływem chłodu. Ze względu na dużą zależność tkanki mięśniowej od centralnych regulatorów nie można się dziwić, że jej metabolizm *in vitro* nie odpowiada w pełni wkładowi wnoszonemu przez mięśnie w przemianę podstawową zwierzęcia. Nic też dziwnego, że zależność między metabolizmem izolowanej tkanki mięśniowej a rozmiarami ciała zwierząt nie jest równoległa do zależności między przemianą podstawową a rozmiarami ciała.

Powyższe rozumowanie zdaje się potwierdzać słuszność zdania Kleibera (42), że podobieństwo metabolizmu tkanek *in vitro* i *in vivo* nie usprawiedliwia wniosku, iż regulator metabolizmu tkanek jest w nich zlokalizowany. Szybkość metabolizmu w tkankach jest zdeterminowana przez warunki w nich panujące, lecz na warunki te wpływają systemy regulujące. Wpływ ich zachowuje się przez pewien czas w tkance nawet po jej wyizolowaniu z organizmu. Można jednak słusznie zapytać, w jakim stopniu zanika pierwotne działanie mechanizmów centralnych w wyizolowanej tkance? Na to pytanie nie ma chyba generalnej odpowiedzi. W przypadku tkanki mięśniowej, której praca jest regulowana głównie przez system nerwowy za pośrednictwem szybko rozkładającej się acetylocholino, wpływ centralnego regulatora może zanikać prawie całkowicie natychmiast po wyizolowaniu. Inne czynniki mogą natomiast działać dłużej. Prawdopodobnie dość wolno zanika wpływ tyroksyny, a z pewnością powoli ustaje działanie tych czynników, dzięki którym w tkance ustala się pewne stężenie enzymów oddechowych czy mioglobiny. W przypadku tkanki wątrobowej, która nawet *in situ* stanowi pewnego rodzaju laboratorium biochemiczne, mniej zależne od systemu nerwowego, a więcej od stężenia przyniesionych do wątroby lub wytworzonych w niej materiałów, sprawa może się przedstawiać odmiennie niż w przypadku tkanki mięśniowej. Wyizolowanie tkanki wątrobowej w mniejszym stopniu będzie naruszać jej pracę i stąd metabolizm tej tkanki *in vitro* bardziej przypomina przemianę podstawową, a w pewnych warunkach i czynnościową, całego organizmu. Stąd też metabolizm izolowanej tkanki wątrobowej w większym stopniu odzwierciedla wzmożoną termogenezę zwierząt trzymanyh w chłodzie niż tkanka mięśniowa, która *in vivo* jest głównym motorem tej termogenezy.

### 3. Możliwe przyczyny niezgodności wyników badań nad metabolizmem izolowanych tkanek

Badania nad przemianą podstawową zwierząt przeprowadza się w ściśle określonych i racjonalnie uzasadnionych warunkach. Trudno jednak zdecydować jakie warunki uznać za właściwe do badania tkanek *in vitro*. Poważny wpływ na szybkość metabolizmu tkanek ma sposób ich przygotowania do oznaczeń. Najczęściej sporządza się skrawki, miazgę lub homogenaty. Należy zgodzić się z K r e b s e m (46), że skrawki tkanek są „bliższe stanowi naturalnemu” niż miazga lub homogenat, ponieważ procent uszkodzonych fizycznie komórek jest w nich najmniejszy. Naruszenie normalnej struktury komórek poważnie obniża szybkość ich metabolizmu (31, 44).

K r e b s (46) przebadął metabolizm tkanek inkubowanych w surowicy krwi, surowicy uzupełnionej niektórymi metabolitami oraz w trzech sztucznych środowiskach, oznaczonych jako I, II i III. Pobieranie tlenu przez skrawki inkubowane w tych sztucznych środowiskach było intensywniejsze niż w stosowanych wcześniej przez innych autorów.  $Q_{O_2}$  większości tkanek nie zależał w znaczniejszym stopniu od tego, w którym ze środowisk Krebsa były one inkubowane. Większe różnice stwierdzono tylko w przypadku kory mózgowej i tkanki wątrobowej. Pobieranie tlenu przez korę mózgową inkubowaną w środowisku II było od 37 do 87% większe niż w środowisku III. Ponieważ jednak wartości przy użyciu śro-

Tablica 3

Pobieranie  $O_2$  przez tkanki szczura w trzech różnych roztworach (w  $mm^3/godz./mg$  suchej masy)

Ciężar ciała g	Wątroba	Śledziona	Nerka	Mięsień szkieletowy	Serce	Przepona	Mózg	Litera- tura
Roztwór Krebsa-Ringera								
150—250	9,08	—	14,19	—	8,48	6,08	8,70	(4)
100—150	4,90	—	11,80	—	7,90	5,60	9,80	(68)
250	5,50	7,10	14,50	3,10	10,50	5,80	6,50	(69)
273	7,53	—	20,70	—	10,40	—	12,00	(23)
Roztwór Locke-Ringera								
320	23,98	—	40,20	—	27,21	5,04	—	(17)
Roztwór Krebsa III								
260	14,60	—	—	—	—	—	19,30	(46)
263	10,14	9,90	15,40	3,90	7,38	7,66	11,40	(37)

dowiska III są zbliżone do wartości pobierania tlenu przez tkankę mózgową *in situ*, Krebs wnioskuje, że  $Q_{O_2}$  tkanki w środowisku II był „nie-normalnie wysoki”.

Zatem nawet wówczas, gdy stosuje się ten sam sposób przygotowywania tkanek, szybkość pobierania tlenu może być różna, gdy użyje się innych środowisk do inkubacji. Ilustrują to przykładowe dane w tablicy 3.

Krebs (46) nie poleca w sposób zdecydowany żadnego z wypróbowanych środowisk, niemniej większość późniejszych autorów używało środowiska III. Stało się więc ono środowiskiem standardowym, mimo że nie podaje go podstawowy podręcznik technik manometrycznych (65).

W przypadku zbyt grubego skrawka szybkość dyfuzji tlenu i metabolitów może być zbyt mała aby dotarły one do komórek leżących w centrum skrawka. Oznaczenia ilościowe byłyby wówczas obarczone poważnym błędem. Grubość maksymalną dla pełnej penetracji skrawka przez tlen oblicza się z wzoru Warburga (65). Przyjmuje się, że gdy grubość skrawka nie przekracza 0,5 mm, a faza gazowa w naczynku użytym do inkubacji zawiera czysty tlen, wszystkie komórki skrawka są zaopatrzone w tlen i uczestniczą w oddychaniu. Aby mieć pełne zaufanie do tego rodzaju obliczeń należy mieć pewność, że wstawiana do wzoru Warburga stała dyfuzji jest właściwa. Stała dyfuzji gazów poprzez tkanki oznaczył Krogh (48). Można jednak podejrzewać, że ustalone przez tego autora stałe są za wysokie. Houston i Martin (37) stwierdzili bowiem, że polepszenie dostępu tlenu do tkanek przez umieszczenie skrawków na specjalnych wkładkach z włókna szklanego zwiększa zużycie tlenu co byłoby niemożliwe gdyby tkanki badane standardową techniką były w pełni zaopatrzone w tlen, jak to wynikało z obliczeń. O niepełnej penetracji tlenu do tkanek badanych standardową techniką Warburga świadczą również wyniki badań Cascarano i wsp. (14, 15, 16)\*.

W tym przypadku, a także wtedy, gdy środowisko inkubacyjne nie zawiera odpowiedniej ilości metabolitów, zużycie tlenu może być „nie-normalnie niskie”. Zaniżone wyniki oznaczeń metabolizmu tkanek mogą być przyczyną, że sumaryczny metabolizm wszystkich tkanek zwierzęcia jest niższy od jego przemiany podstawowej. Z drugiej strony warto zwrócić uwagę, że może on być większy od przemiany podstawowej gdy zwiększy się dostęp tlenu do tkanki (37) i uwzględni w obliczeniach poprawki na rzeczywistą głębokość penetracji skrawka przez tlen. Popie-

\* Autorzy ci zauważyli, że sole tetrazoliowe dodane do środowiska inkubacyjnego wnikają do tkanek i ulegają w nich zredukowaniu. Powstające formazany mają silne zabarwienie, dzięki czemu łatwo jest zmierzyć pod mikroskopem głębokość na jaką wnikają one do tkanki. Z reguły wnikają one tylko do warstwy powierzchniowej. Ponieważ Cascarano i wsp. (14, 15, 16) wykazali, że na tę samą głębokość wnika do tkanki tlen, można określić jaka część badanego skrawka bierze udział w metabolizmie. Najbardziej przydatny do tego celu okazał się chlorek 2-p-jodofenylo-3-p-nitrofenylo-5-fenylo tetrazoliowy (INT). Zainteresowanym szczegółami zastosowania soli tetrazoliowych w badaniach histochemicznych można polecić cytowane powyżej prace oraz artykuł Anczykowskiego (1).

rałoby to przekonanie Grafe'a (29), że tkanki oddychają intensywniej *in vitro* niż *in situ*. Czy dotyczy to jednak wszystkich tkanek? Poprzednio wysunęliśmy przypuszczenie, że metabolizm tkanki mięśniowej *in vitro* jest znacznie wolniejszy niż *in situ*. Możliwe, że inne tkanki mniej zależne od systemu nerwowego, na przykład wątroba, oddychają *in vitro* znacznie intensywniej niż *in vivo*. Fakt, że zależność szybkości metabolizmu tkanki wątrobowej *in vitro* od rozmiarów ciała można ująć równaniem  $M = kW^{1/4}$  czyli takim samym jak zależność między przemianą podstawową a rozmiarami ciała, wcale nie wyklucza tej możliwości. Identyczny wykładnik potęgowy ( $-1/4$ ) świadczy bowiem tylko o identycznym nachyleniu linii ilustrujących omawiane zależności, a nie o tym, że te linie pokrywają się. Mogą one bowiem przebiegać równolegle, przy czym w przypadku metabolizmu tkanki wątrobowej *in vitro* wartość  $k$  w równaniu byłaby wyższa niż to by wypadało z udziału tej tkanki w przemianie podstawowej całych zwierząt. Bezpośredniego sprawdzianu słuszności wypowiedzianych przypuszczeń dotychczas nie ma i nie będzie dopóty, dopóki nie znajdzie się sposobu badania metabolizmu poszczególnych narządów *in situ*. Badania takie niewątpliwie przyczyniłyby się do bliższego poznania stosunku metabolizmu tkankowego do metabolizmu całych zwierząt — zagadnienia, w którym tkwi jeszcze sporo niejasności.

Wskazując na istniejące niejasności i na potrzebę badania metabolizmu całych narządów *in situ* nie mamy bynajmniej zamiaru negowania celowości badań nad metabolizmem izolowanych tkanek. Wyniki otrzymywane w tych badaniach, przy zachowaniu jednakowych warunków, są dość powtarzalne. Różnice w metabolizmie tkanek ze zwierząt znajdujących się przed zabiciem w warunkach podstawowych i ze zwierząt znajdujących się w innych warunkach (najedzonych, aklimatyzowanych do różnych temperatur lub ciśnień atmosferycznych, traktowanych hormonami) świadczą o tym, że zmiany wywołane stanem czynnościowym zwierzęcia przynajmniej częściowo zachowują się w wyosobnionych tkankach. Pozwala to badać *in vitro* na jakie procesy biochemiczne w poszczególnych tkankach działają czynniki wywierające wpływ na metabolizm całego zwierzęcia.

#### LITERATURA

1. Anczykowski F., *Medycyna Wet.* **15**, 588 (1959).
2. Barott H. G., Pringle E. M., *J. Nutrition* **31**, 35 (1946).
3. Bertalanffy von L., *Q. Rev. Biol.* **32**, 217 (1957).
4. Bertalanffy von L., Pirozynski W. J., *Science* **113**, 599 (1951).
5. Bertalanffy von L., Estwick R. R., *Am. J. Physiol.* **173**, 58 (1953).
6. Bertalanffy von L., Pirozynski W. J., *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.* **105**, 246 (1953).

7. Bladergroen W., Einführung in die Energetik und Kinetik biologischer Vorgänge. Wepf. and Co., Basle 1955.
8. Blaxter K. L., Graham N. McC., Wainman F. W., Armstrong D. G., *J. Agr. Sci. Camb.* **52**, 25 (1959).
9. Brody S., Bioenergetics and Growth. Reinhold, New York 1945.
10. Brody S., *Res. Bull. Mo. Agric. Exp. Stn.* **423** (1948).
11. Brody S., Kibler H. H., Ragsdale A. C., *Res. Bull. Mo. Agric. Exp. Stn.* **335** (1941).
12. Brody S., Kibler H. H., Trowbridge E. A., *Res. Bull. Mo. Agric. Exp. Stn.* **368** (1943).
13. Bykov K. M., Vladimirov G. E., Delov V. E., Konradi G. P., Slonim A. D., *Učebnik Fizjologii. Medgiz. Moskva* 1955.
14. Cascarano J., Rubin A. D., Chick W. L., Zweifach B. W., *Am. J. Physiol.* **206**, 373 (1964).
15. Cascarano J., Zweifach B. W., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, 215 (1959).
16. Cascarano J., Zweifach B. W., *Am. J. Physiol.* **200**, 1285 (1961).
17. Clark R. T. Jr., Chinn H. I., Ellis J. P. Jr., Pawel N. E. R., Criscudo D., *Am. J. Physiol.* **177**, 207 (1954).
18. Crandall R. R., Smith A. H., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **79**, 345 (1952).
19. Dill D. B., *Physiol. Rev.* **16**, 263 (1936).
20. Du Bois D., Du Bois E. F., *Arch. Int. Med.* **17**, 863 (1916).
21. Du Bois E. F., Lane Lectures. Stanford University Press, 1937.
22. Dukes H. H., The Physiology of Domestic Animals, Comstock Publ. Co. Ithaca, New York 1947.
23. Field J., *Meth. Med. Res.* **1**, 289 (1948).
24. Field J., Belding H. S., Martin A. W., *J. Cell. Comp. Physiol.* **14**, 143 (1939).
25. Fischer K. C., Adaptation to Temperature in Fish and Small Mammals. W pracy zbiorowej: Physiological Adaptations, red. C. L. Prosser. American Physiological Society, Washington 1959.
26. Fried G. H., Tripton S. R., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **82**, 531 (1953).
27. Fuhrman F. A., Fuhrman G. J., Farr D. A., Fail J. H., *Am. J. Physiol.* **201**, 231 (1961).
28. Gelineo S., The Temperature Regulating System. W pracy zbiorowej: Handbook of Physiology. Section 4. Adaptation to environment. American Physiological Society, Washington 1964.
29. Grafe E., *Med. Wochenschr.* **51**, 640 (1925).
30. Graham N. McC., *Aust. J. Agric. Res.* **15**, 969 (1964).
31. Green D. E., Reconstruction of the Chemical Events in Living Cells. Perspective in Biochemistry. Cambridge University Press, Cambridge 1938.
32. Gregory W. P., Goss J., *J. Exptl. Zool.* **66**, 155 (1933).
33. Hall W. C., Brody S., *Res. Bull. Mo. Agric. Exp. Stn.* **180** (1933).
34. Hannon J. P., Vaughan D. A., *Am. J. Physiol.* **198**, 375 (1960).
35. Hemingway A., Hathaway S. R., *Am. J. Physiol.* **134**, 596 (1941).
36. Hemmingsen A., *Rep. Steno. Hosp. Nord. Insulinlab.* **9**, 1 (1960).
37. Huston M. J., Martin A. W., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **86**, 103 (1954).
38. Joyce J. P., Blaxter K. L., *Brit. J. Nutr.* **18**, 5 (1964).
39. Kleiber M., *Hilgardia* **6**, 315 (1932).
40. Kleiber M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **48**, 419 (1941).
41. Kleiber M., *Physiol. Rev.* **27**, 511 (1947).

42. Kleiber M., *The Fire of Life*. John Wiley and Sons, New York-Londyn 1961.
43. Kleiber M., *Metabolic Body Size*. Energy Metabolism, Academic Press, Londyn-New York 1965, str. 427.
44. Kleiber M., Cole H. H., Smith A. H., *J. Cell. Comp. Physiol.* **22**, 170 (1943).
45. Kleiber M., Smith A. H., Chernikoff H. N., *Am. J. Physiol.* **186**, 9, (1956).
46. Krebs H. A., *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 249 (1950).
47. Krogh A., *The Respiratory Exchange of Animals and Man*, Longmans Green, Londyn 1916.
48. Krogh A., *J. Physiol.* **52**, 391 (1919).
49. Krogh A., *The Anatomy and Physiology of Capillaries*. Yale University Press, New Haven 1929.
50. Kunkel H. O., Campbell E. J. Jr., *J. Biol. Chem.* **198**, 229 (1952).
51. Martin A. W., Fuhrman F. A., *Am. J. Physiol.* **133** (2): P 379 (1941).
52. Meeh K., *Z. Biol.* **15**, 425 (1879).
53. Patrušev V. J., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **14**, 573 (1937).
54. Poczopko P., *Acta Physiol. Pol.* **16**, 879 (1965).
55. Poczopko P., *Energy Metabolism of Farm Animals*. European Association for Animal Production Publ. No. 12, Oriol Press, Newcastle 1969, str. 361.
56. Rosenthal O., Drabkin D. L., *J. Biol. Chem.* **150**, 131 (1943).
57. Rubner M., *Z. Biol.* **19**, 535 (1883).
58. Rubner M., *Die Gesetze des Energieverbrauches bei der Ernährung*. Leipzig und Wienn 1902.
59. Schmidt-Nielsen K., *Science* **114**, 366 (1951).
60. Scholander P. F., *Evolution* **9**, 15 (1955).
61. Spector, *Handbook of Biological Data*. Saunders Co., Philadelphia — Londyn 1956.
62. Stoeltzner W., *Schriften d. Koenningsberger Gelehrte Gesellschaft Naturw.* Kl. 5, 145 (1928).
63. Szabuniewicz B., *Zarys Fizjologii Człowieka*, Gdańskie Towarzystwo Naukowe, Gdańsk 1957.
64. Terroine E. F., Roche J., *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **180**, 225 (1925).
65. Umbreit W.W., Burris R.H., Stauffer J. F., *Manometric Techniques*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota 1957.
66. Voit E., *Z. Biol.* **41**, 113 (1901).
67. Walawski J., Kaleta Z., Krauze M., *Fizjologia Człowieka*. P.Z.W.L., Warszawa 1956.
68. Weiss A. K., *Am. J. Physiol.* **177**, 201 (1954).
69. Weiss A. K., *Am. J. Physiol.* **188**, 430 (1957).
70. Weymouth F. W., Field J., Kleiber M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **49**, 367 (1942).
71. Zeuthen E., *Compt. Rend. Lab. Carlsberg. Ser. chim.* **26**, 17 (1947).
72. Zeuthen E., *Q. Rev. Biol.* **28**, 1 (1953).





JACEK ŚLIWOWSKI \*

## Mechanizmy reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami

### B. Metody badania

## Mechanisms of Enzymic Reactions with Two or More Substrates and Products

### B. Methods of Investigation

Methods of investigation of enzymic reaction mechanisms are described. Known mechanisms for some enzymic reactions are reviewed.

W artykule tym zostaną omówione podstawowe techniki eksperymentalne stosowane w badaniach mechanizmów reakcji enzymatycznych (to jest przy ustalaniu kolejności w jakiej przyłączają się do powierzchni enzymu substraty i uwalniane są z niej wytworzone produkty), oraz wyjaśnione sposoby interpretacji wyników uzyskanych przy zastosowaniu tych technik. Podany też zostanie przegląd wyników osiągniętych dotychczas w badaniach nad mechanizmami niektórych reakcji.

Zarówno poprzedni (52) jak i ten artykuł poświęcony jest w znacznej mierze omówieniu teoretycznych rozważań Cleland'a (9, 10, 11) oraz prac doświadczalnych planowanych na podstawach teoretycznych kinetyki złożonych reakcji enzymatycznych, które ten uczone opracował.

### I. Wprowadzenie

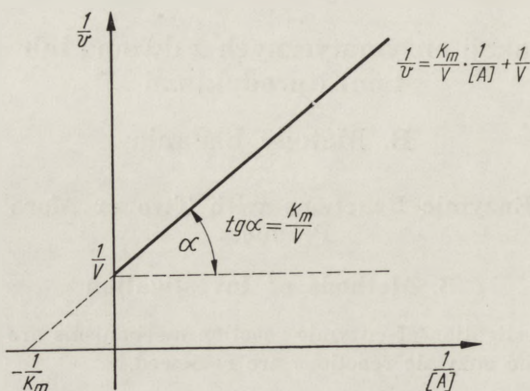
Równanie Michaelisa-Mentena można przekształcić w równoważną postać liniową:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V} \quad 1$$

gdzie:  $v$  — szybkość początkowa reakcji enzymatycznej,  $V$  — szybkość maksymalna (w danych warunkach), zaś  $K_m$  — stała Michaelisa interpretowana jako takie stężenie substratu  $[A]$ , przy którym reakcja osiąga połowę szybkości maksymalnej.

\* Mgr, Zakład Biochemii Roślin, Katedra Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa.

Jeżeli równanie 1 przedstawić graficznie odkładając na osi rzędnych wartości  $v$  a na osi odciętych wartości  $\frac{1}{[A]}$  wówczas otrzymana prosta przecnie oś rzędnych w punkcie o wartości  $\frac{1}{V}$ , a miarą jej nachylenia w stosunku do osi odciętych będzie wartość  $\frac{K_m}{V} = \operatorname{tg} \alpha$  (rysunek 1).



Rys. 1. Postać graficzna równania Michaelisa-Mentena

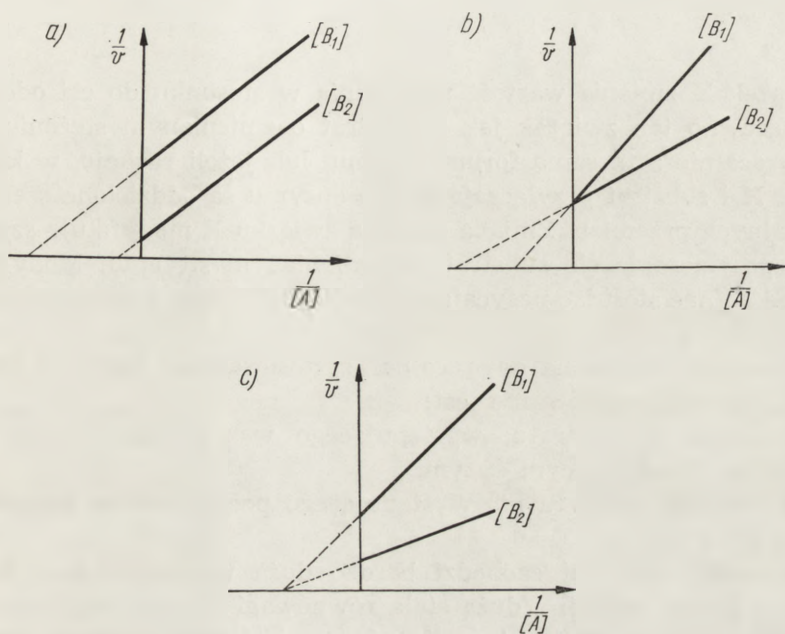
Podobne przedstawienie graficzne można zastosować przy badaniu reakcji enzymatycznych, w których występuje więcej niż jeden substrat. W przypadku reakcji enzymatycznej, w której biorą udział 2 substraty A i B wyniki otrzymane przy pomiarach szybkości początkowych reakcji dla różnych stężeń A (przy ustalonym stężeniu B) opisuje równanie 2, analogiczne do równania 1.

$$\frac{1}{v} = (\text{nachylenie}) \cdot \frac{1}{[A]} + (\text{przecięcie}) \quad 2$$

Jednakże dla wykresu przedstawiającego zależność szybkości reakcji  $v$  od stężenia substratu A w układzie współrzędnych  $\frac{1}{v}$  na  $\frac{1}{[A]}$  wartość punktu przecięcia prostej z osią rzędnych będzie zależała od stężenia drugiego substratu B. Także wartość nachylenia w stosunku do osi odciętych może być różna dla różnych stężeń drugiego substratu. Obrazuje to rysunek 2, przedstawiający zależności  $v$  od  $[A]$  dla dwóch różnych ale ustalonych w danej serii doświadczeń stężeń substratu B, na przykład  $[B_1]$  i dla  $[B_2]$ . Wykresy dla  $[B_1]$  i dla  $[B_2]$  różnią się bądź wartością punktów przecięcia z osią rzędnych (rysunek 2a), bądź wartością nachylenia w stosunku do osi odciętych (rysunek 2b), bądź jednym i drugim parametrem (rysunek 2c).

Wartość punktu przecięcia prostej z osią rzędnych w układzie współrzędnych  $\frac{1}{v}$  na  $\frac{1}{[A]}$  jest liczbowo równa odwrotności szybkości reakcji

enzymatycznej przy nasycającym stężeniu substratu A. Jeżeli wartość ta zmieni się w wyniku zmiany stężenia substratu B oznacza to, że jest ona funkcją  $[B]$  niezależnie od  $[A]$ , ponieważ zmiana wystąpiła nawet przy nasycającym stężeniu A. Zmiana wartości nachylenia prostej w stosunku do osi odciętych w takim układzie współrzędnych w wyniku zmiany  $[B]$  jest również dowodem, że stężenie substratu B wpływa na szybkość reakcji przy zmiennym  $[A]$ .



Rys. 2a, b, c. Zależność szybkości ( $v$ ) reakcji dwusubstratowej od stężenia substratów (A i B). Objasnienia w tekście

Zmiany wartości punktów przecięcia z osią rzędną oraz nachylenia w stosunku do osi odciętych można powiązać z mechanizmem danej reakcji enzymatycznej. Na przykład zależność  $v$  od  $[A]$  będzie modyfikowana przez zmianę  $[B]$  w różny sposób w zależności od tego czy reakcja przebiega według mechanizmu sekwencyjnego, uporządkowanego czy według mechanizmu typu ping-pong.

Cleland (11) ustalił ściśle reguły wiążące mechanizm reakcji enzymatycznej ze sposobem modyfikacji wartości punktów przecięcia, czy wartość nachylenia prostej, obrazującej zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu wykreślonej w układzie współrzędnych  $\frac{1}{v}$  na  $\frac{1}{\text{stężenie substratu}}$  (podwójnie odwrotnościowy układ współrzędnych, skrót P.O.U.W.) wywołanych przez zmiany stężeń innych substratów, czy produktów tej reakcji.

### Reguła 1

Związek X zmienia wartość punktu przecięcia z osią rzędnych jeżeli łączy się odwracalnie z inną formą enzymu (wolny enzym lub kompleks enzym-substrat(y) czy enzym-produkt(y)) niż ta, z którą łączy się substrat o stężeniu zmienianym w danej serii eksperymentów. Oznacza to, że zmiany szybkości reakcji enzymatycznej wywołanej przez związek X nie można usunąć nawet przez stosowanie nasycających stężeń substratu o zmienianym stężeniu.

### Reguła 2

Związek X zmienia wartość nachylenia w stosunku do osi odciętych jeżeli zarówno ten związek jak i substrat o zmienianym stężeniu łączą się odwracalnie z tą samą formą enzymu, lub jeżeli reakcje, w których związek X i substrat przyłączają się do enzymu są oddzielone szeregiem odwracalnych przemian. Zmiana stężenia związku X modyfikuje szybkość reakcji przyłączenia się substratu o zmienianym stężeniu. Modyfikację tę można cofnąć stosując nasycające stężenie substratu o zmienianym stężeniu.

Określenie „przemiana odwracalna” zastosowane w regule 2 oznacza tu każdą przemianę, która nie jest:

- a) przyłączeniem substratu, występującego w mieszaninie reakcyjnej w stężeniu nasycającym enzym,
- b) uwolnieniem produktu nie występującego początkowo w mieszaninie reakcyjnej,
- c) przemianą, w której zachodzi bardzo duża ujemna zmiana energii swobodnej, w reakcji z dużą stałą równowagi termodynamicznej.

Podane reguły stosują się tylko do mechanizmów reakcji enzymatycznych, w których nie ma alternatywnych sekwencji reakcji (mechanizmy sekwencyjne, uporządkowane i mechanizmy typu ping-pong). Zależności dla mechanizmów sekwencyjnych o dowolnej kolejności są bardziej złożone (9, 10).

Przedstawione sformułowania reguł Clelanda związane są z wyborem tej liniowej postaci równania Michaelisa-Mentena, która zwana jest równaniem Lineweavera-Burka oraz układu P.O.U.W. Wybór innej liniowej postaci równania Michaelisa-Mentena (47) i inaczej określonego układu współrzędnych wymagałby zmiany sformułowania tych reguł.

## II. Sposoby badania mechanizmów reakcji enzymatycznych

### 1. Badanie modeli szybkości początkowych

Wykorzystanie tej techniki do ustalenia mechanizmu stosunkowo prostej reakcji enzymatycznej, w której występują tylko dwa substraty wymaga pomiarów szybkości początkowych reakcji w następujących warunkach:

- a) zmienne stężenie substratu A w mieszaninie wyjściowej, substrat B dodawany w kilku (np. dwóch) różnych ale ustalonych stężeniach dla danej serii stężeń A,
- b) zmienne stężenie substratu B dla kilku różnych ale ustalonych stężeń substratu A.

Mieszanina reakcyjna zawiera zawsze enzym o takiej samej lub porównywalnej aktywności.

Jeżeli otrzymane w ten sposób wyniki dla warunków podanych w punkcie a) zostaną przedstawione graficznie w układzie współrzędnych  $\frac{1}{v}$

na  $\frac{1}{[A]}$  to istnieją *a priori* dwie możliwości. Proste ilustrujące zależność  $v$  od  $[A]$  dla różnych ale ustalonych  $[B]$  będą do siebie równoległe (rysunek 2b) albo będą się przecinały (por. rysunki 2a i 2c).

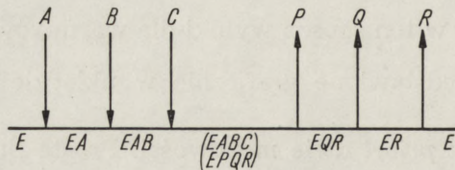
Równoległość prostych oznacza, że zmiana stężenia substratu B zmienia wyłącznie wartość punktu ich przecięcia z osią rzędnych a nie wpływa na wielkość nachylenia do osi odciętych. Zmiana wartości punktu przecięcia wskazuje zgodnie z regułą 1, że substrat B łączy się z inną formą enzymu niż substrat A. Z reguły 2 wnioskujemy na podstawie nie zmienionego nachylenia prostej, że pomiędzy przyłączeniem A i przyłączeniem B zaszła jakaś nieodwracalna przemiana. Ponieważ wymieniona w regule 2 możliwość reakcji nieodwracalnej polegająca na przyłączeniu substratu występującego w stężeniu nasycającym jest w rozważanym przypadku wykluczona, najprościej jest założyć, że pomiędzy przyłączeniem substratów A i B zachodzi uwolnienie produktu. Taki równoległy model szybkości początkowych wskazuje więc na mechanizm typu ping-pong.

Jeżeli proste przecinają się na osi rzędnych (rysunek 2a) wtedy zmienia się tylko wielkość nachylenia w stosunku do osi odciętych, nie zmienia się punkt przecięcia z osią rzędnych. Zatem zgodnie z regułą 1 i regułą 2 substrat A i substrat B mogą się przyłączyć do tej samej formy enzymu co sugeruje, że reakcja przebiega według mechanizmu sekwencyjnego o dowolnej kolejności przyłączania substratów.

Przecinanie się prostych na osi odciętych (rysunek 2c) oznacza, że związek B zmienia zarówno wartość punktu przecięcia z osią rzędnych, jak i wielkość nachylenia do osi odciętych, czyli zgodnie z regułami 1 i 2 substrat A łączy się z inną formą enzymu niż substrat B oraz pomiędzy przyłączeniem substratu A i substratu B nie zachodzi żadna nieodwracalna przemiana. Taka sytuacja jest typowa dla mechanizmów sekwencyjnych, uporządkowanych. Wobec tego tak zwany przecinający się model szybkości początkowych wskazuje, że reakcja enzymatyczna przebiega według mechanizmu sekwencyjnego.

Analogiczne rozumowanie można przeprowadzić dla warunków opisanych pod b).

Trudniejszym problemem jest interpretacja modeli szybkości początkowych otrzymanych przy badaniu mechanizmów reakcji enzymatycznych z trzema lub więcej substratami. Szybkości początkowe reakcji enzymatycznej przebiegającej według mechanizmu sekwencyjnego, uporządkowanego, trzy-trzy (schemat 1), można mierzyć dla następujących zespołów warunków:



Schemat 1. Mechanizm reakcji sekwencyjny, uporządkowany, trzy-trzy

substrat A — zmienne stężenie, substrat B — ustalone stężenie na kilku wybranych poziomach i odwrotnie.

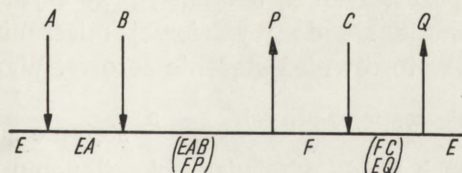
substrat A — zmienne stężenie, substrat C — ustalone stężenie jak wyżej i odwrotnie.

substrat B — zmienne stężenie, substrat C — ustalone stężenie jak wyżej i odwrotnie.

W każdym z tych przypadków warunkiem zajścia reakcji jest obecność trzeciego substratu w mieszaninie reakcyjnej, przy czym jego stężenie nie jest zmieniane. Istotne jest tylko czy występuje on w stężeniu nasycającym enzym, czy też w niższym.

Ponieważ pomiędzy przyłączeniem substratów A i B oraz B i C nie zachodzi przemiana nieodwracalna, więc dla tych par substratów otrzymamy przecinające się modele szybkości początkowych. Przy przewidywaniu modelu szybkości początkowych dla substratów A i C należy zwrócić uwagę na stężenie substratu B. Dla niskich stężeń B wystąpi przecinający się model szybkości początkowych. Przy nasycającym stężeniu substratu B model szybkości początkowych jest równoległy, gdyż przyłączenie B zachodzące pomiędzy przyłączeniem A i C jest przemianą nieodwracalną o ile [B] jest nasycające. W ten sposób można wykazać, który z trzech substratów przyłącza się do powierzchni enzymu jako drugi. Kolejności dwóch pozostałych substratów tą techniką nie da się ustalić.

Również w reakcji przebiegającej według mechanizmu typu ping-pong, dwa-jeden-jeden-jeden (schemat 2) można się spodziewać dla substratów A i B przecinających się modeli szybkości początkowych. Natomiast dla substratów A i C oraz B i C wystąpią równoległe modele szybkości początkowych, gdyż odłączenie produktu P zachodzące pomiędzy przyłączeniem pierwszego i drugiego substratu z każdej pary jest przemianą nieodwracalną.



**Schemat 2.** Mechanizm reakcji typu ping-pong, dwa-jeden-jeden-jeden

Cleland (14) podał też zależności dotyczące mechanizmów o dowolnej kolejności przyłączania substratów, czy odłączania produktów, gdzie istnieją alternatywne sekwencje reakcji. Przykładem może być reakcja enzymatyczna przebiegająca według mechanizmu sekwencyjnego o dowolnej kolejności, dwa-dwa (porównaj schemat 6 według (52)). W tym przypadku stosując reguły 1 i 2 można dla substratów A i B przewidzieć przecinające się modele szybkości początkowych. Stwierdzono dodatkowo, że jeżeli na przykład przyłączenie substratu A do enzymu ułatwia następnie przyłączenie substratu B, wtedy punkt przecięcia prostych leży powyżej osi odciętych. Gdy przyłączenie jednego substratu utrudnia przyłączenie następnego, to punkt przecięcia się tych prostych leży poniżej osi odciętych.

Z przedstawionych danych wynika, że każdemu mechanizmowi złożonej reakcji enzymatycznej można przyporządkować pewien charakterystyczny zespół modeli szybkości początkowych. Ustalenie na drodze doświadczalnej takiego zespołu modeli dla szeregu reakcji enzymatycznych o nieznanym mechanizmie, znacznie ułatwiło dalsze badania eliminując spośród wszystkich możliwych dla tych reakcji mechanizmów, te mechanizmy, dla których modele szybkości początkowych były niezgodne z wynikami doświadczeń.

## 2. Badanie hamowania reakcji produktami

Produkty reakcji enzymatycznej są jej inhibitorami, a wielkość zahamowania zależy od stężenia produktów. W warunkach fizjologicznych stacjonarne stężenie produktów reakcji w bezpośrednim sąsiedztwie enzymu utrzymywane jest na takim poziomie, że (pomijając przypadki regulacji aktywności enzymatycznej) hamowanie produktami nie ma istotnego wpływu na szybkość przebiegających w organizmie procesów metabolicznych (10, 56).

W badaniu mechanizmów reakcji enzymatycznych technika hamowania produktami uzupełnia w znacznym stopniu technikę modeli szybkości początkowych. W tej ostatniej rozpatruje się pary dwóch substratów a pomiary szybkości odnoszą się do tej fazy reakcji, kiedy nie zdążyły się jeszcze nagromadzić większe ilości produktów. Natomiast stosując technikę hamowania produktami analizuje się pary substrat-produkt. Szybkości początkowe reakcji mierzy się przy różnych stężeniach jednego

substratu (stężenia pozostałych są ustalone) przy czym dla ustalonej serii stężeń substratu dodaje się do wyjściowej mieszaniny różne stężenia produktu włączając w to również stężenie zerowe. Wyniki przedstawione graficznie w układzie współrzędnych  $\frac{1}{v}$  na  $\frac{1}{\text{stężenie substratu}}$  dają szeregi prostych, z których każda odpowiada określonemu stężeniu produktu.

Hamowanie reakcji enzymatycznej przez produkt przejawia się w zwiększeniu wartości punktu przecięcia prostych z osią rzędnych lub ich nachylenia w stosunku do osi odciętych bądź też w jednoczesnej zmianie obu parametrów.

W dalszym ciągu rozważane będą trzy rodzaje hamowania: kompetycyjne, częściowo kompetycyjne oraz niekompetycyjne (10, 47). Liniowa postać równania Michaelisa-Mentena (równanie 1) dla tych trzech rodzajów hamowania przyjmie odpowiednio następującą formę (równania 3, 4, 5):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \left( 1 + \frac{[I]}{K_{in}} \right) \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V} \quad 3$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V} \left( 1 + \frac{[I]}{K_{ip}} \right) \quad 4$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \left( 1 + \frac{[I]}{K_{in}} \right) \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V} \left( 1 + \frac{[I]}{K_{ip}} \right) \quad 5$$

gdzie [I] — stężenie produktu — inhibitora wyrażone w molach,  $K_{in}$  — stała inhibicji równoważna takiemu [I], przy którym następuje podwojenie wartości nachylenia prostej w stosunku do osi odciętych,  $K_{ip}$  — stała inhibicji równoważna stężeniu produktu, przy którym następuje podwojenie wartości punktu przecięcia prostej z osią rzędnych.

Z postaci równania 3 wynika, że w przypadku hamowania kompetycyjnego zmienia się nachylenie prostej w stosunku do osi odciętych, gdyż  $\frac{K_m}{V} \left( 1 + \frac{[I]}{K_{in}} \right) \neq \frac{K_m}{V}$ . Częściowo kompetycyjne hamowanie produktem (równanie 4) zmienia wartość punktu przecięcia prostej z osią rzędnych bo  $\frac{1}{V} \left( 1 + \frac{[I]}{K_{ip}} \right) \neq \frac{1}{V}$ . Przy hamowaniu niekompetycyjnym (równanie 5) obserwuje się zmianę obu parametrów.

Równanie szybkości reakcji dla przypadku hamowania produktami można otrzymać z pełnego równania szybkości badanej reakcji, przyjmując, że stężenia wszystkich produktów (z wyjątkiem tego, który jest dodawany do mieszaniny reakcyjnej) są w czasie pomiaru początkowych szybkości praktycznie równe zero. Proste przekształcenia algebraiczne doprowadzają takie uproszczone równania szybkości reakcji enzymatycznej w obecności określonego produktu do postaci analogicznej z równaniem 3, 4 lub 5. Na przykład pełne równanie na szybkość reakcji przebiegającej



według mechanizmu sekwencyjnego, uporządkowanego, jeden-dwa (por. poprz. artykuł (52)) można przekształcić do postaci, w której występują wyłącznie stałe kinetyczne. Równanie pełne ma postać:

$$v = \frac{V_1 V_2 \left( [A] - \frac{[P][Q]}{K_{eq}} \right)}{K_a V_2 + V_2 [A] + \frac{K_q V_1 [P]}{K_{eq}} + \frac{K_p V_1 [Q]}{K_{eq}} + \frac{V_1 [P][Q]}{K_{eq}} + \frac{V_2 [A][P]}{K_{ip}}} \quad 6$$

przy czym z zależności Haldane wynika, że:

$$K_{eq} = \frac{V_1 K_{ip} K_q}{V_2 K_a} = \frac{V_1 K_p K_{iq}}{V_2 K_a} \quad 7$$

Rozpatrujemy dwa warianty warunków pomiarów szybkości początkowych (w reakcji bierze udział tylko jeden substrat)

a) zmienne stężenia substratu A — obecny produkt P

b) zmienne stężenia substratu A — obecny produkt Q

Dla wariantu a) korzystając z równania 6 otrzymuje się:

$$v = \frac{V_1 V_2 [A]}{K_a V_2 + V_2 [A] + \frac{K_q V_1 [P]}{K_{eq}} + \frac{V_2 [A][P]}{K_{ip}}} \quad 8$$

Aby z równania 8 wyeliminować  $K_{eq}$  skorzystano z równania 7 i otrzymano postać

$$v = \frac{V_1 V_2 [A]}{K_a V_2 + V_2 [A] + \frac{V_1 V_2 K_a [P]}{V_1 K_p K_{iq}} + \frac{V_2 [A][P]}{K_{ip}}} = \frac{V_1 [A]}{K_a + [A] + \frac{K_a [P]}{K_p K_{iq}} + \frac{[A][P]}{K_{ip}}} \quad 9$$

Równanie 9 przekształcono:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a + [A] + \frac{K_a [P]}{K_p K_{iq}} + \frac{[A][P]}{K_{ip}}}{V_1 [A]} = \frac{K_a}{V_1 [A]} + \frac{1}{V_1} + \frac{K_a [P]}{K_p V_1 K_{iq} [A]} + \frac{[A][P]}{V_1 K_{ip} [A]} \quad 10$$

i po przegrupowaniu równania 10 otrzymano:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V_1} \left( 1 + \frac{[P]}{K_p K_{iq}} \right) \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_1} \left( 1 + \frac{[P]}{K_{ip}} \right) \quad 11$$

Z postaci równania 11 wynika, że produkt P jest inhibitorem niekompetycyjnym reakcji (por. równanie 5). Dla wariantu b) po analogicznych przekształceniach otrzymano następujące równanie szybkości reakcji w obecności produktu Q

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V_1} \left( 1 + \frac{[Q]}{K_{iq}} \right) \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_1} \quad 12$$

Produkt Q wywołuje więc inhibicję kompetycyjną (por. równanie 3).

Do tych samych wniosków można dojść znacznie szybciej korzystając bezpośrednio z reguł Clelanda. Z reguły 1 wynika, że wartość punktu przecięcia prostej z osią rzędnych ulega zmianie gdy produkt-inhibitor łączy się z inną formą enzymu niż substrat o stężeniu zmienianym przy pomiarach szybkości początkowych. Zmiana wielkości nachylenia w stosunku do osi odciętych pod wpływem produktu oznacza zgodnie z regułą 2, że produkt-inhibitor łączy się z tą samą formą enzymu, co substrat o zmienianym stężeniu lub, że przemiany, w których substrat i produkt przyłączają się do form enzymu nie są rozdzielone przemianą nieodwracalną. Dla mechanizmu sekwencyjnego, uporządkowanego, jeden-dwa wielkość nachylenia prostych w stosunku do osi odciętych zmienia się zarówno wtedy gdy inhibitorem jest produkt P (pomiędzy przyłączeniem produktu P i substratu A nie zachodzi przemiana nieodwracalna) jak i gdy inhibitorem jest produkt Q (produkt łączy się z tą samą formą enzymu co substrat A). Wartość punktu przecięcia z osią rzędnych zmieni się tylko wtedy, gdy inhibitorem jest produkt P. Tak więc produkt P jest inhibitorem niekompetycyjnym, ponieważ zmienia zarówno wielkość nachylenia jak i punkt przecięcia prostej, produkt Q zaś zmienia tylko wielkość nachylenia prostej, czyli jest inhibitorem kompetycyjnym.

Dla reakcji enzymatycznej przebiegającej według mechanizmu typu ping-pong, dwa-dwa (por. schemat 7 wg (52)) istnieją cztery warianty warunków, w których można zmierzyć szybkości początkowe reakcji wobec produktu P jako inhibitora. Analogiczne cztery warianty można wyróżnić dla hamowania produktem Q. Warianty te i rodzaje hamowania przewidziane dla rozważanej reakcji enzymatycznej według reguł 1 i 2 zestawiono w tabelicy 1.

**Tablica 1**

Hamowanie produktami reakcji enzymatycznej przebiegającej według mechanizmu typu ping-pong, dwa-dwa

Produkt	Substrat, którego stężenie zmieniamy			
	A		B	
	stężenie B niższe od nasycającego	nasycające stężenie B	stężenie A niższe od nasycającego	nasycające stężenie A
P	hamowanie niekompetycyjne	nie ma hamowania	hamowanie kompetycyjne	hamowanie kompetycyjne
Q	hamowanie kompetycyjne	hamowanie kompetycyjne	hamowanie niekompetycyjne	nie ma hamowania

Na bliższe omówienie zasługuje wariant, w którym produkt P nie powoduje hamowania. Dlaczego tak się dzieje? Jeżeli substrat B występuje w stężeniu nasycającym, wtedy znacznie obniża się stacjonarne stężenie formy enzymu F, z którą wiąże się ten substrat, wzrasta natomiast stacjonarne stężenie kompleksu FB. Produkt P, który wykazuje powinowactwo również do formy enzymu F nie ma się już z czym łączyć i nie działa hamująco.

Tablica 2 zestawia rodzaje hamowania produktami, które można przewidzieć dla reakcji enzymatycznej przebiegającej według mechanizmu sekwencyjnego, uporządkowanego dwa-dwa (schemat 1, wg (52)).

Tablica 2

Hamowanie produktami reakcji enzymatycznej przebiegającej wg mechanizmu sekwencyjnego, uporządkowanego, dwa-dwa

Produkt	Substrat, którego stężenie zmieniamy			
	A		B	
	stężenie B niższe od nasycającego	nasycające stężenie B	stężenie A niższe od nasycającego	nasycające stężenie A
P	hamowanie niekompety- cyjne	hamowanie częściowo kom- petycyjne	hamowanie niekompety- cyjne	hamowanie niekompety- cyjne
Q	hamowanie kompetycyjne	hamowanie kompetycyjne	hamowanie niekompety- cyjne	nie ma hamo- wania

Badając mechanizmy reakcji enzymatycznych omawianą techniką należy zwrócić uwagę na możliwość szczególnego rodzaju hamowania, mianowicie związki nie będące substratami ani produktami danej reakcji tworzą niekiedy z enzymem kompleksy, które nie ulegają już przemianom (ang. *dead-end inhibition*). Dla tego rodzaju hamowania proponuje się polski termin — hamowanie przez niedysocjujące kompleksy. Takie inhibitory zmieniają wielkość nachylenia lub wartość punktu przecięcia prostej tylko wtedy, gdy przyłączają się do enzymu wcześniej niż substrat o zmienianym stężeniu (11).

Częściej występuje mieszane hamowanie: produktami i przez niedysocjujące kompleksy. Możliwe jest ono wtedy, gdy produkt może się łączyć również z inną formą enzymu niż ta, z którą jest normalnie połączony. Skutki obu rodzajów hamowania nakładają się wówczas i zmiany stopnia nachylenia i wartości punktów przecięcia z osią rzędnych nie są proporcjonalne do stężenia inhibitora.

### 3. Badanie wymiany izotopowej w równowadze

Sposób ten polega na wprowadzeniu do mieszaniny reakcyjnej znakowanego substratu lub produktu i mierzeniu radioaktywności, która przechodzi do innych związków biorących udział w reakcji (4, 14). Mierzy się wówczas całkowitą szybkość reakcji w danym kierunku, a nie szybkość „netto” jak to ma miejsce przy badaniu modeli szybkości początkowych i hamowania produktami. Założenia stanu stacjonarnego w takim ujęciu w jakim były stosowane do wyprowadzenia równań szybkości dla reakcji enzymatycznych (52) nie są spełnione przy badaniu przemieszczania się radioaktywności pomiędzy substratami i produktami (14).

Badanie wymiany izotopowej w równowadze pozwala odróżnić mechanizmy sekwencyjne uporządkowane od mechanizmów sekwencyjnych o dowolnej kolejności. Okazało się, że dla reakcji, co do których badania modeli szybkości początkowej i hamowania produktami sugerowały mechanizm uporządkowany kinetyka wymiany izotopowej w równowadze ujawniała istnienie sekwencji alternatywnych (5, 58).

Najprostszym zaproponowanym wytłumaczeniem tych rozbieżności (44) jest sugestia, że alternatywnych sekwencji reakcji, które w warunkach pomiaru szybkości początkowych przebiegają z wielokrotnie mniejszą szybkością niż główny ciąg przemian nie można wykryć badając szybkość „netto”.

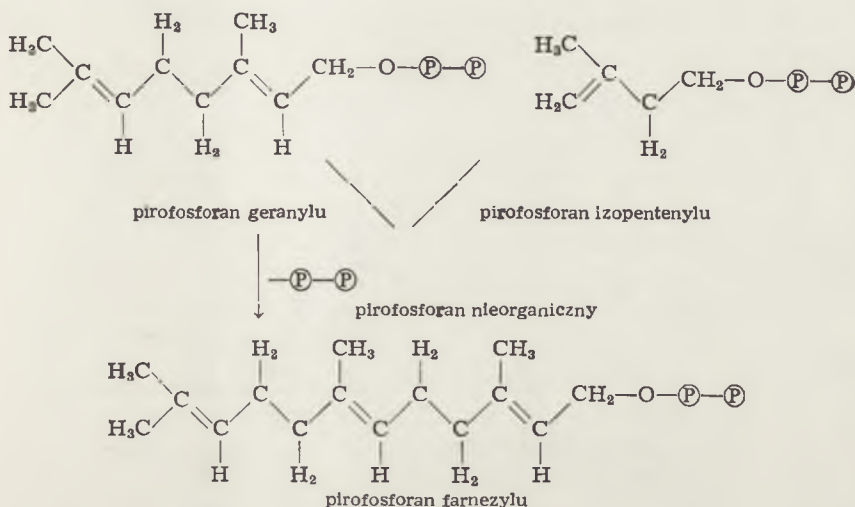
### III. Przykłady zastosowania techniki badania modeli szybkości początkowych i hamowania produktami

Najlepszą ilustracją przedstawionych rozważań teoretycznych będzie pokazanie w jaki sposób były one stosowane przez badaczy do rozwiązywania konkretnych problemów.

*Prenylotransferaza EC.2.5.1.1.* Cornforth i wsp. (16) wykazali, że enzym ten występujący w wątrobie świni katalizuje reakcję przedstawioną na schemacie 3, która jest etapem biosyntezy izoprenoidów.

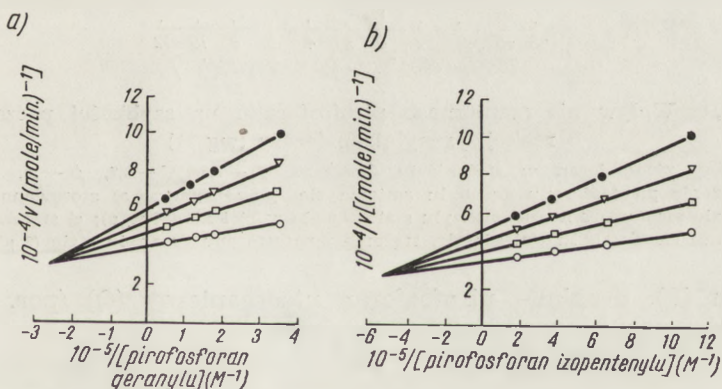
Ustalili też szereg szczegółów dotyczących tej reakcji, jak na przykład, że uwalniany pirofosforan nieorganiczny pochodzi z pirofosforanu izopentenylu (17). Wszystkie te dane nie wyjaśniły jednak mechanizmu reakcji. Zagadnienie to rozwiązali H o l o w a y i P o p j a k (31), stosując technikę hamowania produktami: nieorganicznym pirofosforanem i pirofosforanem farnezyli. Wyniki tych badań przedstawione są na rysunku 3 a, b oraz 4 a, b, c.

Pirofosforan farnezyli zachowuje się jak inhibitor niekompetycyjny bez względu na to czy substratem, którego stężenie zmienia się jest pirofosforan geranyli (rysunek 3a), czy pirofosforan izopentenylu (rysunek 3b). Nieorganiczny fosforan jest inhibitorem kompetycyjnym gdy zmienia się stężenie pirofosforanu geranyli (rysunek 4a) i inhibitorem niekompetycyjnym w stosunku do pirofosforanu izopentenylu (rysunek 4c).



**Schemat 3.** Reakcja katalizowana przez prenylotransferazę (EC. 2.5.1.1.) z wątroby świni (wg 16)

Taki zespół rodzajów hamowania produktami odpowiada mechanizmowi typu izo-ping-pong, dwa-dwa (schemat 8 wg (52)) lub mechanizmowi sekwencyjnemu, uporządkowanemu, dwa-dwa. Jednakże fakt, że pirofosforan nieorganiczny pochodzi z pirofosforanu izopentenyly wyklucza pierwszy mechanizm (9).



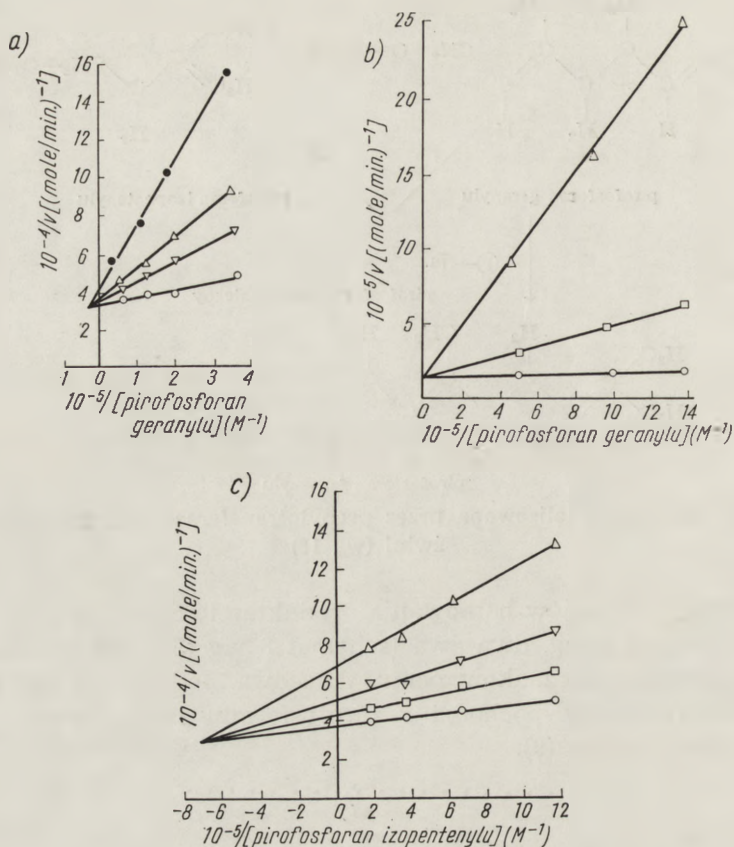
**Rys. 3a, b.** Wpływ pirofosforanu farnesyly na szybkości początkowe ( $v$ ) reakcji prenylotransferazy (wg 31)

Pirofosforan farnesyly w stężeniach:  $\circ$  — zero,  $\square$  — 2,  $\nabla$  — 4,  $\bullet$  — 8  $\mu\text{M}$

a) stężenie pirofosforanu geranyly zmienia się, stężenie pirofosforanu izopentenyly stałe (0,9  $\mu\text{M}$ );

b) stężenie pirofosforanu geranyly stałe (3  $\mu\text{M}$ ); stężenie pirofosforanu izopentenyly zmienia się.

Porównanie ustalonych rodzajów hamowania z danymi z tablicy 2 pokazuje, że jako pierwszy przyłącza się do powierzchni enzymu pirofosforan geranyly (A) a jako drugi — pirofosforan izopentenyly (B). Pierwszym związkiem dysocjującym z powierzchni enzymu jest pirofosforan



**Rys. 4a, b, c.** Wpływ nieorganicznego pirofosforanu na szybkości początkowe ( $v$ ) reakcji prenylotransferazy (wg 31)

Nieorganiczny pirofosforan w stężeniach:  $\circ$ —zero,  $\square$ —0,5,  $\nabla$ —0,7,  $\triangle$ —1,0,  $\bullet$ —1,5  $\mu\text{M}$ ; a) i b) stężenie pirofosforanu geranylu zmienia się, przy czym w a) stosowano wyższe niż w b); stężenie pirofosforanu izopentenyly stałe (1,0  $\mu\text{M}$  w b) i 1,0  $\mu\text{M}$  w a); c) stężenie pirofosforanu izopentenyly zmienia się, stężenie pirofosforanu geranylu stałe (3  $\mu\text{M}$ )

farnezyly (P), drugim — pirofosforan nieorganiczny (Q) (por. ze schematem 1 wg (52)).

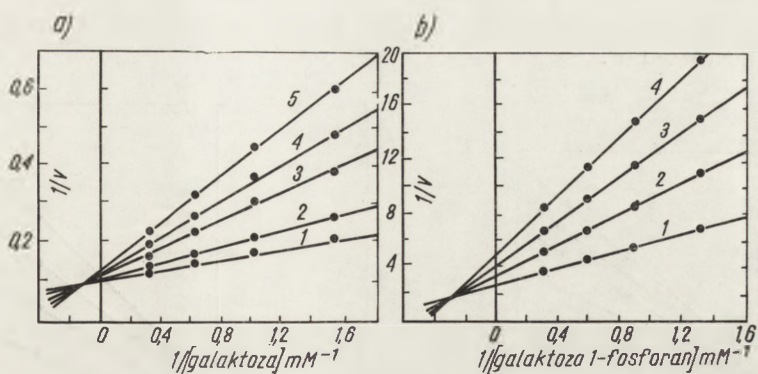
**Galaktokinaza EC.2.7.1.6.** Cardini i Leloir (8) oraz Kalckar (34) stwierdzili, że enzym ten otrzymany w stanie znacznie oczyszczonym z *Escherichia coli* (46), drożdży (28) i wątroby świni (3) katalizuje reakcję przedstawioną na schemacie 4.



**Schemat 4.** Reakcja katalizowana przez galaktokinazę (EC. 2.7.1.6.).

Mechanizm dla reakcji katalizowanej przez galaktokinazę z *E. coli* zaproponowali Gulbinsky i Cleland (24). Zastosowali oni technikę badania modeli szybkości początkowych, hamowanie produktami a ponadto badali wymianę izotopową w równowadze.

Wyniki badań modeli szybkości początkowych uzyskane przez Gulbinsky'ego i Clelanda (24) przedstawiono na rysunkach 5 a, b.



Rys. 5a, b. Modele szybkości początkowych reakcji katalizowanej przez galaktokinazę z *E. coli* (wg 24).

a) stężenie galaktozy zmienia się, stężenie Mg-ATP: (1) 0.884, (2) 0.590, (3) 0.295, (4) 0.205, (5) 0.154 mM.

b) stężenie galaktozo-1-fosforanu zmienia się, stężenie Mg-ADP: (1) 0.502, (2) 0.250, (3) 0.166, (4) 0.125 mM. Szybkości początkowe są wyrażone w:  $\mu\text{M}$  galaktozo-1-fosforanu na minutę (a) i  $\mu\text{M}$  ATP na minutę (b).

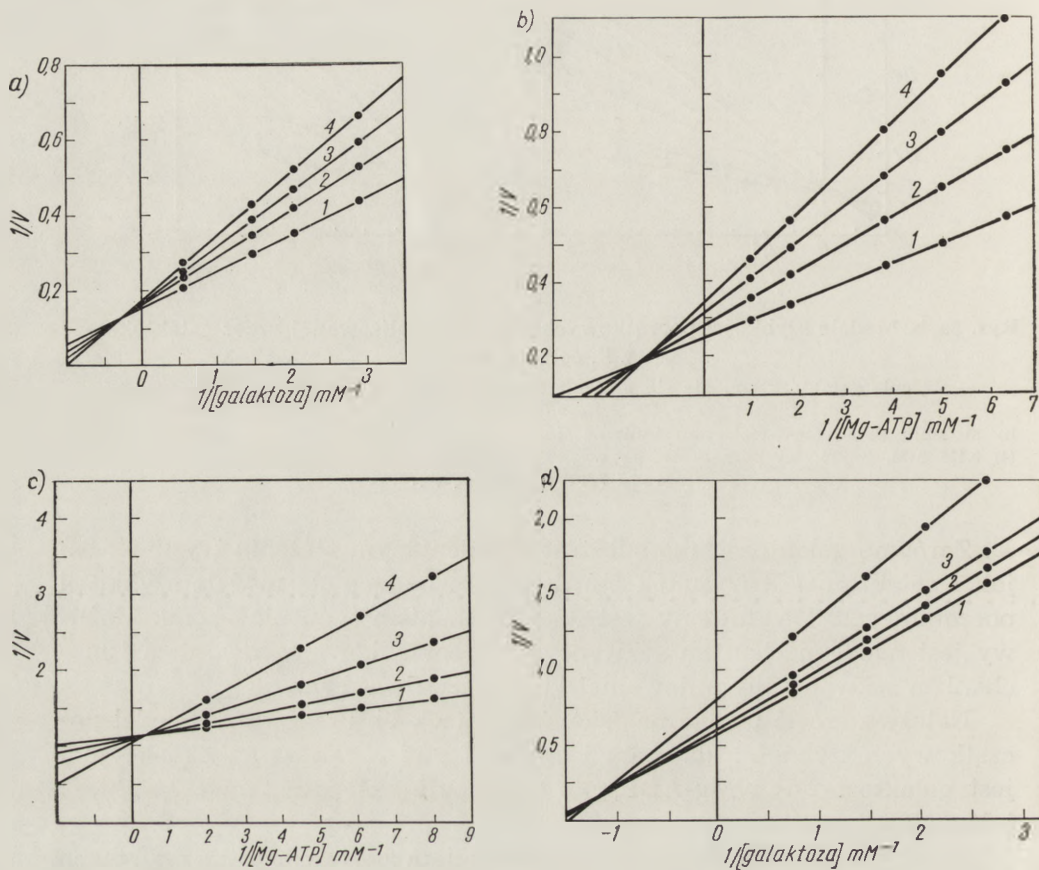
Zarówno galaktoza jako substrat o zmienianym stężeniu (rysunek 5a) jak i galaktozo-1-P (rysunek 5b) dają przecinające się modele szybkości początkowych. Wykluczony jest więc mechanizm typu ping-pong. Możliwy jest nadal mechanizm sekwencyjny, uporządkowany, dwa-dwa i mechanizm sekwencyjny o dowolnej kolejności, dwa-dwa.

Należy zwrócić uwagę na fakt, że rysunek 5b przedstawia model początkowych szybkości dla reakcji „wstecz” gdy w mieszaninie reakcyjnej jest galaktozo-1-P i Mg-ADP, nie występuje zaś początkowo galaktoza i Mg-ATP.

Wyniki badania hamowania produktami przedstawiono na rysunkach 6 a, b, c, d.

Galaktozo-1-P jest prawdopodobnie kompetycyjnym inhibitorem w stosunku do galaktozy jako substratu, którego stężenie zmienia się (rysunek 6a) i niekompetycyjnym inhibitorem w stosunku do Mg-ATP (rysunek 6b). Mg-ADP jest kompetycyjnym inhibitorem w stosunku do Mg-ATP (rysunek 6c) i niekompetycyjnym inhibitorem w stosunku do galaktozy (rysunek 6d). Z tablicy 2 wynika, że dla mechanizmu sekwencyjnego, uporządkowanego, dwa-dwa występuje tylko jedno hamowanie kompetycyjne, pomiędzy pierwszym przyłączającym się do enzymu substratem i drugim odłączającym się od enzymu produktem. Te dane w połączeniu z faktem, że stałe inhibitorowe ulegają zmianie wraz ze zmianą stężenia substratów wykluczyły mechanizm sekwencyjny uporządkowany dwa-dwa.

Jedynym niewyeliminowanym mechanizmem pozostaje więc mechanizm sekwencyjny o dowolnej kolejności dwa-dwa (por. ze schematem 6 wg (52)). Badanie wymiany izotopowej potwierdziło występowanie dwóch niedysocjujących kompleksów: enzym-galaktoza-Mg-ADP i enzym-Mg-ATP-galaktozo-1-P.



Rys. 6a, b, c, d. Hamowanie produktami reakcji katalizowanej przez galaktokinazę (EC. 2.7.1.6.) (wg 24).

- a) galaktozo-fosforan jako inhibitor w stężeniu (1) zero, (2) 0.394, (3) 0.910, (4) 1.51 mM. Stężenie glukozy zmienia się, stężenie Mg-ATP stałe (0.641 mM).  
 b) galaktozo-fosforan jako inhibitor, stężenie Mg-ATP zmienia się, stężenie galaktozy stałe;  
 c) Mg-ADP jako inhibitor, stężenie Mg-ATP zmienia się, stężenie glukozy stałe;  
 d) Mg-ADP jako inhibitor, stężenie galaktozy zmienia się, stężenie Mg-ATP stałe.  
 Szybkości początkowe wyrażone w:  $\mu\text{M}$  powstającego galaktozo-1-fosforanu/min.

#### IV. Przegląd reakcji enzymatycznych o znanym mechanizmie

Przystępując do przeglądu reakcji, których mechanizm został ustalony (choć z różnym stopniem pewności) należy zwrócić uwagę, że mechanizm niektórych reakcji enzymatycznych czasami badano kolejno w kilku pracowniach a uzyskanie nowych faktów doświadczalnych, często po-



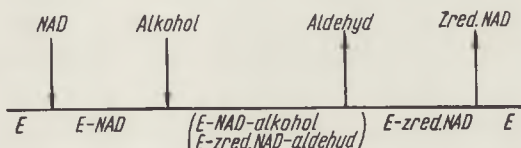
ciągało za sobą zmianę interpretacji. W takim przypadku przegląd ten przedstawia interpretację nowszą podając jednak odnośniki do prac wcześniejszych.

## 1. Mechanizmy sekwencyjne

### 1.1. Mechanizmy sekwencyjne uporządkowane

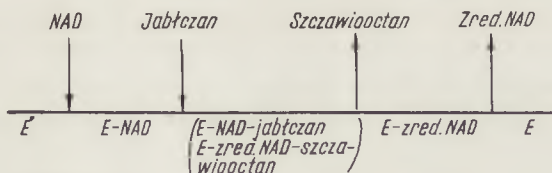
*Dehydrogenaza alkoholowa z wątroby konia* EC.1.1.1.1. katalizuje reakcję wg schematu 5.

Ponadto udowodniono istnienie niedysocjujących kompleksów: E-NAD-aldehyd i E-zred.NAD-alkohol (58, 59). Dokładne badania wykazały, że chociaż w pewnych warunkach stężeń następuje częściowa dysocjacja tych kompleksów co stwarza możliwość alternatywnych sekwencji reakcji, to jednak w warunkach fizjologicznych reakcja biegnie według mechanizmu uporządkowanego (48, 18, 19, 20).



**Schemat 5.** Mechanizm reakcji dehydrogenazy alkoholowej wg (58, 59 oraz 55, 18, 19, 20).

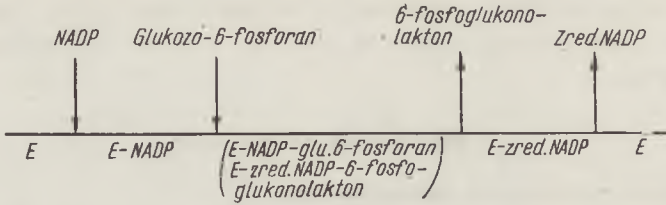
*Dehydrogenaza jabłczanowa, mitochondrialna* EC.1.1.1.37. działa jak pokazano na schemacie 6. Stosując metodę wymiany izotopowej w równowadze wykazano możliwość alternatywnej sekwencji reakcji przy pH 9 (49).



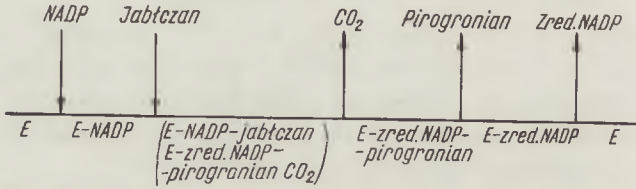
**Schemat 6.** Mechanizm reakcji dehydrogenazy jabłczanowej wg (41, 42, 43 oraz 27, 49).

Mechanizm działania dehydrogenazy jabłczanowej (dekarboksylującej) (NADP) z wątroby gołębia przedstawia schemat 7.

*Dehydrogenaza glukoza-6-fosforanowa z erytrocytów ludzkich*, EC.1.1.1.49 działa najprawdopodobniej według schematu 8. Jednak nie wykluczono całkowicie możliwości, że reakcja ta przebiega według mechanizmu sekwencyjnego o dowolnej kolejności przy czym tworzyłby się niedysocjujący kompleks E-glu-6-P-zred.NADP (50).

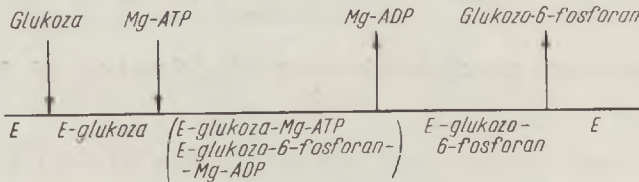


**Schemat 7.** Mechanizm reakcji dehydrogenazy jabliczanowej, dekarboksylującej (NADP) wg (33).



**Schemat 8.** Mechanizm reakcji dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej wg (50).

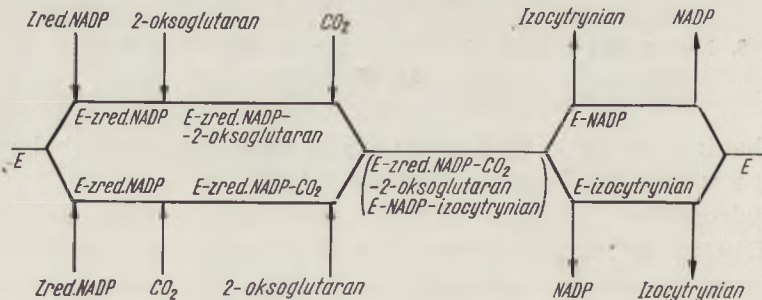
Mechanizm reakcji katalizowanej przez heksokinazę z drożdży EC.2.7.1.1. obrazuje schemat 9.



**Schemat 9.** Mechanizm reakcji heksokinazy wg (46, 23, 60 oraz 26 i 22).

**1.2. Mechanizmy sekwencyjne o dowolnej kolejności**

Dla dehydrogenazy izocytrynianowej (NADP) z cytoplazmy komórek ssaków, EC.1.1.1.42 postuluje się mechanizm sekwencyjny o dowolnej kolejności, zakładając, że funkcją tego enzymu jest reduktywna karboksylacja 2-okso-glutaranu do izocytrynianu, który przekształca się na-

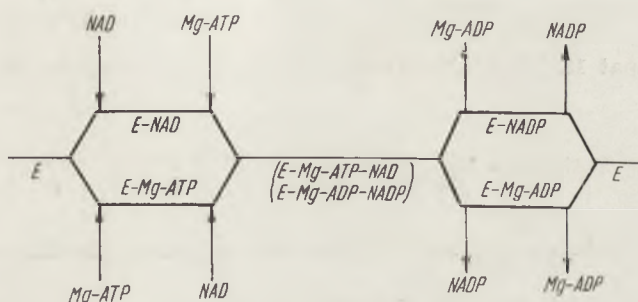


**Schemat 10.** Mechanizm reakcji dehydrogenazy izocytrynianowej (NADP) wg (15).

stępnie w cytrynian a ten służy jako prekursor kwasów tłuszczowych. Schemat 10 przedstawia dwie z sześciu możliwych kolejności przyłączenia substratów do powierzchni enzymu (15).

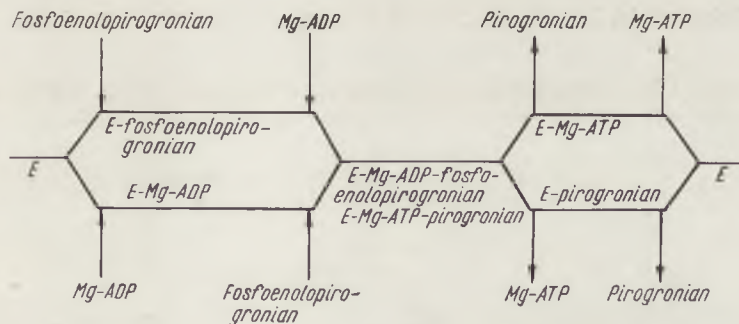
*Fosforybozylotransferaza hipoksantynowa* z erytrocytów ludzkich EC.2.4.2.8 działa również według mechanizmu sekwencyjnego. Wyniki badań *Hendersona* i *wsp.* (29) wykluczyły możliwość mechanizmu typu ping-pong. Kolejność przyłączenia substratów i odłączania produktów w tej reakcji nie została jeszcze ustalona.

*Kinaza NAD* z *wątroby gołębia*, EC.2.7.1.23 katalizuje reakcję według schematu 11. Substratem i produktem tej reakcji jest więc nie ATP i ADP ale kompleksy Mg-ATP i Mg-ADP (2).



**Schemat 11.** Mechanizm reakcji kinazy NAD wg (2).

Schemat 12 obrazuje działanie kinazy pirogronianowej, EC.2.7.1.40.

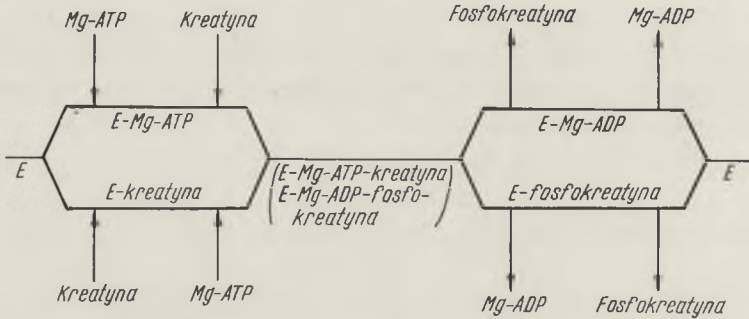


**Schemat 12.** Mechanizm reakcji kinazy pirogronianowej wg (37).

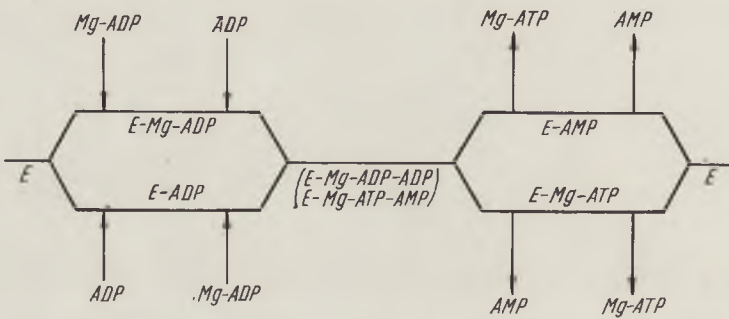
*Kinaza kreatynowa* z *mięśni królika*, EC.2.7.3.2. działa według schematu 13. Oprócz  $Mg^{2+}$  rolę czynnika kompleksującego mogą spełniać jony  $Ca^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  (39).

*Kinaza adenylanowa* z *drożdży i mięśni królika*, EC.2.7.4.3. katalizuje reakcję według schematu 14. AMP i ADP mogą tworzyć niedysocjujące

kompleksy (45). Kinaza adenylanowa z mięśni królika ma dwa miejsca wiążące: jedno dla nukleotydów chelatowanych  $Mg^{2+}$ , drugie dla nukleotydów niechelatowanych (45).

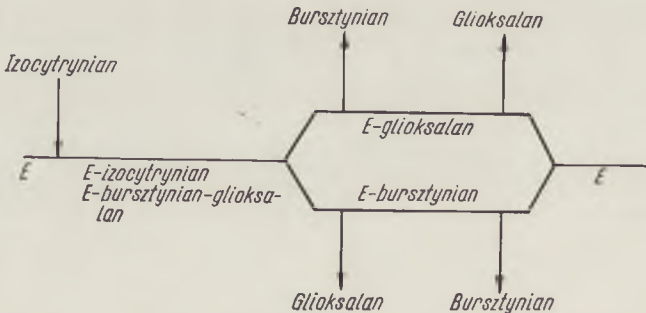


**Schemat 13.** Mechanizm reakcji kinazy kreatynowej wg (38, 39).



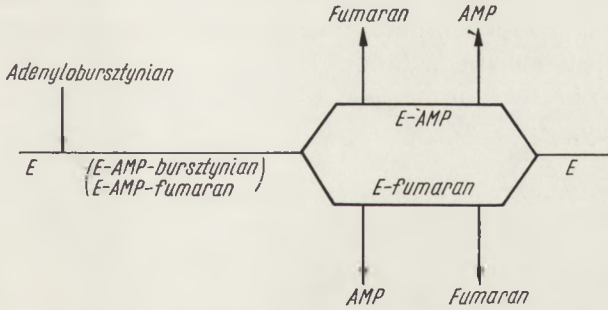
**Schemat 14.** Mechanizm reakcji kinazy adenylanowej wg (45, 51).

Schemat 15 przedstawia mechanizm działania *liazy cytrynianowej* EC.4.1.3.1.



**Schemat 15.** Mechanizm reakcji liazy izocytrynianowej wg (21).

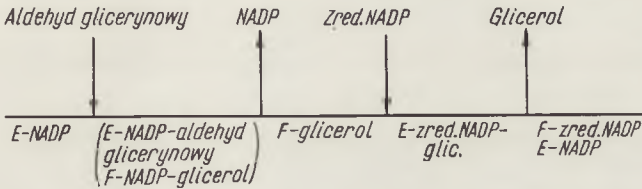
*Liaza adenilo-bursztynianowa* EC.4.3.2.2. katalizuje reakcję według schematu 16.



**Schemat 16.** Mechanizm reakcji liazy adenylobursztynianowej wg (6).

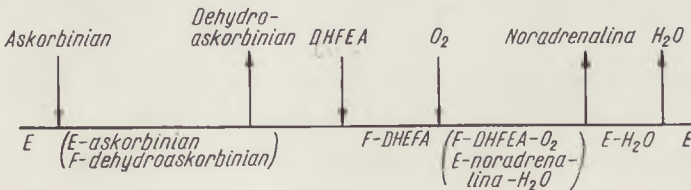
## 2. Mechanizmy typu ping-pong

Dehydrogenaza glicerolowa (NADP) EC.1.1.1. z mięśni szczura katalizuje reakcję według mechanizmu typu izo-ping-pong, dwa-dwa (schemat 17), w którym następuje izomeryzacja stabilnej formy enzymu (54).



**Schemat 17.** Mechanizm reakcji dehydrogenazy glicerolowej (NADP) wg (54).

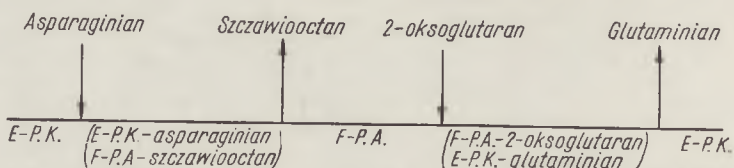
Hydroksylaza DOPA-aminy, EC.1.14.2.1 działa także według mechanizmu ping-pong. Dotychczas nie została jednak ustalona względna kolejność przyłączania do enzymu 3,4-dwuhydroksyfenyloetyloaminy (D.H.F.E.A.) i  $O_2$  oraz względna kolejność uwalniania z powierzchni enzymu noradrenaliny i  $H_2O$ . Na schemacie 18 kolejność zaproponowana dla tych związków jest hipotetyczna, natomiast wszystkie inne zależności zostały udowodnione doświadczalnie (25).



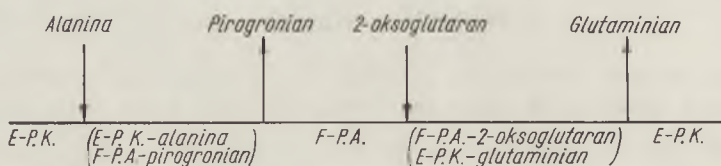
**Schemat 18.** Mechanizm reakcji hydroksylazy DOPA-aminy wg (25) (DHFEA, 3,4-dwuhydroksyfenyloetyloamina).

Aminotransferaza asparagininowa z serca świni EC.2.6.1.1. (schemat 19) i aminotransferaza alaniny, EC.2.6.1.2 (schemat 20) działają również

według mechanizmu ping-pong. W obu tych reakcjach koenzym nie odysocjowuje od powierzchni enzymu. Transaminacja powoduje przekształcenie kompleksu enzym-fosforan pirydoksalu (E-P.K.) w kompleks enzym-fosforan pirydoksaminy (E-P.A.), a reakcja z ketokwasem przywraca stan wyjściowy.



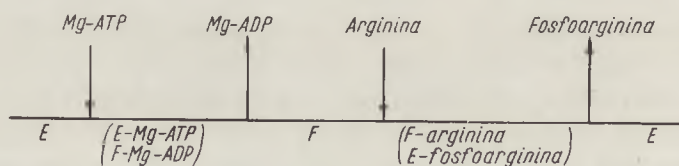
**Schemat 19.** Mechanizm reakcji aminotransferazy asparaginianowej wg (30).



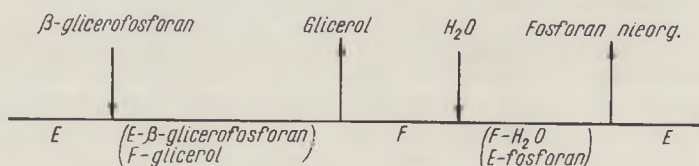
**Schemat 20.** Mechanizm reakcji aminotransferazy alaninowej wg (7).

Reakcja katalizowana przez aminotransferazę tyrozynową z wątroby szczura, EC.2.6.1.5 różni się tym od reakcji innych aminotransferaz, że koenzym może całkowicie odysocjować od enzymu (35, 36).

Do enzymów działających według mechanizmu ping-pong należą też kinaza argininowa z langusty, EC.2.7.3.3 (schemat 21) i fosfatasa kwaśna z ziemniaków, EC.3.1.3.2 (schemat 22).



**Schemat 21.** Mechanizm reakcji kinazy argininowej wg (55).



**Schemat 22.** Mechanizm reakcji fosfatasy kwaśnej wg (32).

## V. Zakończenie

Warto zwrócić jeszcze uwagę na kilka bardzo istotnych zagadnień, które w całej masie podanych w tym i poprzednim (52) artykule teorii, faktów, sposobów interpretacji mogły pozostać niezauważone.

Metody badania mechanizmów reakcji enzymatycznych są stosowane *in vitro*. W takich badaniach używa się krystalicznych enzymów lub oczyszczonych w znacznym stopniu preparatów enzymatycznych. Niektóre stosowane przy pomiarach szybkości początkowych reakcji stężenia substratów czy produktów są нефизjologiczne. Nie można w sposób jednoznaczny odpowiedzieć na pytanie w jakim stopniu to co zostało ustalone *in vitro* jest prawdziwe *in vivo*. Prawdopodobnie pewne alternatywne sekwencje reakcji typowe dla mechanizmów o dowolnej kolejności przyłączania substratów i odłączania produktów nie zachodzą w nieuszkodzonej komórce.

Opisane metody badania mechanizmów reakcji stosowano, gdy enzym, substraty i produkty można było rozpuścić w odpowiednich buforach. Ograniczało to możliwość badań niemal wyłącznie do tak zwanych enzymów rozpuszczalnych lub do enzymów, które można uwolnić ze struktur komórkowych zachowując ich aktywność. Mechanizmy reakcji katalizowanych przez enzymy trwale wbudowane w struktury pozostają w dalszym ciągu prawie całkowicie nieznanne.

Omawiając techniki ustalania mechanizmów reakcji enzymatycznych nie wspomniano też, że do wyznaczania stałych Michaelisa, stałych inhibitorowych czy szybkości maksymalnych reakcji nie stosuje się tradycyjnych metod graficznych ponieważ są one subiektywne i mało dokładne. Analityczne metody wyznaczania stałych kinetycznych reakcji enzymatycznych używane obecnie opierają się na teorii błędów oraz matematycznych metodach interpolacji i aproksymacji danych doświadczalnych uzyskanych z pomiarów szybkości początkowych reakcji enzymatycznych przy różnych stężeniach substratów i produktów (13, 57). Opracowano szereg programów umożliwiających obliczenie potrzebnych stałych kinetycznych przy zastosowaniu maszyn matematycznych (12). Omówienie tych zagadnień wykracza jednak poza ramy tego artykułu.

#### LITERATURA

1. Alberty R. A., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1777 (1958).
2. Apps D. K., *Eur. J. Biochem.* **5**, 444 (1968).
3. Ballard F. J., *Biochem. J.* **98**, 347 (1966).
4. Boyer P. D., *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 387 (1959).
5. Boyer P. D., Silverstein E., *Acta Chem. Scand.* **17**, Suppl. 1, 195 (1963).
6. Bridger W. A., Cohen L. H., *J. Biol. Chem.* **243**, 644 (1968).
7. Bulos B., Handler P., *J. Biol. Chem.* **240**, 3283 (1965).
8. Cardini C. E., Leloir L. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **45**, 55 (1953).
9. Cleland W. W., *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 104 (1963).
10. Cleland W. W., *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 173 (1963).
11. Cleland W. W., *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 188 (1963).
12. Cleland W. W., *Nature* **198**, 463 (1963).
13. Cleland W. W., *Advan. Enzymol.* **29**, 1 (1967).
14. Cleland W. W., *Ann. Rev. Biochem.* **36**, 85 (1967).
15. Cleland W. W., Thompson V. W., *Federation Proc.* **24**, 288 (1965).

16. Cornforth J. W., Cornforth R. H., Donniger C., Popjak G., *Proc. Roy. Soc. B*, **163**, 492 (1966).
17. Cornforth J. W., Cornforth R. H., Popjak G., Yongoyan I., *J. Biol. Chem.* **241**, 3970 (1966).
18. Dalziel K., Dickinson F. M., *Nature* **206**, 255 (1965).
19. Dalziel K., Dickinson F. M., *Biochem. J.* **100**, 34 (1966).
20. Dalziel K., Dickinson F. M., *Biochem. J.* **100**, 49 (1966).
21. Daron H. H., Rutter W. J., Gonsalus J. G., *Biochemistry* **5**, 896 (1966).
22. Fromm H. J., Leve V., *J. Biol. Chem.* **237**, 3027 (1962).
23. Fromm H. J., Silverstein E., Boyer P. D., *J. Biol. Chem.* **239**, 3645 (1964).
24. Gulbinsky J. S., Cleland W. W., *Biochemistry* **7**, 566 (1968).
25. Goldstein H., Joh T. H., Garvey T. Q., *Biochemistry* **7**, 2724 (1968).
26. Hammes G. G., Kochavi D., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 2069, 2073 (1962).
27. Harada K., Wolfe R. G., *J. Biol. Chem.* **243**, 4131 (1968).
28. Heinrick M. R., *J. Biol. Chem.* **239**, 50 (1964).
29. Henderson J. F., Brox L. W., Kelley W. N., Rosenbloom F. M., Seegmiller J. E., *J. Biol. Chem.* **243**, 2514 (1968).
30. Henson G. P., Cleland W. W., *Biochemistry* **3**, 338 (1964).
31. Holloway P. W., Popjak G., *Biochem. J.* **104**, 57 (1967).
32. Hsu R. Y., Cleland W. W., Anderson L., *Biochemistry* **5**, 799 (1966).
33. Hsu R. Y., Lardy H. A., Cleland W. W., *J. Biol. Chem.* **242**, 5315 (1967).
34. Kalckar H. M., *Advan. Enzymol.* **20**, 11 (1958).
35. Litwack G., Cleland W. W., Proc. Intern. Symp. on Piridoxal Enzymes, Nagoya 1967.
36. Litwack G., Cleland W. W., *Biochemistry* **7**, 2072 (1968).
37. Mildvan A. S., Cohn M. J., *J. Biol. Chem.* **241**, 1178 (1966).
38. Morrison J. F., Cleland W. W., *J. Biol. Chem.* **241**, 673 (1966).
39. Morrison J. F., White A., *Eur. J. Biochem.* **3**, 148 (1967).
40. Noat G., Richard J., Borel M., Got G., *Eur. J. Biochem.* **5**, 55 (1968).
41. Raval D. N., Wolfe R. G., *Biochemistry* **1**, 112 (1962).
42. Raval D. N., Wolfe R. G., *Biochemistry* **1**, 263 (1962).
43. Raval D. N., Wolfe R. G., *Biochemistry* **1**, 1112, 1118 (1962).
44. Ray W. J. Jr., Roscelli G. A., *J. Biol. Chem.* **241**, 3499 (1966).
45. Rhoads D. G., Lowenstein J. M., *J. Biol. Chem.* **243**, 3963 (1968).
46. Sherman J. R., Adler J., *J. Biol. Chem.* **238**, 873 (1963).
47. Sikorska E. A., *Post. Biochem.* **9**, 393 (1963).
48. Silverstein E., Boyer P. D., *J. Biol. Chem.* **239**, 3908 (1964).
49. Silverstein E., Sulebele G. A., Abstr. Am. Chem. Soc. 152-nd Meeting, New York, 124 (1966).
50. Soldin S. J., Balinsky D., *Biochemistry* **7**, 1077 (1968).
51. Su S., Russell P. J. Jr., *J. Biol. Chem.* **243**, 3826 (1968).
52. Śliwowski J., *Post. Biochem.* **15**, 447 (1969).
53. Theorell H., Chance B., *Acta Chem. Scand.* **5**, 1127 (1951).
54. Toews C. J., *Biochem. J.* **105**, 1067 (1967).
55. Uhr M. L., Marcus F., Morrison J. F., *J. Biol. Chem.* **241**, 5425 (1966).
56. Webb J. L., Enzyme and Metabolic Inhibitors, Academic Press, New York, Londyn 1963, tom 1, str. 111.
57. Wilkinson G. N., *Biochem. J.* **80**, 324 (1961).
58. Wratten C. C., Cleland W. W., *Biochemistry* **2**, 935 (1963).
59. Wratten C. C., Cleland W. W., *Biochemistry* **4**, 2442 (1965).
60. Zeve V., Fromm H. J., Fabius R., *J. Biol. Chem.* **239**, 1625 (1964).



KRZYSZTOF SZYMBORSKI \*

## O możliwości występowania oddziaływań donorowo-akceptorowych w układach biologicznych

### On the Possibility of Donor-Acceptor Interactions in Biological Systems

The theory of donor-acceptor complexes has been outlined and experimental data indicative of such interactions in biological systems have been critically reviewed.

Wszystkie cząsteczki chemiczne znajdujące się w niewielkiej wzajemnej odległości oddziałują na siebie za pośrednictwem sił o różnym charakterze. Do oddziaływań tych należy przyciąganie lub odpychanie wypadkowych ładunków elektrycznych, trwałych lub indukowanych dipoli, a także oddziaływanie dyspersyjne. Wszystkie wymienione przypadki stanowią oddziaływania niespecyficzne i występują — w mniejszym lub większym stopniu — pomiędzy parami dowolnych cząsteczek. Oddziaływania typu donorowo-akceptorowego, którym poświęcony jest ten artykuł, należą do oddziaływań o dużym stopniu specyficzności. Obecność ich wiązano zwykle z istnieniem tak zwanych kompleksów z przeniesieniem ładunku (ang. *charge-transfer complexes*, w skrócie kompleksy *c-t*) posiadających charakterystyczne własności optyczne. Oddziaływania te nie zawsze jednak prowadzą do tworzenia się kompleksów i właściwa ich definicja jest szersza, a jednocześnie bardziej ścisła. Zostanie ona podana w części dotyczącej teorii.

Choć znaczenie biologiczne oddziaływań donorowo-akceptorowych nie zostało w pełni wyjaśnione, ich interesujący z wielu względów charakter, a także dotychczasowe wyniki doświadczalne pozwalają przypuszczać, że w wielu przypadkach mogą one spełniać w układach biologicznych pewne specyficzne funkcje. Nie występują one nigdy w stanie „czystym”, lecz zawsze obok innych oddziaływań, jednakże mogą niekiedy stanowić istotny — jakkolwiek niewielki — przyczynek do energii stabilizującej nie-

\* Mgr, Katedra Biofizyki, Uniwersytet Warszawski, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: OYE — „stary żółty ferment”, *c-t* — przeniesienie ładunku (ang. *charge transfer*), ERP — elektronowy rezonans paramagnetyczny.

które kompleksy międzycząsteczkowe. Rola ich w takim przypadku jest o tyle interesująca, że wielkość oddziaływań donorowo-akceptorowych zależy w znacznym stopniu od położenia składników kompleksu względem siebie. W kompleksach par cząsteczek o własnościach donatorów i akceptorów oddziaływania te powodować mogą całkowite przeniesienie elektronu z cząsteczki donatora na akceptor, na przykład w reakcjach oksydoredukcyjnych, między innymi w łańcuchu oddechowym. Oddziaływania donorowo-akceptorowe decydować mogą także o kierunku zachodzenia i kinetyce szeregu innych reakcji chemicznych. Zagadnieniu temu poświęcony jest artykuł E. K o s o w e r a (45). W skondensowanych układach barwników (w kryształach molekularnych) mogą one powodować pojawienie się pasm przewodnictwa (73). Oddziaływania stabilizujące kompleksy koordynacyjne jonów metali o charakterze amfoterycznym są także typu donorowo-akceptorowego, kompleksy te mają jednak specyficznie odmienny charakter opisywany odrębną teorią (26). W artykule tym nie będą one omawiane.

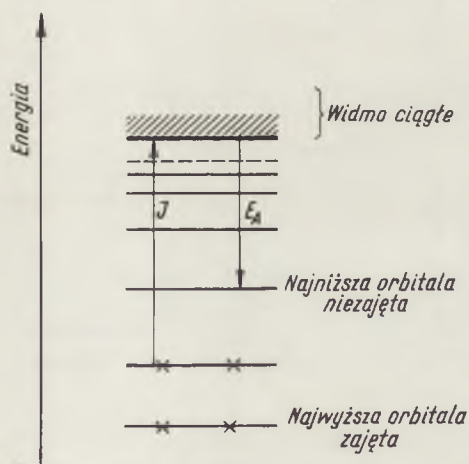
Zagadnieniu kompleksów z przeniesieniem ładunku poświęcono wiele badań, z których większość ma charakter podstawowy i dotyczy aspektów fizyko-chemicznych tych oddziaływań. Wyniki ich są interesujące dla biochemików ze względu na rolę, jaką oddziaływania donorowo-akceptorowe mogłyby odgrywać w układach biologicznych. Wyrazem tego zainteresowania, a jednocześnie czynnikiem pobudzającym je stała się między innymi wydana w roku 1960 książka Alberta Szent-Györgyi'ego „Wstęp do biologii submolekularnej” (90). Nie jest to książka w pełnym tego słowa znaczeniu naukowa. Autor jej spróbował wprowadzić pojęcie kompleksu *c-t* do rozważań nad ogólnymi, elektronowymi i energetycznymi aspektami procesu fotosyntezy i reakcji łańcucha oddechowego, a także zastanawiał się nad mechanizmem działania niektórych leków, doszukując się jego związku z własnościami donorowymi tych substancji. Książka Szent-Györgyi'ego zawierała wiele śmiałych sugestii i hipotez, z których większość stała się dziś nieaktualna w wyniku postępu badań. W ostatnich latach zagadnienie roli biologicznej oddziaływań donorowo-akceptorowych doczekało się kilku opracowań przeglądowych (6, 11, 12, 41, 45, 70, 76).

## I. Teoria

Najbardziej charakterystyczną właściwością kompleksów donorowo-akceptorowych, której wielu badaczy przypisuje znaczenie definicji, jest występowanie w ich widmie absorpcyjnym, w ultrafiolecie lub w widzialnym obszarze, tak zwanego pasma „*charge transfer*” (*c-t*), którego położenie zależy w określony sposób od własności donorowych i akceptorowych obu składników kompleksu. Pasma takie w widmie roztworu jodu w benzenie zaobserwowali w roku 1949 Benesi i Hildebrand (9).

Teorię wyjaśniającą powstawanie i charakter kompleksów donorowo-akceptorowych zawdzięczamy laureatowi nagrody Nobla, chemikowi amerykańskiemu R. S. Mullikenowi (66, 67, 68, 69). Przedstawienie jego teorii posługującej się pojęciami chemii kwantowej wymaga wprowadzenia definicji kilku podstawowych pojęć opisujących własności elektronowe cząsteczek chemicznych, między innymi pojęcie donatora i akceptora elektronów.

Jak wiadomo, elektrony w cząsteczce, podobnie jak w atomie, znajdować się mogą jedynie w stanach o pewnej określonej energii, które nazywamy poziomami energetycznymi. Energię elektronów znajdujących się w tych dyskretnych stanach uważa się za ujemną, co oznacza, że są one „związane” z cząsteczką i mogą zajmować w jej obrębie jedynie określone obszary. Obszary takie zwane są orbitalami molekularnymi. Poziomów dyskretnych odpowiadających rozmaitym orbitalom jest w cząsteczce więcej niż elektronów, toteż w stanie podstawowym zajęta jest tylko część z nich do pewnego określonego poziomu odpowiadającego najwyższej zajętej orbitali molekularnej. Powyżej tego poziomu wszystkie orbitale są wolne. Omawiane będą tylko dwa poziomy: najniższy niezapełniony (najniższa niezajęta orbitala molekularna) oraz ten, na którym energia elektronu jest dostateczna dla oderwania go od cząsteczki (jest równa zero). Odległość energetyczna tego poziomu od najwyższej zapełnionej w stanie podstawowym orbitali odpowiada energii jonizacji.

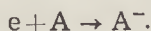


Schemat 1. Poziomy energetyczne elektronów w cząsteczce  
 $J$  — energia jonizacji,  $E_A$  — powinowactwo elektronowe

Układ poziomów energetycznych cząsteczki przedstawiono na schemacie 1. Dostarczenie energii jonizacji  $J$  elektronowi zajmującemu najwyższą zajęta orbitalę prowadzi do reakcji:

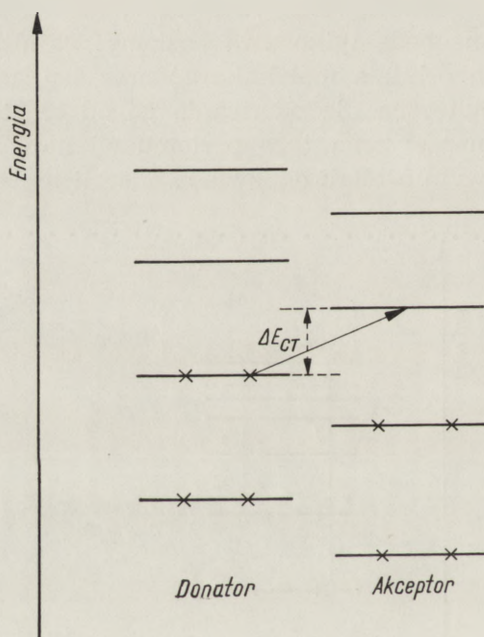


Wielkość  $E_A$  zwana powinowactwem elektronowym stanowi energetyczny bilans reakcji przyłączenia elektronu do cząsteczki A:



Im większe jest  $E_A$ , tym łatwiej cząsteczka przyłącza dodatkowy elektron czyli jest tym lepszym akceptorem. Czym mniejsza jest energia jonizacji J, tym lepszym donatorem jest cząsteczka.

Jak wynika ze schematu 1 różnica  $J - E_A$  stanowi najmniejszą energię przejścia elektronowego, któremu odpowiada w absorpcyjnym widmie elektronowym cząsteczki pasmo położone w zakresie najdłuższych fal. Przejście takie wyobrazić sobie można jako składające się z dwu procesów: najpierw elektron usuwany jest z najwyższego zajętego poziomu poza cząsteczkę, a następnie opada na najniższy poziom niezapełniony. Wyobraźmy sobie, że w bliskim sąsiedztwie cząsteczki będącej dobrym donatorem (mała wartość J) znajduje się cząsteczka, która jest dobrym akceptorem (duże  $E_A$ ). Sytuację taką przedstawia schemat 2.



**Schemat 2.** Stosunki energetyczne w cząsteczkach donatora i akceptora podczas wzbudzenia elektronowego z przeniesieniem ładunku (przejście „charge transfer”).  $\Delta E_{CT}$  — przybliżona energia przejścia, w której nie uwzględniono wpływu rezonansu struktur.

Jeśli zezwalają na to warunki przestrzenne (gdy sprzężenie orbitali donatora i akceptora jest dostatecznie duże) elektron usunięty z cząsteczki D może opaść na najniższy niezajęty poziom w cząsteczce A, gdyż jest to korzystniejsze energetycznie:  $E_A(A) > E_A(D)$ . W wyniku takiego przejścia para obojętnych cząsteczek zamienia się w parę jonów.

W odniesieniu do kompleksów z przeniesieniem elektronu obraz taki jest zbyt uproszczony, stanowi on jednak pewien przypadek graniczny i może ułatwić zrozumienie teorii Mullikena. W teorii tej wprowadzono pojęcie kwantowo-mechanicznego rezonansu struktur elektronowych. Tak zwana struktura niewiążąca, opisywana funkcją falową  $\psi(DA)$ , w której obie cząsteczki są elektrycznie obojętne i oddziałują na siebie wyłącznie za pośrednictwem sił Van der Waalsa oraz struktura jonowa opisywana funkcją falową  $\psi(D^+A^-)$ , odpowiadająca parze jonów stanowią struktury skrajne. Rzeczywisty stan podstawowy układu  $D:A$  daje się opisać jako mieszanina tych dwu struktur, co oznacza, że w stanie podstawowym elektron z donatora jest jakgdyby częściowo przeniesiony na cząsteczkę akceptora. Funkcja falowa tego stanu jest kombinacją liniową dwu funkcji odpowiadających strukturom skrajnym:

$$\psi_N = a \psi(DA) + b \psi(D^+A^-) \quad a^2 > b^2 \quad 1$$

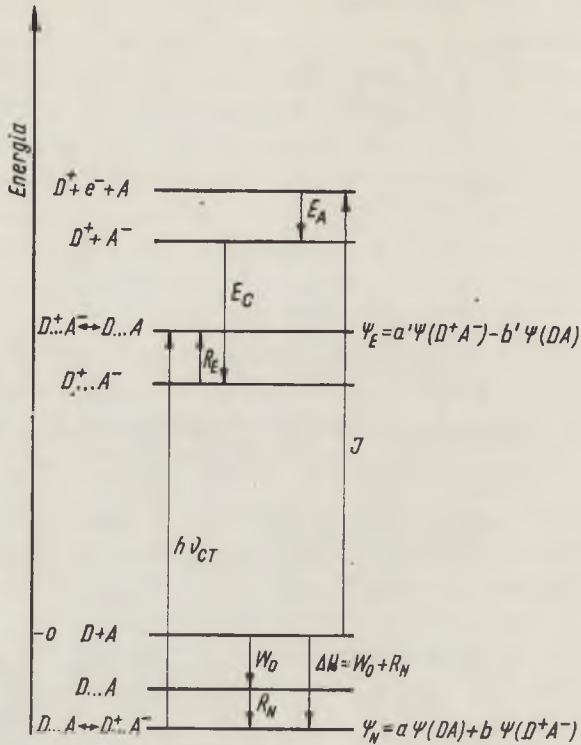
Wówczas w widmie kompleksu poza zwykłymi przejściami „lokalnymi” czyli wewnątrzcząsteczkowymi pojawia się pasmo odpowiadające przejściu z przeniesieniem ładunku (przejście  $c-t$ ). Przy przejściu tym jeśli elektron, który w stanie podstawowym znajduje się głównie w cząsteczce donatora, a tylko w niewielkim stopniu w cząsteczce akceptora (stan opisany równaniem 1), przechodzi do stanu wzbudzonego, spełniającego odwrotny warunek, to prawdopodobieństwo jego znalezienia na akceptorze jest znacznie większe niż na donatorze. Stan ten jest także mieszaniną rezonansową dwu stanów skrajnych i opisuje go funkcja falowa 2)

$$\psi_E = a' \psi(D^+A^-) - b' \psi(DA) \quad (a')^2 > (b')^2 \quad 2$$

Stosunki energetyczne dla przejścia absorpcyjnego związanego z przeniesieniem ładunku ilustruje schemat 3.

Należy podkreślić, że pochodzący z rezonansu struktur przyczynek  $R_N$  do energii stabilizującej stan podstawowy jest stosunkowo niewielki i nie przekracza kilku procent całkowitej energii stabilizacji stanu podstawowego,  $\Delta H$ . Warunkiem powstania kompleksu jest zatem występowanie również innych oddziaływań wiążących cząsteczki. Są to, ogólnie rzecz biorąc, rozmaite oddziaływania typu Van der Waalsa lub wiązania wodorowe. (Możliwy jest także przypadek, w którym stała równowagi w stanie podstawowym jest równa zeru lecz w wyniku przypadkowych zderzeń swobodnych cząsteczek następuje przejście z przeniesieniem ładunku. W przypadkach takich mówimy o kompleksach zderzeniowych).

Metodę doświadczalnego wyznaczenia współczynnika ekstynkcji dla przejścia  $c-t$  i stałej równowagi kompleksu podali Benesi i Hildebrand (9). Równanie przez nich wyprowadzone jest słuszne dla kompleksów, których składniki występują w stosunku 1:1 i przy szeregu dodatkowych warunków nie zawsze łatwych do spełnienia. Jeśli stężenie jednego ze składników kompleksu jest znacznie większe od stężenia dru-



**Schemat 3.** Stosunki energetyczne w kompleksie donorowo-akceptorowym (wg 11a).

- $\Delta H$  — całkowita energia stabilizacji stanu podstawowego kompleksu;  
 $W_0$  — składowa tej energii pochodząca od oddziaływań typu Van der Waalsa;  
 $R_N$  — energia pochodząca z rezonansu struktury jonowej i niewiążącej;  
 $J$  — energia jonizacji donatora;  
 $h\nu_{CT}$  — energia przejścia z przeniesieniem ładunku;  
 $E_A$  — powinowactwo elektronowe akceptora;  
 $E_C$  — energia oddziaływania kulombowskiego jonów  $D^+$  i  $A^-$ ;  
 $R_E$  — energia pochodząca od rezonansu struktur w stanie wzbudzonym.

giego, tak, że jego zmiana w wyniku kompleksowania może być zaniedbana, wówczas pomiar absorpcji pasma c-t dla serii układów o różnych proporcjach stężeń donatora i akceptora umożliwi jednocześnie wyznaczenie współczynnika ekstynkcji molowej i stałej równowagi kompleksu na podstawie związku:

$$\frac{[A]l}{A} = \frac{1}{[D]K\varepsilon} + \frac{1}{\varepsilon} \quad 3$$

gdzie  $[A]$  — stężenie akceptora

$[D]$  — stężenie donatora

1 — długość drogi optycznej

$A$  — absorpcja w maksimum pasma c-t

$K$  — stała równowagi kompleksu

$\varepsilon$  — współczynnik ekstynkcji molowej pasma c-t

W ostatnich latach teoria dotycząca tego zagadnienia została znacznie udoskonalona, nowe równania na stałą równowagi są znacznie ściślejsze i uwzględniają również wpływ rozpuszczalnika (15, 18). Brak miejsca nie pozwala na przedstawienie tu szczegółów teorii i rozpatrywanie przypadków szczególnych.

Metoda spektrofotometryczna jest jedną z wielu fizycznych metod badania kompleksów donorowo-akceptorowych, gdyż powstawanie ich powoduje charakterystyczne zmiany wielu własności układu. Inną metodą jest badanie widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ERP). Metoda ta pozwala na wykrywanie wolnych rodników czyli cząsteczek posiadających „niesparowane” elektrony. W rozpatrywanych układach sygnał ERP pojawia się gdy nastąpi całkowite przeniesienie elektronu z cząsteczki donatora na akceptor, w wyniku czego kompleks rozpada się na dwa jony—rodniki. Przy spełnieniu pewnych warunków energetycznych przejście takie może być indukowane termicznie. Należy je odróżniać od częściowego przeniesienia ładunku prowadzącego do powstania kompleksu donorowo-akceptorowego, które nie wywołuje pojawienia się sygnału ERP.

## II. Klasyfikacja donatorów i akceptorów oraz typy kompleksów

Donatory i akceptory, a także utworzone przez nie kompleksy sklasyfikować można według typów orbitali molekularnej donatora, z której pochodzi „przenoszony” elektron (najwyższej zajętej orbitali) oraz orbitali akceptora, na którą przenosi się ten elektron w wyniku przejścia *c-t*. Dwa najważniejsze typy organicznych donatorów to donatory typu  $\pi$ , których typowym przykładem są węglowodory aromatyczne oraz donatory typu *n*, w których elektron biorący udział w procesie przeniesienia ładunku znajduje się na orbitali niewiążącej *n* na heteroatomie (głównie N i O). Do tej ostatniej grupy należą pewne związki heterocykliczne, aminy, alkohole a także organiczne związki siarki, jodu i inne. Najważniejsze akceptory organiczne są akceptorami typu  $\pi$ . Spośród podstawowych związków o znaczeniu biologicznym własnościami akceptorowymi wyróżniają się związki cykliczne o charakterze chinonów. Ich powinowactwo elektronowe rośnie w wyniku podstawienia pierścienia podstawnikami silnie elektroujemnymi (chlorowce,  $-\text{NO}_2$ ). Popularne akceptory nieorganiczne:  $\text{J}_2$ ,  $\text{Cl}_2$ , czy jony niektórych metali zaliczamy do akceptorów typu  $\sigma$ , co oznacza, że przyjmowany przez nie elektron zajmuje antywiązącą orbitalę molekularną  $\sigma^*$ . Najczęściej rozważanymi przez nas kompleksami są kompleksy typu  $\pi \rightarrow \pi^*$  i  $n \rightarrow \pi^*$ .

## III. Kompleksy donorowo-akceptorowe cząsteczek biologicznych

Po ukazaniu się książki A. Szent-Györgyi’ego (90) wielu biochemików i biofizyków przypuszczało, że powstawaniem kompleksów donorowo-

-akceptorowych można będzie wyjaśnić szereg zagadnień związanych z oddziaływaniami międzycząsteczkowymi w układach biologicznych (w szczególności mechanizmów oksydoredukcji) a także z biologiczną funkcją wielu związków wyróżniających się swymi własnościami donatorowymi, czy akceptorowymi. Z teorii wiemy, że cząsteczki organiczne zawierające atomy tlenu lub azotu z wolnymi parami elektronów powinny być dobrymi donatorami, zaś związki aromatyczne mogą, w zależności od rodzaju podstawników, być zarówno dobrymi donatorami, jak akceptorami. Oddziaływania donorowo-akceptorowe prawdopodobnie mogą odgrywać zasadniczą rolę w następujących układach biologicznych (76): (a) w kompleksach cząsteczek zawierających pierścieni indolowy z nukleotydami pirymidynowymi lub flawinowymi, (b) w koenzymach łańcucha oddechowego (87) oraz (c) w kompleksach puryn z flawinami, węglowodorami aromatycznymi, akrydynami i purynami. Szczególnymi własnościami akceptorowymi wyróżniają się cząsteczki z grupy chinonów (flawiny, koenzym Q) i ku nim skierowało się przede wszystkim zainteresowanie biologów (76).

Obszerny przegląd publikacji na temat kompleksów donorowoakceptorowych związków biologicznych zawierają prace Pullmanów (76) oraz artykuł F. J. Bullocka (12). Ten ostatni podaje listę 160 substancji, które zostały zbadane jako potencjalne składniki tego typu kompleksów. Jest to zestaw najobszerniejszy z dostępnych, choć niekompletny, gdyż brak w nim takich związków jak lipidy, porfiryny, czy karotenoidy. Przytoczona przez Bullocka interpretacja wyników doświadczalnych wzbudza często wielkie zastrzeżenia. Nie zawsze bowiem obserwowane zmiany widma są wynikiem powstawania kompleksu donorowo-akceptorowego, nie mówiąc już o tym, jak trudno z wyników uzyskanych przy badaniu prostych układów modelowych wyciągnąć jakieś wnioski dotyczące biologicznej roli badanego związku. Obecny stan badań i poglądów o roli oddziaływań donorowo-akceptorowych w układach biologicznych można przedstawić omawiając kilka grup związków.

### 1. Flawiny

Budowa pierścienia izoalloksazynowego wskazuje na to, że w zależności od stopnia utlenienia pierścienia, flawiny mogą być zarówno dobrymi akceptorami jak i donatorami elektronów. Rola oddziaływań donorowo-akceptorowych w przypadku koenzymów flawinowych, FMN i FAD, może być trojaka: mogą one brać udział w wiązaniu enzymu z koenzymem, odgrywać jakąś rolę w oddziaływaniu enzymu i koenzymu z substratem, wreszcie, w przypadku FAD, oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe pomiędzy adeniną i pierścieniem izoalloksazynowym mogą warunkować konformację cząsteczki koenzymu. Przeważająca większość badań nad kompleksami koenzymów flawinowych miała na celu ustalenie roli od-



działowań donorowo-akceptorowych w wiązaniu enzymu z koenzymem (przegląd (87)). Według teorii wysuniętej przez Theorella i Nygarda (91) FMN połączony jest z białkową częścią „starego żółtego fermentu” (OYE) za pośrednictwem dwóch wiązań wodorowych. W wiązaniach tych miały brać udział  $N_3$  i  $C_4=O$  pierścienia izoalloksazynowego FMN, oraz grupy  $-OH$  tyrozyny enzymu. Wyniki badań przeprowadzonych na układach modelowych podważyły słuszność tej teorii. Harbury i Foley (30) używając jako modeli kompleksów różnych fenoli z ryboflawiną i z 3-metyloryboflawiną stwierdzili, że powstają one z łatwością po zablokowaniu azotu  $N_3$  przez grupę metylową, co uniemożliwiało utworzenie się jednego z wiązań wodorowych. Stabilizację tych kompleksów warunkują zatem inne oddziaływania a nie wiązania wodorowe. Ponieważ już wcześniej Mulliken wysunął przypuszczenie o dużej roli kompleksów z przeniesieniem ładunku w układach biologicznych, zaś Kosower (43, 48) publikując wyniki swych badań nad kompleksami soli pirydynowych sugerował, że pasmo absorpcyjne przy 360 nm w widmie dehydrogenazy triozofosforanowej jest pasmem *c-t*, Harbury i Foley uznali kompleks OYE : FMN za kompleks donorowoakceptorowy. Badając widmo absorpcyjne wykryli oni efekt hypochromowy (zmniejszenie współczynnika absorpcji) oraz niewielkie przesunięcie widma absorpcyjnego flawiny w kierunku czerwieni. Zmiany takie towarzyszą istotnie oddziaływaniom międzycząsteczkowym i powstawaniu asocjatów, ale o donorowo-akceptorowym charakterze oddziaływań świadczy jedynie pojawianie się pasma *c-t* odpowiadającego przeniesieniu ładunku.

Opublikowane przez małżeństwo Pullmanów w 1958 roku wyniki obliczeń teoretycznych (78, 79), opartych na modelu orbitali molekularnych, potwierdzały przypuszczenie, że utleniona forma ryboflawiny może być dobrym akceptorem elektronów. Dla wielu serii kompleksów flawin zaobserwowano istotnie korelację pomiędzy wartościami oszacowanych tym sposobem wielkości  $I_p - E_A$  a doświadczalnie wyznaczonymi energiami przejść z przeniesieniem ładunku. Dzięki temu przypuszczenie, że oddziaływania donorowo-akceptorowe mogą mieć w przypadku flawin istotne znaczenie biologiczne, zyskało pewne podstawy.

Aby przekonać się, czy zdolność akceptorowa ryboflawiny wzrasta w wyniku protonacji pierścienia izoalloksazynowego, Fleishman i Tollin (23, 24) badali oddziaływanie ryboflawiny, lumiflawiny i lumichromu, z szeregiem fenoli w środowisku silnie kwaśnym. W kilku przypadkach udało im się wyosobnić z roztworu barwne kompleksy. Pod wpływem większości fenoli następowało znaczne rozszerzenie pasma absorpcyjnego ryboflawiny, a po dodaniu 1,4-naftalendiolu pojawiło się nawet wyraźnie wyodrębnione nowe pasmo absorpcji, uwarunkowane według autorów wytworzeniem kompleksu *c-t*. Fenole podstawione grupami elektroujemnymi (chlorowce,  $-NO_2$ ), zmniejszającymi ich własności donorowe, nie dawały żadnych barwnych reakcji po zmieszaniu z roz-

tworem ryboflawiny. Fleishman i Tollin stwierdzili, że istotnie w silnie kwaśnych roztworach trwałość kompleksów maleje, lecz nie potrafili ustalić jej zależności od właściwości donorowych badanych związków. W badanych mieszaninach pojawia się sygnał ERP charakterystyczny dla semichinonu ryboflawiny, którego natężenie rośnie ze wzrostem kwasowości roztworu. Świadczyłoby to o tym, że chociaż w kwaśnym środowisku trwałość kompleksów zmniejsza się, jednak reakcja całkowitego przeniesienia elektronu zachodzi łatwiej, co jest, być może, związane z większą trwałością formy semichinowej ryboflawiny w tych warunkach. Z wyników Herbury'ego i Foley oraz Fleishmana i Tollina nie wynika, aby w warunkach fizjologicznych oddziaływanie donorowo-akceptorowe ryboflawiny z grupą -OH tyrozyny mogło wpływać stabilizująco na kompleks FMN:OYE. Wydaje się, że decydujące znaczenie w układach fenol-ryboflawina mają oddziaływania typu Van der Waalsa.

Oprócz tyrozyny kompleksy *c-t* z pierścieniem izoalloksazynowym ryboflawiny mogą tworzyć tryptofan i serotonina. W roku 1958 Isenberg i Szent-Györgyi (36) zauważyli powstawanie czerwonych kompleksów po zmieszaniu tych związków z FMN. Widmo różnicowe ujawniło obecność nowego pasma absorpcji z maksimum przy 503 nm, bliższego zatem pasma charakterystycznego dla semichinonu flawinowego w środowisku kwaśnym (500 nm). Powstanie tego pasma autorzy przypisali przejściu z przeniesieniem ładunku pomiędzy pierścieniem indolowym i ryboflawiną, co wzbudziło pewne wątpliwości (31). Nieco później ci sami badacze próbując znaleźć potwierdzenie swej tezy przeprowadzili badania widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ERP) (37, 38) kompleksów FMN z serotoniną i tryptofanem. W kwaśnych roztworach pojawiał się sygnał ERP charakterystyczny dla rodnika semichinonowego, jednakże w roztworach obojętnych nie było żadnego sygnału. Ponieważ później okazało się (23), że te słabe sygnały wykrywane w przypadku kwaśnych środowisk wywołane są działaniem światła, hipoteza Isenberga i Szent-Györgyi'ego o samorzutnym powstawaniu semichinonu ryboflawiny w wyniku przeniesienia ładunku nie znalazła właściwie potwierdzenia.

Pasmo absorpcji w okolicy 500 nm uznawano za pasmo *c-t* do chwili, kiedy Kosower (46) wykazał na podstawie porównania własności optycznych serii kompleksów FMN i indolu, że pasmo *c-t* kompleksu FMN:indol powinno leżeć w pobliżu 330 nm. W obszarze tym jest ono trudne do zaobserwowania ze względu na dużą absorpcję samej flawiny. Wydaje się, że maksimum absorpcyjne przy 500 nm obserwowane w widmie różnicowym FMN:tryptofan jest pozorne i pochodzi od rozszerzenia lub przesunięcia długofalowego pasma absorpcji ryboflawiny o maksimum przy 447 nm.

Ostatnia, interesująca hipoteza o możliwej roli oddziaływań z przeniesieniem ładunku w wiązaniu koenzymu flawinowego z enzymem przy-

pisuje rolę donatora anionowi tiolowemu  $-S^-$  cysteiny. Jej twórca, K o s o w e r (45) przypisywał czerwone zabarwienie związku pośredniego tworzącego się podczas redukcji dehydrogenazy kwasu liponowego powstawaniu kompleksu  $-S^- : FAD$ . Nie jest jednak jasne dlaczego taki kompleks miałby powstawać jedynie przejściowo w czasie redukcji enzymu, ani jaka jest rola utlenianego substratu.

Badanie charakteru oddziaływań enzym-koenzym-substrat w reakcjach biologicznych nastęrcza poważne trudności wynikające ze złożoności takiego układu. Rozbieżności interpretacyjne są tu jeszcze większe niż w przypadku prostych układów modelowych.

W roku 1956 B e i n e r t (8) zaobserwował w widmach flawoproteidów dwa pasma absorpcyjne (570 i 900 nm), które wiązał z tworzeniem się formy semichinonowej flawiny. Wykrył on także korelację pomiędzy danymi spektroskopowymi a występowaniem sygnału ERP (60). G i b s o n i w s p. (25) stwierdzili, że te dwa pasma absorpcyjne flawoproteidów zachowują się różnie i wysunęli przypuszczenie, że absorpcję przy 900 nm wywołuje kompleks donorowoakceptorowy między zredukowanym i utlenionym FMN (zred. FMN : FMN). Kompleks taki mógłby też, ich zdaniem, mieć postać dimeru semichinonowego  $(FMNH\cdot)_2$ . K o s o w e r (45) zastanawiając się nad słusznością takiej interpretacji zwraca jednakże uwagę na to, że niewiele wiadomo o kompleksach z FMN jako akceptorem oraz o widmie dimeru utworzonego z semichinonu ryboflawiny. Jego zdaniem jest bardzo wątpliwe, czy jest to istotnie pasmo *c-t*.

M a s s e y wraz z grupą współpracowników (46, 64) przebadał kompleksy wielu enzymów flawoproteidowych (między innymi dehydrogenazy amidu kwasu liponowego i oksydazy D-aminokwasowej), których koenzymem jest FAD. Niektóre pojawiające się w widmie maksima przypisał on przejściom z przeniesieniem ładunku. Na przykład pojawienie się pasma o maksimum przy 720 nm w czasie redukcji enzymu w układzie: dehydrogenaza amidu kwasu liponowego — zred. FAD —  $NAD^+$  (porównaj ze wspomnianą wyżej hipotezą Kosowera (45)) uznał za wynik powstawania kompleksu, w którym udział biorą dwa koenzymy. Badając proste układy mające stanowić modele oddziaływań pomiędzy sąsiednimi enzymami w łańcuchu oddechowym M a s s e y wykrył nowe pasma absorpcji w kompleksach, w których donatorem był zredukowany mononukleotyd flawinowy, zaś akceptorami *N*-metylo-3-nikotynamid (510 nm), *N*-metylo-4-nikotynamid (około 610 nm) oraz  $NAD^+$  (około 580 nm). Powstawanie zielono zabarwionego kompleksu zaobserwowano przy mieszaniu FMN ze zred. NAD przez zmielenie w stanie suchym (60). Jednocześnie pojawiał się sygnał ERP co wskazuje na to, że w wyniku przeniesienia elektronu tworzy się semichinon flawinowy. Przeniesienie ładunku zred.  $NAD \rightarrow FMN$  wydaje się energetycznie możliwe i być może nie udało się go wykryć w roztworze jedynie z powodu zbyt wielkiej reaktywności tego układu (81).

Przypuszczenie, że oddziaływania typu donorowo-akceptorowego pomiędzy adeniną a pierścieniem izoalloksazynowym w FAD decydować mogą o konformacji przestrzennej tego koenzymu znalazło stosunkowo najsłabsze potwierdzenie. Z prac Tsibrisa i wsp. (92) oraz Mantonie (61) wynika, że kompleksy ryboflawiny z adeniną, a także z innymi purynami i pirymidynami, stabilizowane są przez oddziaływanie typu Van der Waalsa — Londona i że rola oddziaływań donorowo-akceptorowych jest w nich mało istotna.

Mówiąc o badaniach nad rolą tych oddziaływań w chemii i biochemii flawin można wspomnieć jeszcze o próbie wyjaśnienia hamującego działania 1,1,3-trójcyjano-2-aminopropenu na fosforylację oksydacyjną (20). Przypuszczano (94), że związek ten może tworzyć kompleks *c-t* z ryboflawiną, wydaje się jednak nieprawdopodobne, aby związek tego typu mógł mieć własności donatora ze względu na elektroujemność grup cyjanowych.

## 2. Dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy

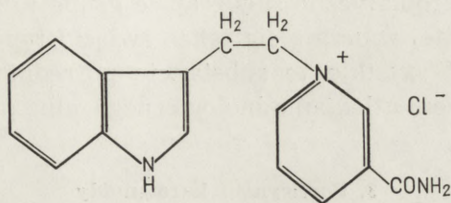
W dziedzinie badań własności akceptorowych pierścienia pirydynowego podstawowe znaczenie mają prace E. Kosowera. Od roku 1955 zajął się on badaniem (42, 43, 44, 47, 49, 50) kompleksów jonów 1-alkilopirydynowych z  $J^-$ . W ich widmach zidentyfikował on pasma absorpcyjne związane z przeniesieniem ładunku. Zależność położenia maksimów tych pasm od własności podstawnika w pierścieniu pirydynowym była tak charakterystyczna, że ich przesunięcia wywołane przez rozmaite podstawniki Kosower uznał za lepszą miarę powinowactwa elektronowego pierścienia niż mierzony metodą polaryzacyjną potencjał redukcyjny.

Wyniki badań Kosowera świadczące o wyraźnym akceptorowym charakterze pirydynowej części  $FAD^+$  stanowiły podstawę do poszukiwań modeli układu  $NAD^+$  — enzym, w których składniki byłyby związane w znacznej mierze za pomocą oddziaływań donorowo-akceptorowych.

Najprostsze tego typu modele badane przez Cilento i Giusti (16, 17) a także przez Alivasitosa i wsp. (2) stanowią układy, w których analogami  $NAD^+$  są pochodne amidu kwasu nikotynowego (1-fenylonikotynamid) donatorami zaś indol, tryptofan, serotonina i ich pochodne. W widmach tych układów wykryto szerokie pasma absorpcyjne od 300 do 420 nm, pozbawione wyraźnych maksimów. Cilento i Giusti uznali je za pasma *c-t* i na podstawie pomiarów spektroskopowych wyznaczyli stałe równowagi kompleksów, których wartości wahały się w granicach 2—4 mol/l. Ten rząd wielkości stanowi dolną granicę stosowalności metody Benesi-Hildebranda, toteż wyniki te obciążone są prawdopodobnie znacznym błędem.

Inny interesujący model wybrał Shifrin (84, 85, 86) poszukując układu, który odtwarzałyby spektralne własności  $NAD^+$  związanego z czą-

steczką enzymu. Dokonał on syntezy serii związków zawierających w części amide kwasu nikotynowego jako akceptor elektronów oraz pierścieni indolowy lub inną grupę o charakterze donorowym (na przykład wzór I). Układ taki powinien lepiej imitować sytuację, w jakiej znajduje się związany  $\text{NAD}^+$ , który z częścią białkową enzymu połączony jest prawdopodobnie także za pośrednictwem wiązań walencyjnych. Shifrin badał absorpcję i emisję zsyntetyzowanych przez siebie związków i zauważył w ich widmach absorpcyjnych pasma analogiczne do pasm w widmach kompleksów badanych przez Cilento i Giusti. Jednak nie następował wzrost natężenia fluorescencji w stosunku do wolnego nikotynamidu, jaki obserwuje się w przypadku związanego z enzymem  $\text{NAD}^+$ .



Opisywane układy modelowe dostarczyć mogą jedynie bardzo niepełnych informacji o charakterze rzeczywistych oddziaływań badanych związków w warunkach naturalnych. Obserwacja ich zachowania stanowić może jednak podstawę do tworzenia hipotez posiadających pewne znamiona prawdopodobieństwa.

Interesującą próbą wyjaśnienia niektórych etapów procesu fosforylacji oksydacyjnej była hipoteza pani B. G r a b e (28). Według niej FMN i NAD w mitochondriach znajdują się względem siebie w ściśle określonym sztywnym położeniu, w którym płaszczyzny pierścienia pirydynowego NAD i izoalloksazynowego flawiny są równoległe. W tych ściśle określonych warunkach przestrzennych częściowe przeniesienie ładunku z NAD na FMN stanowi pierwszy krok w procesie przemiany obecnych w roztworze jonów fosforanowych w aktywowane grupy fosforylowe. W dalszym etapie syntetyzuje się ATP przy pomocy cytochromu zajmującego sąsiednie miejsce w łańcuchu oddechowym. Hipoteza ta, jakkolwiek całkowicie spekulatywna, ilustruje dobrze trudności związane z badaniami oddziaływań międzycząsteczkowych w układach biologicznych. Jak wiadomo, aby powstał kompleks donorowo-akceptorowy konieczny jest kontakt między cząsteczką donatora i akceptora (stabilizacja stanu podstawowego kompleksu); w strukturach biologicznych, takich jak mitochondria, kontakt ten i właściwa wzajemna orientacja przestrzenna zapewnione są przez ścisłą organizację na poziomie cząsteczkowym. Na ogół bezpośrednio badanie własności fizykochemicznych układów stanowiących składnik tej struktury jest niemożliwe. W warunkach *in vitro* kompleks może mieć zbyt małą stałą równowagi, lub też w ogóle nie powstawać, co nie wyklucza możliwości jego tworzenia się *in vivo*.

Dla rozważań nad występowaniem i rolą oddziaływań donorowo-akceptorowych w układach biologicznych bogatego materiału dostarczają badania własności elektrycznych cząsteczek. Szczególnie interesujące są prace Lovelocka i wsp. (55, 56, 57) poświęcone badaniom powinowactwa różnych substancji organicznych do elektronów o energiach termicznych. Spośród zbadanych przez zespół Lovelocka związków chemicznych bardzo dużym powinowactwem do elektronów termicznych wyróżnia się niewielka stosunkowo grupa substancji o wyraźnym działaniu biologicznym. Należą do niej produkty pośrednie procesu utleniania glukozy w cyklu Krebsa, hormony kierujące procesami utleniania — w pierwszym rzędzie sterydowe — a także pewna ilość związków bardzo toksycznych (zwłaszcza związki aromatyczne zawierające grupę nitrową i atomy chlorowców). Do grupy tej zaliczają się także związki typu chinonów i przypuszczalnie NAD. Wszystkie te substancje pośrednio lub bezpośrednio związane są z procesem utleniania biologicznego, albo proces ten zakłócają.

### 3. Porfiryny i karotenoidy

Według teoretycznych obliczeń (76) porfiryny oraz karoteny  $\alpha$  i  $\beta$  powinny być zarówno dobrymi donatorami jak i akceptorami. Próby doświadczalnego potwierdzenia tych przewidywań nie we wszystkich przypadkach dały wyniki przekonujące. Platt (74) stwierdził, że dane spektroskopowe świadczą o występowaniu *in vivo* jakiegoś rodzaju asocjacji pomiędzy karotenoidami a chlorofilem. Wysuwa on hipotezę, że oddziaływania donorowo-akceptorowe prowadzić mogą w karotenoidach do obniżenia poziomu wzbudzonego i na tej podstawie proponuje mechanizm przenoszenia elektronów wzdłuż łańcuchów karotenoidowych zbudowanych ze sprzężonych wiązań podwójnych. W 1963 roku Lupinski (53) donosi o wykryciu pasma c-t w okolicy 1000 nm w widmie kompleksów  $J^+$  z karotenem. Jednak Ebreys (21) uważa, że pasmo to nie może powstawać w wyniku przeniesienia ładunku w kompleksie donorowo-akceptorowym, lecz wywołane jest przesunięciem pasma absorpcyjnego  $\beta$ -karotenu.

Badając własności donorowe koproporfiryny i etioporfiryny Gouterman i Stevenson (27) wykazali, że tworzą one z trójnitrobenzenem kompleksy 1:1. Również hematoporfiryna tworzy kompleksy z tym dobrym akceptorem (32). Jednak Mauzerall (65) nie mógł wykryć żadnego nowego pasma absorpcyjnego w widmach kompleksów różnych porfiryn z dużymi kationami organicznymi (na przykład purynami) jako akceptorami. Heathcote i wsp. (32) badali układy składające się z hematoporfiryny jako akceptora i różnych donatorów elektronów, między innymi aminokwasów. Wykazali oni, że w układach tych tworzą się kompleksy donorowo-akceptorowe i obserwowane zmiany

widma są termicznie odwracalne. Dla szeregu kompleksów wyznaczyli stałe równowagi oraz ciepła tworzenia.

Ze związków biorących udział w procesie fotosyntezy zwraca uwagę plastochinon, który jest jednym z najsilniejszych akceptorów elektronów występujących w organizmach żywych (82).

Zebrane dotychczas dane, podobnie jak w przypadku nukleotydów flawinowych i pirydynowych, nie pozwalają rozstrzygnąć o słuszności jakiegokolwiek teorii dotyczącej mechanizmu reakcji fotochemicznej w fotosyntezie. Podobnie jak mitochondria, chloroplasty są bardzo złożonymi strukturami i interpretacje nasuwają te same zastrzeżenia jak w przypadku łańcucha oddechowego. Najbardziej interesującą teorią eksponującą znaczenie oddziaływań donorowo-akceptorowych we wstępnym etapie fotosyntezy zaproponował Calvin (14). Chlorofil zbudowany jest, jak wiadomo, z hydrofilowego pierścienia porfiryнового, z którym związany jest rozpuszczalny w tłuszczach łańcuch węglowodorowy. W związku z tym w chloroplastach pierścień porfiryновый znajduje się na granicy pomiędzy fazą wodną i lipidową. Zgodnie z modelem Calvina porfiryyna chlorofilowa spełnia w procesie fotosyntezy na przemian rolę donatora i akceptora elektronów. Wzbudzony chlorofil oddaje elektron niezidentyfikowanemu akceptorowi znajdującemu się w fazie lipidowej, a następnie stając się akceptorem odbiera elektron od rozpuszczonego w fazie wodnej donatora, którym może być na przykład zredukowany cytochrom. W takich procesach przenoszenia elektronu zasadniczą rolę odgrywałaby wzajemna orientacja i własności donorowo-akceptorowe biorących w nich udział cząsteczek.

#### 4. Farmakologiczne działanie niektórych substancji na układ nerwowy

Pierwsze próby wykrycia zależności między aktywnością farmakologiczną niektórych leków układu nerwowego a ich własnościami donorowymi datują się z roku 1958 (75). W roku 1959 Karreman i wsp. (40) donieśli, że chloropromazyna (*largactil*) — lek stosowany przy schizofrenii — jest wyjątkowo dobrym donatorem elektronów (tak dobrym, że zadziwiający jest fakt jej chemicznej trwałości), zaś Mason (63) ustalił ściłą zależność między działaniem narkotycznych gazów szlachetnych a ich przekrojem czynnym na wychwytywanie powolnych elektronów. W ten sposób hipoteza wiążąca mechanizm działania leków anestetycznych z ich własnościami donorowymi znalazła pewne potwierdzenie. Szent-Györgyi (90) poświęcił cały rozdział swego „Wstępu do biologii submolekularnej” rozważaniom na ten temat i wśród substancji o wybitnych własnościach donorowych wymienia serotoninę, halucynogeny z grupy LSD, bufontynę, a także chininę, nikotynę, atropinę, morfinę, strychninę i hormony z grupy estrogenów.

Zwrócono także uwagę na własności akceptorowe wielu leków. Pullman (77) przypisuje wybitne własności akceptorowe aktywnym cynie  $C_3$ . Inni badacze (1, 7, 59, 88, 93) zajmują się w większości mechanizmem działania leków znieczulających i halucynogenów. Gregory (29) podejmuje także próbę wyjaśnienia toksycznego działania  $CCl_4$  i niektórych podobnych związków. Jego zdaniem dzięki swym akceptorowym własnościom związki te mogą przyjmować wolny elektron i tworzyć wolny rodnik, który oddziaływując z centrami czynnymi enzymów powoduje zahamowanie ich aktywności. Pewnym dowodem słuszności jego tezy jest fakt, że  $CCl_4$  redukuje się *in vivo* do  $CHCl_3$ .

### 5. Czynniki mutageniczne i kancerogenne

Zgodnie z hipotezą Lermana (52, 53, 54) oddziaływanie pomiędzy DNA a czynnikami mutagenicznymi typu akrydyny prowadzi do powstawania kompleksów, w których cząsteczka barwnika „wślizguje” się pomiędzy dwie sąsiednie pary zasad w podwójnej spirali DNA. Proces ten zwany jest interkalacją. Ze względu na stosunkowo ściśle upakowanie zasad w spirali (odległość dwu par wynosi około 3,5 Å) oddziaływanie układów  $\pi$ -elektronów zasad azotowych i barwnika akrydynowego musi być znaczne. Na to, że mogą one w tym przypadku odgrywać istotną rolę, wskazuje jeszcze fakt, że w pewnych warunkach akrydyna przejawia cechy dobrego akceptora elektronów (72). Nie wyjaśniono czy między akrydyną a wolnymi purynami i pirymidynami tworzą się kompleksy *c-t* (19). Wyniki otrzymane metodą ERP wskazują na taką możliwość, jednakże nie udało się wykryć pasma *c-t*.

Z własnościami donorowo-akceptorowymi próbowano także powiązać rakotwórcze działanie związków chemicznych (patrz artykuł przeglądowy (51). Prace te (3, 4, 5, 10, 13, 22, 33, 34, 35, 39, 57, 62, 71, 80, 83) mają jedynie znaczenie historyczne, podobnie jak teorie Masona, Hoffmana i Ladika, Briksa oraz Allisona i Nasha wiążące działanie kancerogenne z powstawaniem kompleksów donorowo-akceptorowych. Epstein i wsp. (22) po zbadaniu 107 związków (głównie węglowodorów aromatycznych) stwierdzili ostatecznie, że nie istnieje zależność między działaniem rakotwórczym a własnościami donorowymi czy akceptorowymi.

Jak wynika z tego przeglądu wybranych zagadnień dotyczących biologicznej roli oddziaływań donorowo-akceptorowych nie możemy już dziś podzielać pierwotnego entuzjazmu Alberta Szent-Györgyi'ego wyrażonego w jego „Wstępie do biologii submolekularnej”. On sam przyznaje zresztą (89), że „pojęcie kompleksu z przeniesieniem ładunku nie znalazło sobie właściwie miejsca w biologii i „pozostało dla biologa, w mniejszym lub większym stopniu, tylko ciekawostką chemiczną”. Wydaje się jednak, że w wielu przypadkach nie można rozważać procesów biochemicznych bez uwzględnienia oddziaływań typu donorowo-akceptorowego. W cytowanej



powyżej pracy Szent-Györgyi formuluje nową hipotezę, zgodnie z którą oddziaływania te odgrywać mogą zasadniczą rolę w dziedzinie regulacji wzrostu komórki, różnicowania i transformacji rakowej. Jak owocna będzie ta hipoteza wykażą przyszłe badania.

## LITERATURA

1. Agin D., *Nature* **205**, 805 (1965).
2. Alivisatos S. G. A., Ungar F., Jibrill A., Mourkides G. A., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 361 (1961).
3. Allison A. C., Lightbown J. W., *Nature* **189**, 892 (1961).
4. Allison A. C., Nash T., *Nature* **197**, 758 (1963).
5. Allison A. C., Peover M. E., Gough T. A., *Nature* **197**, 764 (1963).
6. Andrews L. J., Keefer R. M., *Molecular Complexes in Organic Chemistry*. Holden-Day, San Francisco 1964.
7. Ariens E. J., *Molecular Pharmacology*, tom I, Academic Press, 1964.
8. Beinert H., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5323 (1956).
9. Benesi H. A., Hildebrand J. H., *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 2703 (1949).
10. Birks J. B., *Nature* **190**, 232 (1961).
11. Briegleb G., *Electronen-Donator-Acceptor Komplexe*, Springer Verlag, Berlin 1961.
- 11a. Briegleb G., Czekalla J., *Angew. Chem.* **72**, 401 (1960).
12. Bullock F. J., rozdz.: Charge Transfer in Biology w *Comprehensive Biochemistry*, tom 22, red. M. Florkin i E. Stotz, Elsevier, 1967.
13. Buu-Hoi N. P., Jaquignon P., *Experientia* **13**, 375 (1957).
14. Calvin M., *J. Theoret. Biol.* **1**, 258 (1961).
15. Carter S., Murrell J. N., Rosh E. J., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 2048 (1965).
16. Cilento G., Giusti P., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 3801 (1959).
17. Cilento G., Giusti P., *J. Biol. Chem.* **236**, 907 (1961).
18. Davis K. M. C., Symons M. C. R., *J. Chem. Soc.* str. 2079 (1965).
19. Duchesne J., Machmer P., *Compt. Rend.* **260**, 4279 (1965).
20. Eberts F. S. Jr., Slomp G., Johnson J. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 305 (1961).
21. Ebrey T., *J. Phys. Chem.* **71**, 1963 (1967).
22. Epstein S. S., Bulon I., Koplan J., Small M., Mantel N., *Nature* **204**, 750 (1964).
23. Fleishman D. E., Tollin G., *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 255 (1965).
24. Fleishman D. E., Tollin G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 38 (1965).
25. Gibson Q. H., Massey V., Atherton N. M., *Biochem. J.* **85**, 369 (1962).
26. Goudot A., rozdz. Charge Transfer Complexes in Catalysis by Organometalic Enzymes w *Wave Mechanics and Molecular Biology*, red. L. de Broglie, Addison-Wesley Publ. Co., Inc., 1966.
27. Gouterman M., Stevenson P. E., *J. Chem. Phys.* **37**, 2226 (1962).
28. Grabe B., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 560 (1958).
29. Gregory N. L., *Nature* **212**, 1460 (1966).
30. Harbury H. A., Foley K. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **44**, 662 (1958).
31. Harbury H. A., La Noye K. F., Loach P. A., Amick R. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **45**, 1708 (1959).
32. Heathcote J. G., Hill G. J., Rothwell P., Slifkin M. A., *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 13 (1968).

33. Hoffman T. A., Ladik J., *Acta Physica Hung.* **13**, 103 (1961).
34. Hoffman T. A., Ladik J., *Cancer Res.* **21**, 474 (1961).
35. Hughes P. E., *Nature* **205**, 871 (1965).
36. Isenberg I., Szent-Györgyi A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **44**, 857 (1958).
37. Isenberg I., Szent-Györgyi A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **45**, 1229 (1959).
38. Isenberg I., Szent-Györgyi A., Baird S. L. Jr., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 1307 (1960).
39. Jones J. B., Bersden M., Niece G. C., *Nature* **211**, 309 (1966).
40. Karreman G., Isenberg I., Szent-Györgyi A., *Science* **130**, 1191 (1959).
41. Kauzman W., *Advan. Protein Chem.* **14**, 1 (1959).
42. Kosower E. M., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 3883 (1955).
43. Kosower E. M., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 3497 (1956).
44. Kosower E. M., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3253 (1958).
45. Kosower E. M., *Progress in Physical Organic Chemistry*, tom 3, Wiley Publ. Co., Inc., New York 1965, str. 81.
46. Kosower E. M., w *Flavins and Flavoproteins*, red E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 1.
47. Kosower E. M., Burbach J. C., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5838 (1956).
48. Kosower E. M., Klinedienst P. E. Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 3493 (1956).
49. Kosower E. M., Skorcz J. A., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 2195 (1960).
50. Kosower E. M., Wu G. S., *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 3142 (1961).
51. Kyselka A., *Neoplasma* **14**, 291 (1967).
52. Lerman L. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **49**, 94 (1963).
53. Lerman L. S., *J. Cellular. Comp. Physiol. Suppl.* **1**, 1 (1964).
54. Lerman L. S., *J. Mol. Biol.* **10**, 367 (1964).
55. Lovelock J. E., *Nature* **189**, 729 (1961).
56. Lovelock J. E., Simonds P. G., Vandenheufel W. J. A., *Nature* **197**, 849 (1963).
57. Lovelock J. E., Zlatkis A., Becker R. S., *Nature* **193**, 540 (1962).
58. Lupinski J. H., *J. Phys. Chem.* **67**, 2725 (1963).
59. Lyons L. E., Mackie J. C., *Nature* **197**, 589 (1963).
60. Mahler H. R., Brand L. L., w *Free Radicals in Biological Systems*, Academic Press, New York 1961, str. 157.
61. Manton M. J., *Molecular Associations in Biology*, Academic Press, 1968.
62. Mason R., *Nature* **181**, 820 (1958).
63. Mason R., *Disc. Farad. Soc.* **27**, 129 (1959).
64. Massey V., Palmer G., *J. Biol. Chem.* **237**, 2347 (1962).
65. Mauzerall D., *Biochemistry* **4**, 1801 (1965).
66. Mulliken R. S., *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 600 (1950).
67. Mulliken R. S., *J. Chem. Phys.* **19**, 514 (1951).
68. Mulliken R. S., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 811 (1952).
69. Mulliken R. S., *J. Chem. Phys.* **56**, 801 (1952).
70. Mulliken R. S., Person W. E., *Ann. Rev. Phys. Chem.* **14**, 107 (1963).
71. Nash T., *Nature* **179**, 868 (1957).
72. Nash T., Allison A. C., *Nature* **195**, 994 (1962).
73. Pigoń K., Gumiński K., Vetulani J., *Półprzewodniki Organiczne. PWNT, Warszawa 1964.*
74. Platt J. R., *Science* **129**, 312 (1959).
75. Popov A. I., Castellani-Bisi C., Craft M., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6513 (1958).

76. Pullman A., Pullman B., rozdz. Charge Transfer Complexes in Biochemistry w Quantum Theory of Atoms, Molecules and the Solid State, red. Per-Olov Löwdin, Academic Press, 1966.
77. Pullman B., *Biopolymers Symp.* 1, 152 (1964).
78. Pullman B., Pullman A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 44, 1197 (1958).
79. Pullman B., Pullman A., *Quantum Biochemistry*, Wiley Publ. Co., Inc., New York 1963.
80. Pullman B., Pullman A., Allison A. C., Nash T., *Nature* 199, 467 (1963).
81. Radda G. K., Calvin M., *Biochemistry* 3, 384 (1964).
82. Redfearn E. R., Friend J., *Nature* 191, 806 (1961).
83. Rothwell K., Whitehead J. K., *Nature*, 213, 797 (1967).
84. Shifrin S., *Biochim. Biophys. Acta* 81, 205 (1962).
85. Shifrin S., *Biochemistry* 3, 829 (1964).
86. Shifrin S., *Biochim. Biophys. Acta* 96, 173 (1965).
87. Shifrin S., Kaplan N. O., *Advan. Enzymol.* 22, 337 (1960).
88. Snyder S. H., Merrill C. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 54, 258 (1965).
89. Szent-Györgyi A., *Science* 161, 988 (1968).
90. Szent-Györgyi A., *Wstęp do Biologii Submolekularnej*, PWN, Warszawa 1968.
91. Theorell H., Nygaard A. P., *Acta Chem. Scand.* 8, 1649 (1954).
92. Tsibris J. C. M., McCormick D. B., Wright L. D., *Biochemistry* 4, 504 (1964).
93. Wielding S., *Prog. Med. Chem.* 3, 332 (1963).
94. Wright L. D., McCormick D. B., *Experientia* 20, 501 (1964).

- 1. Władysław A. ...
- 2. ...
- 3. ...
- 4. ...
- 5. ...
- 6. ...
- 7. ...
- 8. ...
- 9. ...
- 10. ...
- 11. ...
- 12. ...
- 13. ...
- 14. ...
- 15. ...
- 16. ...
- 17. ...
- 18. ...
- 19. ...
- 20. ...
- 21. ...
- 22. ...
- 23. ...
- 24. ...
- 25. ...
- 26. ...
- 27. ...
- 28. ...
- 29. ...
- 30. ...
- 31. ...
- 32. ...
- 33. ...
- 34. ...
- 35. ...
- 36. ...
- 37. ...
- 38. ...
- 39. ...
- 40. ...
- 41. ...
- 42. ...
- 43. ...
- 44. ...
- 45. ...
- 46. ...
- 47. ...
- 48. ...
- 49. ...
- 50. ...
- 51. ...
- 52. ...
- 53. ...
- 54. ...
- 55. ...
- 56. ...
- 57. ...
- 58. ...
- 59. ...
- 60. ...
- 61. ...
- 62. ...
- 63. ...
- 64. ...
- 65. ...
- 66. ...
- 67. ...
- 68. ...
- 69. ...
- 70. ...
- 71. ...
- 72. ...
- 73. ...
- 74. ...
- 75. ...
- 76. ...
- 77. ...
- 78. ...
- 79. ...
- 80. ...
- 81. ...
- 82. ...
- 83. ...
- 84. ...
- 85. ...
- 86. ...
- 87. ...
- 88. ...
- 89. ...
- 90. ...
- 91. ...
- 92. ...
- 93. ...
- 94. ...
- 95. ...
- 96. ...
- 97. ...
- 98. ...
- 99. ...
- 100. ...

STANISŁAW SZALA \*, JAN FILIPSKI \*\*

## Stabilność struktury drugorzędowej DNA

### Stability of Secondary Structure of DNA

The problem of stability of secondary structure of DNA is reviewed. The contribution of hydrogen bond, van der Waals and London forces, interaction of DNA with the solvent and interactions between negative charged phosphate groups on the stabilizing forces of helix form of DNA are discussed.

Jednym z podstawowych wymagań jakie musi spełniać materialny nośnik informacji genetycznej jest stabilność jego struktury. Bardzo specyficzna budowa cząsteczek DNA, ich podwójna spirala posiadająca wewnątrz ukryte „znaki kodu” w postaci zasad azotowych z zablokowanymi przez wiązania wodorowe grupami chemicznie aktywnymi, spełnia warunek trwałości poprzez uzyskaną w ten sposób mechaniczną sztywność i zmniejszenie reaktywności chemicznej. Z drugiej jednak strony warunkiem spełnienia przez cząsteczki DNA roli nośnika informacji musi być ich zdolność do zmian skrukuralnych tj. przemiany dwuniciowej cząsteczki spiralnej w jednoniciową (16). Zakłócenie tej zdolności powoduje uszkodzenia w funkcjonowaniu aparatu genetycznego. Istnieje szereg związków (np. akrydyna i jej pochodne, antybiotyki jak np. aktynomycyna D, daunomycyna), których cząsteczki wbudowują się pomiędzy płaszczyzny zasad w łańcuchach spirali. Zwiększają one oddziaływania pomiędzy zasadami obniżając tym samym zdolność przejścia formy spiralnej w jednoniciową (18, 40, 51, 60). *In vivo* substancje takie blokują mechanizmy replikacji i transkrypcji informacji genetycznej.

Początkowo Watson i Crick (64) byli zdania, że stabilność drugorzędowej struktury DNA zapewniają wiązania wodorowe pomiędzy komplementarnymi zasadami. Obecnie dopuszcza się wiele innych rodzajów oddziaływań stabilizujących strukturę DNA, które można z grubsza podzielić na oddziaływania elektrostatyczne, Londona, hydrofobne oraz typu wiązań wodorowych (6, 8, 12, 41, 48, 60, 63).

\* Mgr, Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, Gliwice.

\*\* Dr inż., Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, Gliwice.

W kolejnych rozdziałach omówimy rodzaje poszczególnych sił stabilizujących strukturę drugorzędową DNA.

## I. Denaturacja

Proces przemiany struktury dwuniciowego spiralnego polinukleotydu w jednoniciowe kłębki, który obserwuje się *in vitro*, nazywa się denaturacją. Istnieje cały szereg czynników powodujących taką przemianę bez naruszenia struktury pierwszorzędowej: zmiana środowiska w kierunku skrajnych wartości  $pH$ , obniżenie siły jonowej roztworu, podwyższenie temperatury (40, 58, 60). We wszystkich przypadkach krzywa obrazująca reakcję przejścia spirala-kłębek ma sigmoidalny charakter przejścia fazowego kryształ-ciecz i dlatego proces ten nazywa się często „topnieniem”.

Szereg teorii opisuje matematycznie przebieg procesu denaturacji DNA (14, 20, 21, 29, 58, 66).

Wyniki obliczeń Hill'a (29) prowadzą do uwypuklenia znaczenia wielkości energii oddziaływań skrajnej pary związanej ze skrajną parą w obszarze zdenaturowanym. Istnienie już związanej pary zasad ułatwia tworzenie kolejnych wiązań wodorowych pomiędzy następnymi komplementarnymi parami zasad. Przejście fazowe polinukleotydu zawdzięcza swą ostrość w dużym stopniu temu właśnie czynnikowi.

Model denaturacji polinukleotydów typu „zamka błyskawicznego” G i b b s'a i D i M a r z i o (20), w którym denaturacja zachodzi wyłącznie do końców cząsteczki z dobrym przybliżeniem opisuje przejście fazowe dla polinukleotydów o krótkim łańcuchu.

Teoria przejścia spirala  $\rightarrow$  kłębek dla DNA została rozbudowana przez różnych autorów, głównie w kierunku wyliczenia wpływu istnienia, udziału i rozkładu wzdłuż łańcucha dwu rodzajów par: GC i AT (14,21).

Najlepiej została zbadana denaturacja termiczna obserwowana spektrofotometrycznie. Wyznaczanie spektrofotometrycznej krzywej „topnienia” opiera się na zjawisku zwiększania się optycznej gęstości roztworu podczas denaturacji. Temperatura, w której efekt hyperchromowy osiąga połowę wielkości maksymalnej nazywa się temperaturą topnienia i oznacza się ją symbolem  $T_m$  (40). Podobnie w przypadku denaturacji kwaśnej i alkalicznej definiuje się  $pH_m$  jako wartość  $pH$ , przy której efekt hyperchromowy osiąga połowę swojej wartości (58). Wielkości te są miarą trwałości struktury spiralnej w danych warunkach. Efekt hyperchromowy wywołany jest zmniejszeniem wzajemnych oddziaływań lokalnych pól rozciągających się wokół heterocyklicznych pierścieni zasad (9). Nie można mówić o prostej proporcjonalności pomiędzy ilością rozerwanych wiązań w danej temperaturze a przyrostem gęstości optycznej (3). Zmiany lepkości roztworów DNA podczas denaturacji wynikające z przemiany

względnie sztywnych cząsteczek dwuniciowych w bardziej giętkie, pojedyncze nici polinukleotydowe można zaobserwować w temperaturach, w których nie obserwuje się jeszcze wzrostu gęstości optycznej (1, 61). Podobnie zmiany skręcalności optycznej DNA wynikające ze zniszczenia wysokiej symetrii spirali (2), jak również ujawnienia się katalitycznej aktywności grup aminowych obserwowane oscylopolarograficznie (46) są widoczne w temperaturach niższych niż początek spektrofotometrycznego topnienia.

Można więc przypuszczać, że pewne zmiany struktury DNA zachodzą zanim następuje rozejście się polinukleotydowych nici (38). Z drugiej strony uważa się, że pomimo przekraczania temperatury w której kończy się wzrost gęstości optycznej pojedyncze nici DNA nie rozchodzą się całkowicie (19).

Z badań kinetyki rozpadu podwójnej spirali na pojedyncze nici wynika, że w temperaturach powyżej  $T_m$  szybkość pojawienia się zdenaturowanego DNA jest o kilka rzędów wielkości mniejsza niż szybkość hyperchromazji i jest skończona powyżej temperatury, w której kończą się zmiany gęstości optycznej (59).

## II. Wiązania wodorowe

Istotną cechą wiązania wodorowego jest to, że atom wodoru stanowi jak gdyby mostek między dwoma atomami elektroujemnych pierwiastków np. tlenu lub azotu, zawierającymi wolne pary elektronów. Proton utrzymuje się między parami elektronów atomów w wyniku istnienia momentów dipolowych.

Analizując dane Willkinsa i wsp. (65) oraz Franklin i Goslinga (15) pochodzące z badań nad dyfrakcją promieni X, Watson i Crick (64) zaproponowali model struktury drugorzędowej DNA\*. Zgodnie z tym modelem uporządkowana struktura cząsteczki DNA może być jedynie zachowana przez połączenie przy pomocy wiązań wodorowych puryn z pirymidynami. Jakkolwiek wydaje się, że mogą występować połączenia adeniny z tyminą i adeniny z cytozyną oraz guaniny z tyminą i guaniny z cytozyną, względy stereochemiczne powodują, że w modelu Watsona i Cricka połączenie w pary może zająć wyłącznie między adeniną i tyminą oraz guaniną i cytozyną. Wiązań wodorowych w parze AT jest tylko dwa, podczas gdy w parze GC, po uzupełnieniach Paulinga i Corey'a (47), trzy.

Sądząc ze swoistości wiązań między komplementarnymi parami wydawało się, że one właśnie zapewniają stabilność struktury drugorzędowej

\* Bardziej szczegółowemu modelowi struktury drugorzędowej DNA poświęcony jest artykuł Hamiltona (25).

DNA (40, 64). To, że stabilność DNA bogatego w pary GC była większa od DNA o przewadze par AT była istotnym argumentem na korzyść tej koncepcji (40). Fakt ten tłumaczono wpływem trzeciego dodatkowego wiązania wodorowego w parze GC. Stąd też zaskakujące były eksperymenty, w których zamiast wody jako rozpuszczalnika używano wody ciężkiej,  $D_2O$  (5). Zmiana ta zwiększa trwałość wiązań wodorowych z powodu większej masy deuteru i powinna dać w rezultacie wzrost temperatury topnienia ( $T_m$ ). Jednak tego typu zmiana nie wywołuje istotnych zmian stabilizacyjnych w DNA (5), w przeciwieństwie do wzrostu stabilności struktury drugorzędowej rybonukleazy (przesunięcie  $T_m$  o 4 stopnie) (53). Również tak klasyczny czynnik denaturujący białka jak mocznik, który rozrywa wiązania wodorowe, jest mniej efektywnym czynnikiem denaturującym niż np.  $ClO_4^-$ , czy  $CCl_3COO^-$ , które rozrywają wiązania hydrofobne (41, 43).

Crothers i Zimm (6) zakładając, że wiązania wodorowe między komplementarnymi parami są równocenne pod względem energetycznym, przyjęli, że dwa wiązania wodorowe w parze AT wnoszą w swobodną energię tworzenia struktury spiralnej z kłębków — 2 kcal/mol par zasad a trzy wiązania wodorowe w parze GC — 3 kcal/mol par zasad. Byłyby to jednak dość niewielki wkład energetyczny w ogólną energię tworzenia struktury spiralnej. Większość jej tzn. około — 7 kcal/mol par zasad pochodzi z oddziaływań zasad wzdłuż łańcuchów polinukleotydowych (6).

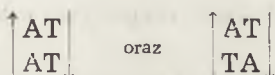
### III. Wiązania van der Waalsa i Londona

Siły van der Waalsa związane są z występowaniem w cząsteczkach trwałych i indukowanych momentów dipolowych. Wyróżnia się trzy zasadnicze typy takich oddziaływań: oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami obdarzonymi trwałymi dipolami, oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami o trwałych dipolach a cząsteczkami niepolarnymi, w których dipole mogą być wyindukowane, oraz oddziaływania pomiędzy cząsteczkami, które nie mają trwałych momentów dipolowych ale mogą ulegać polaryzacji. Siły wynikające z oddziaływań dipol indukowany — dipol indukowany nazywane są siłami Londona. We wszystkich trzech przypadkach energia potencjalna oddziaływań zależy od  $r^6$  — gdzie  $r$  oznacza odległość pomiędzy dipolami. Siły te są znacznie słabsze (od 10 do 100 razy) od wiązań kowalencyjnych i rozciągają się na większe odległości (od 3 do 5 razy) niż wiązania walencyjne.

Zagadnienie wkładu sił van der Waalsa i Londona w stabilizację struktury DNA rozważali De Voe i Tinoco (8). Obliczyli oni teoretycznie wkład poszczególnych sił w ogólną sumę oddziaływań między zasadami w podwójnej spirali. Z obliczeń wynika, że istnieją silne oddziaływania typu elektrostatycznego i londonowskiego zarówno pomiędzy zasadami



w parze jak i pomiędzy zasadami w tym samym łańcuchu. Energia wiązań wodorowych, jak oceniają, w niewielkim stopniu wpływa na stabilność struktury dwuniciowej, choć one to właśnie zapewniają specyficzność wiązania się A z T i G z C. Zdaniem tych autorów różnica w temperaturach topnienia pomiędzy polinukleotydami o różnej zawartości GC i AT wynika przede wszystkim z różnicy w oddziaływaniach typu dipol—dipol, które w przypadku pary GC sprzyjają sparowaniu, natomiast w przypadku pary AT działają w kierunku destrukcji pary. Oddziaływania typu dipol-indukowany dipol, pomiędzy zasadami w sekwencjach:



(kierunek strzałki wskazuje wiązania zasada-dezoksyryboza-3'-fosforan-5'-dezoksyryboza-zasada) niwelują to działanie i w sumie polimer zawierający wyłącznie adeninę i tyminę jest w warunkach założonych w obliczeniach stabilny, jednak stabilizująca go energia jest około dwukrotnie niższa od energii stabilizującej polinukleotyd zawierający wyłącznie pary GC.

Istnienie oddziaływań pomiędzy zasadami wzdłuż łańcucha polinukleotydowego (ang. *base stacking*) można wykazać doświadczalnie (2, 23, 42, 43). Brahm s i Mommaerts (2) obserwowali dichroizm kołowy oligonukleotydów w roztworze. Pojedyncze nukleotydy wykazują widmo dichroizmu kołowego, które w miarę wzrostu stopnia polimeryzacji oligonukleotydów ulega zmianom, w szczególności następuje znaczny wzrost maksymalnej wartości  $E = E_L - E_P$ , gdzie  $E_L$  i  $E_P$  oznaczają odpowiednio współczynniki molowe absorpcji oligonukleotydów dla światła spolaryzowanego kołowo w lewo i prawo. Takie zachowanie świadczy o zwiększeniu się asymetrii w miarę wzrostu ciężaru cząsteczkowego i jest spowodowane tym, że nie wszystkie wzajemne położenia przestrzenne nukleotydów w łańcuchu polinukleotydowym są energetycznie równocenne. Wyraźny spadek  $E_{\max}$  ze wzrostem temperatury, który ma kształt rozmytej krzywej „topnienia”, dowodzi istnienia najbardziej uprzywilejowanej pozycji wzajemnej zasad w cząsteczce dwunukleotydu. Spadek wraz z temperaturą staje się bardziej ostry w miarę wzrostu ciężaru cząsteczkowego polimeru.

Na istnienie oddziaływań pomiędzy zasadami w trójnukleotydach wskazują też badania przy pomocy magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) (52). Pole magnetyczne, które towarzyszy sprzężonym wiązaniom w heterocyklicznych pierścieniach działa na protony sąsiadujących zasad i wywołuje przesunięcie maksimum w widmie NMR dla polinukleotydów w stosunku do mononukleotydów. Podobnie zmiany w widmie NMR wraz z temperaturą sugerują istnienie oddziaływań, które powodują powstanie dwucząsteczkowych kompleksów w roztworach puryny (28).

Można sądzić, że obserwowane przy zastosowaniu dichroizmu kołowego i NMR równoległe usytuowanie zasad w roztworach wolnych zasad (50), polinukleotydów czy kwasów nukleinowych wynika z oddziaływań natury elektrostatycznej lub Londona (43). Stwierdzono mianowicie, że dodatek do roztworu DNA substancji, których oddziaływania typu van der Waalsa z zasadami są silne, powodują destabilizację struktury spiralnej na zasadzie konkurencji i to w stopniu tym większym im silniejsze są te oddziaływania (26).

#### IV. Oddziaływania cząsteczek rozpuszczalnika z cząsteczkami DNA

Określając udziały energetyczne poszczególnych sił stabilizujących strukturę drugorzędową DNA nie można pominąć wkładu oddziaływań grup polarnych i niepolarnych w cząsteczkach DNA z cząsteczkami wody.

Jedną z pierwszych hipotez oddziaływania cząsteczek DNA z cząsteczkami wody była sugestia Jacobsona (32). Po rozpuszczeniu DNA w wodzie następuje rozerwanie struktury wody i przegrupowanie strukturalne, w wyniku którego cząsteczki polimeru ściśle dopasowują się do spiralnych przestrzeni międzywęzłowych w strukturze wody. Zorientowane cząsteczki wody tworzą wiązania wodorowe z grupami polarnymi DNA, które służą jako donory lub akceptory. Powoduje to stabilizację struktur wodnych przez powierzchnie graniczne makrocząsteczki i powstanie warstwy hydratacyjnej. Badania Hearsta i Vinograda (27) potwierdzałyby przypuszczenia Jacobsona. Z analiz sedimentacyjnych wynika, że cząsteczki DNA bakteriofaga T4 w temperaturze 25° przy aktywności wody zbliżonej do jedności wiążą około 50-ciu cząsteczek wody na nukleotyd.

Również dane magnetycznego rezonansu jądrowego potwierdzają poglądy Jacobsona. Poszerzanie się sygnałów rezonansowych wody i zmniejszanie się powierzchni pod krzywymi sygnałów jest interpretowane jako efekt uporządkowania sieci wodnej (22). Jednak dane te sugerują, że zaledwie drobna ilość wody znajduje się w postaci związanej (22). Dowodziłoby to, że powłoki hydratacyjne cząsteczek DNA są raczej niewielkie i nie obejmują dużych obszarów uporządkowanej sieci podobnej do lodu, tak jak to proponuje Jacobson. Badania DNA metodą spektroskopii w podczerwieni nie wykryły przesunięcia pasma 4,7  $\mu$  w kierunku mniejszych długości fal w niskiej temperaturze (7), czego można by oczekiwać, gdyby cząsteczki DNA miały taki wpływ na strukturę wody jak proponował Jacobson.

Na podstawie badań samodyfuzji wody w roztworach DNA Wang (62) twierdzi, że ilość wody hydratacyjnej wynosi zaledwie 0,35 g na gram suchej masy DNA (tzn. około 6—8 cząsteczek H<sub>2</sub>O na nukleotyd).

Analiza sedymentacyjna roztworów DNA przeprowadzona przez P o u y e t a i wsp. (49) dowodzi, że solwatacja cząsteczek DNA w decydujący sposób zależy od rodzaju kationu soli znajdującej się równocześnie w roztworze. Ilość cząsteczek wody związanej przez nukleotyd ( $\Gamma$ ) jest skrajnie mała w szerokim zakresie molarności w roztworze LiBr. W roztworach NaCl i NaBr  $\Gamma$  wynosi 8 w niskiej sile jonowej i zmniejsza się ze wzrostem stężenia. W roztworach chlorku cezu  $\Gamma$  wynosi 0 w niskich stężeniach i zwiększa się ze wzrostem stężenia soli, przy stężeniu 3M osiąga maximum ( $\Gamma = 7$ ) i zmniejsza się stopniowo przy wzroście molarności. Wielkość uwodnienia nie zależy od masy cząsteczkowej preparatu DNA i jest charakterystycznym parametrem natywnej, spiralnej struktury DNA.

Według obliczeń P o u y e t a i wsp. (49) uwodnienie par GC i AT jest różne i wynosi dla GC około 7 cząsteczek wody, a dla AT około 11,5. Ta różnica w uwodnieniu par GC i AT mogłaby tłumaczyć zmiany gęstości właściwej preparatu DNA w gradiencie chlorku cezu w zależności od składu zasad (55).

Analizując właściwości elektryczne DNA O'K o n s k i (45) wyraża pogląd, że dla wyjaśnienia właściwości dielektrycznych i przewodnictwa roztworów DNA zbędne jest postulowanie istnienia podobnych do lodu powłok hydratacyjnych o grubości setek angstromów. Sądzi on, że woda hydratacyjna DNA stanowi ciekłą powłokę o grubości zaledwie kilku cząsteczek.

L e w i n (36) sugeruje, że wiązania hydrofilne są jednym z głównych czynników warunkujących stabilność struktury drugorzędowej DNA. W formie B, tzn. w formie quasi-krystalicznej, grupy aminowe adeniny i cytozyny w większym rowku cząsteczki DNA oraz grupa aminowa guaniny w rowku mniejszym tworzą wiązania wodorowe z cząsteczkami wody. Stabilizujący wpływ tego typu wiązań powinien być obserwowany raczej w niskich siłach jonowych, gdyż wzrost siły jonowej powoduje coraz to większy destrukcyjny wpływ jonów elektrolitu na strukturę wody.

Hipoteza L e w i n a (36) jest o tyle dyskusyjna, że mimo całego szeregu doświadczeń nie potwierdzono jego przypuszczeń o wyraźnym przesunięciu  $T_m$  przy podstawieniu  $H_2O$  wodą ciężką ( $D_2O$ ). Z drugiej strony należy dodać, że w wyniku występowania konkurencyjnych wiązań wodorowych między cząsteczkami wody rzeczywista siła wiązań wodorowych między grupami polarnymi w środowisku wodnym jest raczej mała i entalpia tworzenia się wiązania zmniejsza się do  $-1,5$  kcal/mol (44).

Nie jest wykluczone, że większy wpływ stabilizujący na strukturę DNA mają oddziaływania hydrofobne grup niepolarnych DNA. H a m a g u c h i i G e i d u s c h e k (24) wykazali denaturujący wpływ niektórych anionów organicznych na DNA, przy czym w stężeniu 4M efekt ten maleje w szeregu  $CCl_3COO^- > CNS^- > CF_3COO^- > ClO_4^- > J^- > CH_3COO^- > Br^-, Cl^-, CHO_2^-$ . Według tych autorów aniony byłyby czyn-

nikami naruszającymi strukturę wody w pobliżu grup niepolarnych DNA. Dawałoby to w efekcie mniejsze oddziaływanie między zasadami wzdłuż łańcucha i w końcu zmiany denaturacyjne.

W rozważaniach nad wpływem grup lub cząsteczek niepolarnych na strukturę wody przeważa obecnie pogląd, przyjęty od czasu badań Franka i Evansa (13), że rozpuszczanie cząsteczek niepolarnych w wodzie modyfikuje jej strukturę. Wzrasta mianowicie udział labilnych struktur o charakterze krystalicznym na skutek większego stopnia powiązania cząsteczek wody wiązaniami wodorowymi oraz ograniczenia rotacji sąsiadujących cząsteczek wody. Daje to wzrost tendencji do tworzenia wokół cząsteczek niepolarnych grup cząsteczek wody o charakterze lokalnej struktury lodowej. Tego typu zmiany struktury wody zmniejszają entalpię i entropię w obrębie samej struktury (33). Zgodnie z tymi założeniami reakcja 1



powinna mieć ujemną wartość entalpii i dość dużą ujemną wartość entropii (26). Jednakże badania prowadzone między innymi przez Bunville'a i wsp. (4) wykazały, że ten typ reakcji ma dodatnią entalpię (8 kcal/mol par zasad) i dużą dodatnią wartość entropii (20 do 30 cal/mol·stop. w 25°C). Wskazywałyoby to na niewielki udział oddziaływań hydrofobnych w energii stabilizującej strukturę drugorzędową DNA, jak sugeruje Hanlon (26).

Badając wpływ solwentu na stabilność struktury drugorzędowej DNA, Sinanoğlu i wsp. (56, 57) uzasadnili teoretycznie wpływ rodzaju rozpuszczalnika na oddziaływania stabilizujące cząsteczki DNA. Energię swobodną przejścia fazowego kłębek spirala ( $\Delta F^{0(H-C)}$ )\* przedstawiają oni jako sumę składowych (równanie 2)

$$\Delta F^{0(H-C)} = \Delta F_{(bs)}^{(H-C)} + \Delta F_{(R)}^{(H-C)} + \Delta F_{(C)}^{(H-C)} + \Delta F_{(V)}^{(H-C)} \quad 2$$

W równaniu tym  $\Delta F_{(bs)}^{(H-C)}$  — różnica w swobodnej energii oddziaływań spirala-solwent i kłębek-solwent;  $\Delta F_{(R)}^{(H-C)}$  — zmniejszenie przez solwent swobodnej energii oddziaływań między zasadami wzdłuż łańcucha;  $\Delta F_{(C)}^{(H-C)}$  — różnica między swobodną energią potrzebną do utworzenia klatki w strukturze wody dokoła spirali i energią swobodną potrzebną do utworzenia dwóch klatek dokoła kłębków w danym roztworze;  $F\Delta_{(V)}^{(H-C)}$  — swobodna energia przejścia spirala  $\rightarrow$  kłębek w próżni.

Badając wpływ różnych solwentów na wielkość poszczególnych składowych Sinanoğlu i Abdalnur (56) stwierdzili, że wielkość  $\Delta F_{(R)}^{(H-C)}$  jest względnie mała i prawie niezależna od rodzaju solwentu. Wartość  $\Delta F_{(bs)}^{(H-C)}$  jest energetycznie duża i pochodzi głównie z oddziaływania kłębków z cząsteczkami solwentu, podczas gdy energia oddziały-

\* Symbolika pochodzi z pracy Sinanoğlu i Abdalnura (56).

wania spirali z rozpuszczalnikiem jest względnie mała. Oczywiście, wiąże się to z większym uwodnieniem kłębków niż spirali. Wartość  $\Delta F_{(ba)}^{(H-C)}$  jest również prawie niezależna od solwentu. Wielkość  $\Delta F_{(C)}^{(H-C)}$  jest względnie duża i zdecydowanie zależy od rodzaju solwentu. Pochodzi ona z konieczności powiększenia powierzchni klatki w strukturze solwentu, aby zmieścić nici polinukleotydowe w postaci kłębków. Wartość ta zmienia się z  $-38$  kcal/mol par zasad w wodzie do  $-12$  kcal/mol w alkoholu metylowym. Według *Sinanoğlu i Abdunura* (56) zmiany wielkości  $\Delta F_{(C)}^{(H-C)}$  pochodzą raczej ze zmian entalpii niż ze zmian entropii.

Ogólnie można sądzić, że duże wartości entalpii przegrupowania cząsteczek wody tworzących klatkę decydują o stabilności struktury drugorzędowej DNA w wodzie. Destabilizujący efekt takich rozpuszczalników jak alkohol etylowy, formamid czy pochodne glikolu etylenowego pochodzi ze zmniejszonych wielkości entalpii tworzenia klatki w tych rozpuszczalnikach.

## V. Elektrostatyczne oddziaływania pomiędzy grupami fosforanowymi

Badanie wpływu jednowartościowych kationów na termiczną stabilność struktury drugorzędowej DNA pozwoliło stwierdzić, że temperatura topnienia DNA ( $T_m$ ) rośnie w przybliżeniu proporcjonalnie ze wzrostem logarytmu stężenia kationu (10, 54). Współczynnik temperaturowy  $\frac{dT_m}{d \log M}$  waha się w zakresie  $15-20^\circ\text{C}$ . Zmiany siły jonowej zmieniają również w istotny sposób właściwości hydrodynamiczne roztworów DNA. Wraz ze zmniejszeniem się siły jonowej od  $0,15\text{M}$  do  $0,0002\text{M}$  *Frisman* i wsp. (17) obserwowali zwiększenie się wartości lepkości istotnej ( $\eta$ ) DNA od wartości  $(\eta) \times 10^{-2} = 70$  dla  $0,15\text{M}$  NaCl do  $(\eta) \times 10^{-2} = 1100$  dla roztworu DNA w  $0,0002\text{M}$  NaCl. Działanie stabilizujące kationów polega głównie na ekranowaniu ujemnych reszt fosforanowych i zmniejszeniu tym samym swobodnej energii elektrostatycznej kulombowskiego oddziaływania między łańcuchami polinukleotydów (10, 11, 34, 37, 39, 54). W niskich siłach jonowych cząsteczki DNA są rozciągnięte w wyniku odpychania ujemnie naładowanych reszt fosforanowych (11) i stosunkowo łatwo ulegają wówczas denaturacji (37). W miarę wzrostu elektrostatycznego osłaniania ujemnie naładowanych grup przez kationy, cząsteczki DNA przyjmują pofałdowaną, bardziej termodynamicznie prawdopodobną konfigurację (11). Wydaje się, że tego typu zjawisko obserwował *Inman* (30), który stwierdził, że długość cząsteczek DNA faga mierzona w mikroskopie elektronowym zależy od siły jonowej roztworu, z którego nanoszono preparaty na film z cytochromu. Długość cząsteczki DNA nanoszonej z wody wynosiła  $17,2\mu$ , podczas gdy preparaty DNA nanoszone z fazy zawierającej  $0,1\text{M}$  octanu sodu lub  $0,1\text{M}$  NaCl wykazywały odpo-

wiednio 13,6 i 10,8  $\mu$ . O podobnych spostrzeżeniach donieśli również L a n g i wsp. (35).

Podstawy teoretyczne elektrostatycznych oddziaływań jonów ze zjonizowanymi grupami polielektrolitów wywodzą się z klasycznej teorii Debye'a i Huckela. Obliczyli oni potencjał  $\Psi$  wokół ładunku punktowego w przypadku istnienia atmosfery jonowej.

Z równania wyrażającego zależność między  $\psi$  a gęstością ładunku (równanie 3):

$$\Delta\psi = -\frac{4\pi}{D} \rho\psi \quad 3$$

gdzie:  $\Delta$  — oznacza operator Laplace'a,  $D$  — stałą dielektryczną,  $\rho$  — gęstość ładunku, można otrzymać podstawowe równanie Debye'a i Huckela zwane również równaniem Boltzmanna-Poissona. Rozwiązaniem również jest szereg, z którego Debye i Huckel uwzględnili dwa pierwsze wyrazy (równanie 4):

$$\psi = -\frac{ez_1}{D} \kappa \quad 4$$

gdzie:  $\kappa = \left[ \frac{4\pi e^2}{DkT} \sum n_i z_i^2 \right]^{1/2}$ ;  $e$  — ładunek elementarny;  $n_i$  — stężenie jonów w 1  $\text{cm}^3$ ;  $z_i$  — wartościowość jonu.

Kotin (34) traktując DNA jako liniowy polielektrolit, w którym ujemne ładunki reszt fosforanowych są zastąpione przez jeden ciągły ładunek równomiernie rozmieszczony na powierzchni cylindrycznej cząsteczki, określił wielkość energii elektrostatycznej jako  $\Delta F_e = e\psi$  i zależność między  $\Delta F_e$  a siłą jonową ( $M$ ) wyraził w równaniu 5:

$$\frac{e\psi}{kT} = c_1 - c_2 \log M \quad 5$$

gdzie:  $c_1$  i  $c_2$  stałe niezależne od temperatury, równe odpowiednio 0,3 i 0,6.

Bardziej złożony model oddziaływania jonów na ładunki reszt fosforanowych zaproponowali Schildkraut i Lifson (54). W modelu tym ładunki reszt fosforanowych są rozłożone w sposób nieciągły, a  $\psi$  oblicza się jako funkcję odległości między ładunkami na obydwu niciach polinukleotydowych ( $r - r_j$ ) (równanie 6):

$$\psi(r) = \left( \frac{e}{D} \right) \sum_{j=1}^n \exp \left\{ -\kappa |r - r_j| \right\} / |r - r_j| \quad 6$$

Sumowanie przeprowadzono dla 56 grup fosforanowych przyjmując, że oddziaływanie grupy fosforanowej jednej nici na reszty fosforanowe

drugiej nici rozciąga się na odległość 93 Å. Energia elektrostatyczna  $\Delta F_e$  na jeden mol par zasad obliczona według równania (7):

$$\Delta F_e = -\lambda^2 e \psi \quad 7$$

(gdzie  $\lambda$  jest ułamkowym ładunkiem 0,22 elektronów na resztę fosforanową) jest liniową funkcją  $T_m$ . Z nachylenia tej prostej Schildkraut i Lifson (54) obliczyli wartość entalpii ( $\Delta H^0$ ) przejścia spirali w kłębek w wypadku nie występowania oddziaływań elektrostatycznych. Wartość  $\Delta H^0$  wahała się w zakresie 1,5 do 2,8 kcal/mol par zasad i jest zbyt mała w porównaniu z wartością eksperymentalną (8 kcal/mol par zasad).

Dopiero uwzględnienie dalszych wyrazów szeregu będącego rozwiązaniem równania 3 może dać dobrą zgodność teorii z wynikami eksperymentalnymi. W ten sposób Mac Gillivray i Mc Mullen (39) obliczyli swobodną energię elektrostatyczną dla kłębka i spirali, i w rezultacie dla polimeru dAT : dAT otrzymali bardzo dobrą zgodność z wynikami eksperymentalnymi Inman i Baldwin (31).

## VI. Energia swobodna przejścia spirala-kłębek

Wielkość energii swobodnej reakcji przejścia spirala-kłębek jest miarą trwałości jednej z form DNA.

Równanie 8

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S \quad 8$$

odzwierciedla tendencje układu do przejścia w stan o niższej energii oraz w stan mniej uporządkowany.  $\Delta F$ ,  $\Delta H$  i  $\Delta S$  są różnicami odpowiedniej energii swobodnej, entalpii i entropii kłębka i spirali. Jeżeli  $\Delta F > 0$  cząsteczki DNA znajdują się w postaci spiralnej, gdy  $\Delta F < 0$  trwały jest stan kłębka. W temperaturze, w której  $\Delta F = 0$ , forma spiralna i kłębek są w stanie termodynamicznej równowagi. Przyjmuje się, że jest to temperatura topnienia,  $T_m$  (54).  $\Delta F$  można rozbić na składowe zależne i niezależne od siły jonowej (równanie 9):

$$\Delta F = \Delta F_0 + \Delta F_e \quad 9$$

gdzie:  $\Delta F_e$  jest swobodną energią elektrostatyczną kulombowskiego odpychania pomiędzy resztami fosforanowymi, a  $\Delta F_0$  jest sumą pozostałych oddziaływań, które w przybliżeniu nie zależą od siły jonowej. Teoretyczne obliczenia (54, 63) wykazują, że wielkość  $\Delta F_e$  jest ujemna i mieści się w granicach kilkuset kalorii na mol par zasad. W roztworach o sile jonowej zbliżonej do zera  $\Delta F_e \cong -0,4$  kcal/mol par zasad (54).  $\Delta F_e$  zmniejsza się ze wzrostem siły jonowej i w dostatecznie dużych stężeniach elektrolitów można napisać  $\Delta F_e = 0$ . W tych warunkach  $\Delta F = \Delta F_0$ .

Oznaczona wartość  $\Delta F$  wynosi +1 kcal/mol par zasad (63) i dla  $\Delta F_e = 0$ , równa jest sumie energii swobodnych oddziaływań niezależnych od

siły jonowej. Ta niewielka wartość energii swobodnej reakcji przejścia spirala  $\rightarrow$  kłębek warunkuje stabilność spirali DNA w warunkach fizjologicznych a równocześnie umożliwia zmiany strukturalne niezbędne dla procesów replikacji i transkrypcji.

## LITERATURA

1. Bartl P., Boublik M., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 678 (1965).
2. Brahms J., Mommaerts W. F. H. M., *J. Mol. Biol.* **10**, 73 (1964).
3. Bresler S., Wwiedienije w moliekuliarnuju biologiju. Izd. Nauka, Moskwa-Leningrad 1966.
4. Bunville L. G., Geiduschek E. P., Rawitscher M. A., Sturtevant J. M., *Biopolymers* **3**, 213 (1965).
5. Crespi H. L., Katz I. I., *J. Mol. Biol.* **4**, 65 (1962).
6. Crothers D. M., Zimm B. H., *J. Mol. Biol.* **9**, 1 (1964).
7. Depireux I., Williams D., *Nature* **195**, 699 (1962).
8. De Voe H., Tinoco I. Jr., *J. Mol. Biol.* **4**, 500 (1962).
9. De Voe H., Tinoco I. Jr., *J. Mol. Biol.* **4**, 518 (1962).
10. Dove W. F., Davidson N., *J. Mol. Biol.* **5**, 467 (1962).
11. Elyashevich A. M., Ptitsin O. B., *Biofizika* **12**, 581 (1967).
12. Felsenfeld G., Miles H. T., *Ann. Rev. Biochem.* **36**, 407 (1967).
13. Frank H. S., Evans M. W., *J. Chem. Phys.* **13**, 507 (1945).
14. Frank-Kamenetskii M. D., *Wysokomolek. Sojed.* **8**, 958 (1966).
15. Franklin R. E., Gosling R. G., *Nature* **171**, 740 (1953).
16. Frenster J. H., Doniesienie osobiste.
17. Frisman E. V., Tshagina L. V., Vorobyev V. J., Shapiro T. V., *Biochimija* **31**, 1027 (1966).
18. Fuller W., w *Genetic Elements*, red. D. Shugar, Academic Press, Londyn-New York, PWN-Warszawa 1967, str. 17.
19. Geiduschek E. P., *J. Mol. Biol.* **4**, 467 (1962).
20. Gibbs J., Di Marzio E., *J. Chem. Phys.* **30**, 271 (1959).
21. Goel N. S., Montroll E. W., *Biopolymers* **6**, 731 (1968).
22. Gordon D. E., Curnutte B. Jr., Lark K. G., *J. Mol. Biol.* **13**, 571 (1965).
23. Gratzer W. B., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 431 (1960).
24. Hamaguchi K., Geiduschek E. P., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1329 (1962).
25. Hamilton L. D., *Nature* **218**, 633 (1968).
26. Hanlon S., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **23**, 861 (1966).
27. Hearst I. W., Vinograd I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 825 (1961).
28. Helmkamp G. K., Condo N. S., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 27 (1967).
29. Hill T., *J. Chem. Phys.* **30**, 383 (1959).
30. Inman R. B., *J. Mol. Biol.* **25**, 209 (1967).
31. Inman R. B., Baldwin R. L., *J. Mol. Biol.* **5**, 173 (1962).
32. Jacobson B., *Nature* **172**, 666 (1953).
33. Kauzmann W., *Advan. Protein. Chem.* **14**, 1 (1959).
34. Kotin L., *J. Mol. Biol.* **7**, 309 (1963).
35. Lang D., Bujard H., Wolff B., Russel D., *J. Mol. Biol.* **23**, 163 (1967).
36. Lewin S., *J. Theoret. Biol.* **17**, 181 (1967).
37. Lin H. J., Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 66 (1966).
38. Luzzati V., Mathis A., Masson F., Witz J., *J. Mol. Biol.* **10**, 28 (1964).
39. MacGillivray A. D., McMullen A. I., *J. Theoret. Biol.* **19**, 159 (1968).



40. Marmur J., Rownd R., Schildkraut C., *Progress in Nucleic Acid Research* t. 1, 1963, str. 231.
41. Michelson A. M., *The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*, Academic Press, Londyn 1963.
42. Michelson A. M., Monny C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1528 (1966).
43. Michelson M. A., Ulbricht T. L. V., Emerson T. M., Swan R. I., *Nature* **209**, 873 (1966).
44. Némethy G., Steinberg I. Z., Scheraga H. A., *Biopolymers* **1**, 43 (1963).
45. O'Konski C. T., *Electrochemical Soc. Meeting, Symp. on Electrolytic Solutions*, Toronto, Canada 1964, cyt. wg J. L. Kavanau, *Water and Solute-Water Interactions*, San Francisco. Londyn, Amsterdam 1964.
46. Paleček E., *J. Mol. Biol.* **11**, 839 (1965).
47. Pauling L., Corey R. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 164 (1956).
48. Poltev V. I., Sukhorukov B. I., *Biofizika* **12**, 763 (1967).
49. Pouyet G., Jacob M., Daune M., *J. Mol. Biol.* **13**, 817 (1965).
50. Pullman B., Claverie P., Caillet I., *Doniesienie osobiste*.
51. Reich E., Golberg I. H., *Progress in Nucleic Acid Research*, t. 3, 1964, str. 184.
52. Scheit K. H., Cramer F., Franke A., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 4 (1967).
53. Scheraga H. A., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **84**, 608 (1960).
54. Schildkraut C., Lifson S., *Biopolymers*, **3**, 195 (1965).
55. Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P., *J. Mol. Biol.* **4**, 430 (1962).
56. Sinanoğlu O., Abdalnur S., *Photochem. Photobiol.* **3**, 333 (1964).
57. Sinanoğlu O., Abdalnur S., Kestner N., w *Electronic Aspects of Biochemistry*, red. B. Pullman, Academic Press, New York 1964, str. 301.
58. Steiner R. F., Beers R. F., *Polynucleotides*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-Londyn-New York-Princeton, 1961.
59. Subirana A. J., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 13 (1965).
60. Szybalski W., w *Thermobiology*, red. A. H. Rose, Academic Press, Londyn 1967, str. 73.
61. Tikchonenko T. I., Perevertajlo G. A., Dobrov E., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 500 (1963).
62. Wang I. H., *J. Chem. Phys.* **77**, 258 (1955).
63. Warner R. C., w *Informational Macromolecules*, red. H. J. Vogel, Y. Bryson, I. O. Lampen, Academic Press, New York 1963, str. 111.
64. Watson I. D., Crick F. H. C., *Nature* **171**, 737 (1953).
65. Wilkins M. H. F., Stokes A. R., Wilson H. R., *Nature* **171**, 738 (1953).
66. Zimm B. H., *J. Chem. Phys.* **33**, 1349 (1960).



IRENA SZUMIEL \*

## Regulacja translacji genów u zwierząt

### Regulation of Gene Translation in Animals

Recent advances in the studies on the mechanism of regulation of the translation process are reviewed and discussed.

Badania przeprowadzone w ostatnich latach istotnie wzbogaciły wiedzę o procesie translacji genów. Niektóre problemy związane z tymi badaniami omówiono w ostatnich zeszytach *Postępów Biochemii* (20, 26). W toku poznawania mechanizmu translacji coraz większe zainteresowanie zaczęło budzić zagadnienie regulacji tego procesu. Powodem tego był między innymi fakt, że ogólnie przyjęty schemat regulacji biosyntezy białka zaproponowany przez *Jacoba i Monoda* (33), zakładający odwracalne blokowanie transkrypcji genów, nie tłumaczył w wystarczający sposób wyników niektórych doświadczeń, przeprowadzonych zarówno na bakteriach jak i na organizmach wielokomórkowych. Dlatego też wysunięto nowe hipotezy (8, 3, 82), przewidujące, że represja i indukcja genów zachodzi na poziomie ich translacji. W oparciu o takie założenie można wyjaśnić wiele spostrzeżeń z zakresu genetyki bakterii (58). Wydaje się jednak, że u eukariontów, u których procesy transkrypcji i translacji są oddzielone przestrzennie, zwłaszcza zaś u organizmów wielokomórkowych, mechanizmy regulacyjne są bardziej złożone i z pewnością obejmują oba te procesy. W organizmach wielokomórkowych bardzo precyzyjnej regulacji podlegają zarówno rodzaj i ilość cząsteczek poszczególnych białek, jak i szybkość ich syntezy (40). Początkowo sądzono, że na poziomie translacji kontrolowana jest szybkość biosyntezy białka, natomiast proces transkrypcji decyduje o tym, jakie białka i w jakiej ilości zostaną wytworzone. Jednakże wiele danych świadczy o tym, że

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

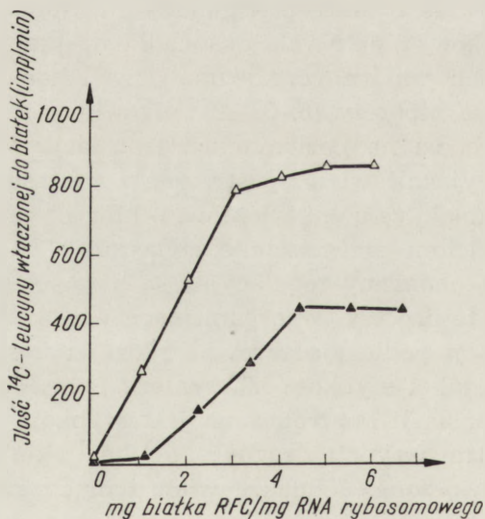
Wykaz stosowanych skrótów: RFC — rozpuszczalna frakcja cytoplazmatyczna, ACPC — kwas 1-aminocyklopentanokarboksylowy.

nie tylko transkrypcja lecz i translacja genów może zachodzić wybiórczo. W niniejszym artykule zostaną omówione wyniki niektórych doświadczeń, na podstawie których sformułowano ostatnio hipotezy dotyczące mechanizmów regulacji procesu translacji genów.

### 1. Regulacja szybkości procesu translacji

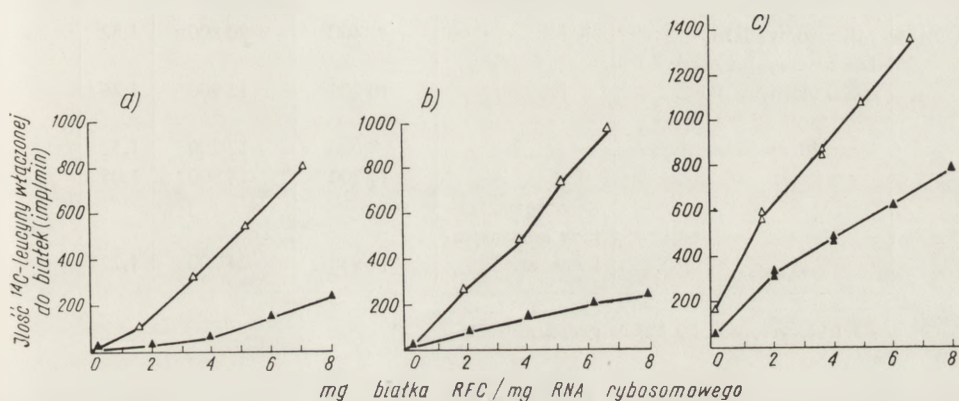
Teoria Jacoba i Monoda zakłada, że w komórce bakteryjnej o szybkości biosyntezy białka decyduje — przy stałej ilości rybosomów — ilość mRNA a zatem reakcja komórki na bodźce zewnętrzne, wywołujące zmiany w ilości produkowanych białek następuje na poziomie transkrypcji. Założenie to jest prawdopodobne wobec stosunkowo niewielkiej złożoności aparatu genetycznego bakterii. Należy się jednak spodziewać, że u zwierząt, ze względu na bogactwo informacji genetycznej, zmiana szybkości biosyntezy białka pod wpływem takich bodźców jak np. wahania stężeń aminokwasów i substratów przemian dostarczających energii może zachodzić niezależnie od ilości mRNA powstającego w jądrze komórkowym.

Świadczą o tym między innymi badania von der Decken (13, 14), która spostrzegła, że zmiana diety z bezbiałkowej, o dużej zawartości węglowodanów, na wysokobiałkową powoduje u szczurów zwiększoną o 60—80% i niezależną od wpływu aktynomycyny D syntezę białek. Zjawisko to można zaobserwować *in vitro* zarówno w preparatach rybosomów jak i mikrosomów; wykazuje ono zależność od ilości rozpuszczalnej frakcji cytoplazmatycznej — RFC — (supernatant po wirowaniu przy 165 000 g) dodanej do układu bezkomórkowego (rysunek 1).



**Rys. 1.** Wpływ zawartości rozpuszczalnej frakcji cytoplazmatycznej (RFC) w układzie bezkomórkowym z wątroby szczura na włączanie <sup>14</sup>C-leucyny do białek wg (15) Szczur hodowany: na diecie wysokobiałkowej — Δ, na diecie bezbiałkowej, węglowodanowej — ▲

Von der Decken (15) oddzieliła niskocząsteczkowe składniki tej frakcji przez sączenie molekularne na żelu *Sephadex G-25*, a następnie zbadała ich wpływ na aktywność rybosomów. Stwierdziła ona, że w regulacji procesu translacji uczestniczą GTP i GSH. Z wykresów zależności biosyntezy białka od stosunku ilości białka RFC do RNA rybosomowego można wywnioskować, że względny wzrost biosyntezy białka pod wpływem GTP w układach bezkomórkowych otrzymanych z wątroby jest większy u szczurów hodowanych na diecie węglowodanowej, bezbiałkowej niż na diecie wysokobiałkowej. Natomiast GSH wyraźniej przyspiesza translację w układzie przygotowanym z wątroby szczurów otrzymujących dietę wysokobiałkową (rysunek 2a, b) zaś jednoczesne dodanie tych związków powoduje w przypadku obu diet znaczne pobudzenie włączania aminokwasów do białek (rysunek 2c)



**Rys. 2.** Wpływ zawartości rozpuszczalnej frakcji cytoplazmatycznej (RFC) poddanej sączeniu molekularnemu, oraz GTP i GSH na włączanie  $^{14}\text{C}$ -leucyny do białek w układzie bezkomórkowym z wątroby szczura wg (15)

Szczur hodowany: na diecie wysokobiałkowej —  $\Delta$ , na diecie bezbiałkowej, węglowodanowej —  $\blacktriangle$

a — układ bez dodatków, b — układ z dodatkiem 10 mM GSH, c — układ z dodatkiem 10 mM GSH i 0,1 mM GTP

Zwiększenie stężenia GTP do 0,5mM nie zmieniło przebiegu obserwowanych zjawisk a ilość  $^{14}\text{C}$ -leucyny włączanej do białek była niższa w układzie przygotowanym z wątroby szczura hodowanego na diecie bezbiałkowej. Poddanie sączeniu molekularnemu frakcji mikrosomowej powodowało obniżenie włączania aminokwasów o 30—40% w przypadku układu z wątroby szczurów hodowlanych na diecie wysokobiałkowej, natomiast w bardzo niewielkim stopniu wpływało na aktywność układu z wątroby szczurów będących na diecie węglowodanowej. Sugerowałoby to istnienie w mikrosomach szczurów otrzymujących pożywienie białkowe jakiegoś czynnika aktywującego proces translacji. Dodanie do układu GTP łącznie

z mieszanią aminokwasów powoduje w przypadku obu diet zwiększenie syntezy do poziomu wyższego niż w układzie, którego składników nie poddawano sączeniu molekularnemu (tablica 1)

Tablica 1

Włączanie  $^{14}\text{C}$ -leucyny do białek w układzie bezkomórkowym z wątroby szczurów hodowanych na diecie węglowodanowej — bezbiałkowej (A) i wysokobiałkowej (B) wg (15)

Składniki układu	Dodatek GTP do układu	Włączanie $^{14}\text{C}$ -leucyny imp/min/100 mg RNA mikroskopowego		B/A
		A	B	
Mikrosomy, RFC*	+ lub -	11 400	20 800	1,82
Mikrosomy po sączeniu molekularnym, RFC	+ lub -	10 200	12 900	1,26
Mikrosomy i RFC po sączeniu molekularnym	-	8 000	12 200	1,52
	+	14 200	14 900	1,05
	+ oraz miesza- nina aminokwa- skwasów	19 800	24 200	1,22

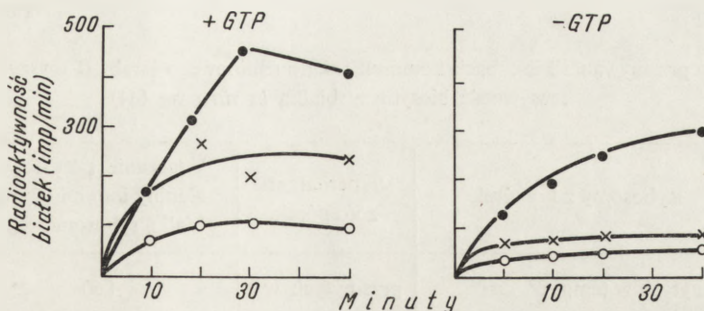
\* RFC—rozpuszczalna frakcja cytoplazmatyczna

Wyniki zawarte w tablicy 1 świadczą, że GTP jest nie tylko źródłem energii zużywanej w procesie translacji, ale również jego regulatorem. Sugerują one, że stosując sączenie molekularne RFC i dodatek GTP można zmienić wydajność procesu translacji *in vitro*, określoną w komórkach przez rodzaj diety.

Jak już wspomniano uprzednio, von der Decken uzyskała takie same wyniki dla mikrosomów jak i dla rybosomów. Można zatem przypuszczać, że badane przez nią czynniki regulujące są składnikami rozpuszczalnej frakcji cytoplazmatycznej.

Doświadczenia wykonane w pracowni Hoaglanda świadczą o występowaniu czynnika regulującego szybkość procesu translacji również w retikulum endoplazmatycznym. Czynnikiem ten wykryto, porównując intensywność biosyntezy białka w normalnej i regenerującej wątrobie szczura (31); okazało się, że po usunięciu części wątroby następuje zwiększenie syntezy białka, mimo że liczba i rozmieszczenie polirybosomów nie zmieniają się w porównaniu z normalną wątrobą, przy czym zwiększenie to obserwuje się tylko w polirybosomach związanych z retikulum endoplazmatycznym, a zatem w tych, które w nienaruszonej komórce wytwarzają

białko (28,29). Nasunęło to przypuszczenie, że w retikulum zawarty jest inhibitor, którego aktywność zanika w regenerującej wątrobie (rysunek 3).



Rys. 3. Biosynteza białka w układach bezkomórkowych z wątroby szczura z dodatkiem i bez dodatku GTP wg (31)

a) układ z wątroby normalnej — ●, b) układ z wątroby regenerującej — ○, x — układy a i b zmieszane w stosunku 1 : 1

Wykryty przez Hoaglanda inhibitor ma charakter lipoproteidu, czynnego w obecności GSSG. Ulega on inaktywacji pod wpływem związków z grupą-SH, a jak widać na rysunku 3 GTP częściowo znosi jego wpływ na translację. Hoagland przypuszcza, że w normalnych komórkach wątroby czynnik ten zmniejsza szybkość odczytywania informacji genetycznej oddziałując na enzymy przenoszące reszty aminoacylowe z tRNA na wydłużający się łańcuch peptydowy. Z dalszych badań grupy Hoaglanda (70) wynika, że wzrost szybkości syntezy białka obserwowany *in vitro* w regenerującej wątrobie, a poprzedzający wzmożoną syntezę RNA spowodowany jest z jednej strony niższą aktywnością inhibitora lipoproteidowego, z drugiej zaś strony zmniejszonym uwalnianiem przez lizosomy enzymów litycznych, które mogą rozkładać składniki rybosomów. O ile wydaje się prawdopodobne, że inhibitor lipoproteidowy działa również *in vivo* i stanowi składnik systemu regulującego ogólną szybkość biosyntezy białka na poziomie translacji, to trudno jest na podstawie dotychczas uzyskanych badań ocenić wpływ hydrolaz lizosomowych na ten proces *in vivo*.

Zmiany zdolności rybosomów do włączania znakowanych aminokwasów do białek w układach bezkomórkowych obserwowali również K e r r, C o h e n i W o r k (34). Wykazali oni, że układ bezkomórkowy zawierający rybosomy i supernatant z komórek raka puchlinowego Krebs II myszy syntetyzuje białko z różną intensywnością, zależnie od sposobu przemywania i warunków inkubacji komórek przed przygotowaniem układu.

Przemycie komórek zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej w temperaturze pokojowej powoduje 2—3-krotne obniżenie aktywności układu syntetyzującego białko w porównaniu z układem otrzymany

z komórek przemywanych tym samym roztworem w temperaturze 0°. Jak wynika z danych zestawionych w tablicy 2 jest to spowodowane zmianą aktywności rybosomów.

Tablica 2

Wpływ przemywania i inkubacji komórek raka puchlinowego Krebs II myszy na intensywność biosyntezy białka *in vitro* wg (34)

Rybosomy z komórek	Supernatant z komórek	Włączenie L- <sup>14</sup> C-fenylalaniny imp/min/2 mg białka rybosomowego
przemytych w temp. 0°	przemytych w temp. 0°	860
„	przemytych w temp. pokojowej	870
przemytych w temp. pokojowej	„	358
przemytych w temp. pokojowej i inkubowanych w pożywce Earle'a 37° 20 min.	przemytych w temp. 0°	750
jak wyżej bez glukozy	„	295

Jednakże niekorzystny wpływ przemywania komórek w temperaturze pokojowej można znieść przez następne inkubowanie ich w 37° przez co najmniej 20 minut w pożywce Earle'a a zatem w środowisku zawierającym 0,2% glukozy. Inkubacja w tejże pożywce pozbawionej glukozy nie przywraca aktywności rybosomów.

Intensywna przemiana glukozy dodanej do środowiska mogłaby pośrednio powodować między innymi zwiększenie stężenia GTP w komórce, a związek ten zgodnie z wynikami doświadczeń von der Decken i Hoglanda wywierałby wpływ na szybkość translacji. Przypuszczenie to wymaga jednak potwierdzenia w toku bardziej szczegółowych badań.

Kerr, Cohen i Work (34) wyjaśnili, że zmiany w aktywności układu syntetyzującego białko w tym doświadczeniu nie są wywołane zmianami ilości mRNA w komórkach, ponieważ dodanie aktynomycyny D do inkubowanej mieszaniny nie wpływało na przebieg biosyntezy. Ponadto taka sama była ilość mRNA ekstrahowanego z rybosomów aktywnych i nieaktywnych, oznaczana na podstawie pobudzenia włączenia L-<sup>14</sup>C-leucyny do białka w układzie bezkomórkowym z retikulocytów królika. Nie stwierdzono też degradacji mRNA pochodzącego z komórek przemywanych w temperaturze pokojowej.

Omówione tu dane zaczerpnięte z trzech prac wykonanych w różnych układach doświadczalnych prowadzą do wspólnego wniosku, że kompleks mRNA-rybosom może występować w postaci aktywnej lub nieaktywnej, a aktywacja jego zależy między innymi od zasobów energetycznych komórki.



## 2. Wpływ hormonów na translację genów

Wydaje się obecnie, że działanie hormonu na komórkę polega na odblokowaniu części jej genomu a zatem spowodowaniu syntezy nowych rybosomów oraz nowych rodzajów mRNA, a następnie odpowiadających im białek (84). Jednakże coraz więcej danych wskazuje, że wpływ taki nie jest wywierany bezpośrednio oraz, że nie jest to jedyny sposób działania hormonów (27, 40, 84); wiele spośród nich zwiększa włączanie znakowanych aminokwasów do białek *in vitro* nawet po dodaniu aktynomycyny D w stężeniu wystarczającym do całkowitego zahamowania syntezy RNA. Oznacza to, że wzmożona synteza białek następuje z wykorzystaniem mRNA wytworzonego już przed wniknięciem hormonu do komórki. Zjawisko to stwierdzono między innymi dla hormonu wzrostowego (53), ACTH (19), hormonu luteinizującego (22), insuliny (17) i hormonów tarczycy (41, 73, 74, 75, 76). Można zatem przypuszczać, że hormony wywierają wpływ zarówno na proces transkrypcji jak i translacji.

Dla badań nad regulacją procesu translacji interesujące są zwłaszcza wyniki doświadczeń prowadzonych nad 4 hormonami: insuliną, hormonem wzrostowym, estradiolem i hydrokortizonem.

Wpływ insuliny na przebieg translacji jest szczególnie wyraźny. Ilustrują to wyniki pracy Woola i Moyera (92) w pełni potwierdzające wnioski Eboué-Bonisa i wsp. (17). Jak wynika z danych zestawionych w tablicy 3, wzrost syntezy białka w izolowanej przeponie szczura pod wpływem insuliny jest w niewielkim tylko stopniu hamowany przez aktynomycynę D. Wool i Cavicchi (90) stwierdzili też, że puromycyna lub cykloheksimid mogą całkowicie znieść wpływ insuliny na włączanie tRNA-<sup>14</sup>C-fenylalaniny do białek.

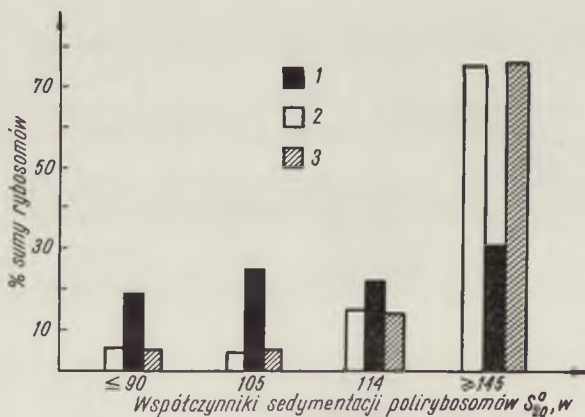
Tablica 3

Wpływ aktynomycyny D i insuliny na włączanie <sup>14</sup>C-glicyny do białek izolowanej przepony szczura wg (92)

Dodane do środowiska inkubacji	Radioaktywność białek imp/min/mg	Zahamowanie aktynomycyną %	Pobudzenie insuliną %
—	159 ± 9,1		
Insulina	235 ± 6,3		48
Aktynomycyna	83 ± 5,0	47	
Aktynomycyna + insulina	117 ± 3,9		41

Po stwierdzeniu wpływu insuliny na translację Wool i Cavicchi (90) próbowali spowodować zwiększenie syntezy białka za pomocą insuliny w układzie bezkomórkowym; pobudzenie tej syntezy obserwuje się jednak tylko wtedy gdy hormon działa na całe, nieuszkodzone komórki. Nasuwa się oczywiście — przez analogię z omówioną już pracą Kerra i wsp. (34) — wniosek, że insulina pobudza biosyntezę białka w następstwie oddziaływania na transport glukozy i aminokwasów. Jednakże okazało się, że wpływ insuliny na biosyntezę białka nie jest zależny od zwiększonego transportu tych związków do wnętrza komórki (49, 71, 89, 91). Wool i Cavicchi (90) przypuszczają zatem, że w ciągu kilku minut po podaniu insuliny powoduje syntezę jakiegoś białka, które spełnia rolę właściwego czynnika regulującego proces translacji. Takie wyjaśnienie wymaga przyjęcia możliwości swoistego i odwracalnego blokowania translacji odpowiednich cząsteczek mRNA, skoro aktynowymcyna D nie znosi działania hormonu na syntezę białka, jednakże założenie to nie tłumaczy, dlaczego odblokowanie mRNA pod wpływem insuliny może mieć miejsce tylko w nienaruszonej komórce.

Nieco światła na rolę hipotetycznego białka powstającego pod wpływem insuliny rzucają dalsze badania grupy Woola (83). Badacze tej grupy zwrócili uwagę na fakt, że w mięśniach szkieletowych szczurów, u których wywołano cukrzycę alloxanową znajduje się znacznie mniej dużych polirybosomów, a więcej małych — niż u zwierząt zdrowych. Podobne skutki wywołuje 96-godzinne głodzenie a także podanie cykloheksimidu. Normalną ilość dużych polirybosomów można przywrócić wstrzykując zwierzętom cukrzycowym insulinę, natomiast jednoczesne podanie insuliny i cykloheksimidu nie powoduje powrotu do stanu normalnego. Obserwacje te ilustruje rysunek 4.



Rys. 4. Współczynniki sedymentacji polirybosomów z mięśni szkieletowych szczura wg danych z (83)

1 — szczury normalne, 2 — z cukrzycą alloxanową, 3 — z cukrzycą alloxanową po podaniu insuliny

Okazało się również (61), że rybosomy z mięśnia sercowego szczurów z cukrzycą alloksanową mają zmniejszoną zdolność translacji kwasu poliurydylowego w porównaniu z rybosomami otrzymanymi z serc zdrowych zwierząt. Podanie insuliny szczurom cukrzycowym przywraca rybosomom normalną aktywność. Wydaje się zatem, że brak insuliny pozbawia komórki czynnika niezbędnego do przyłączenia mRNA przez rybosomy. Następstwem tego jest rozpad polirybosomów na mono-, di- i trimery, co z kolei powoduje zmniejszenie szybkości translacji. Jak wynika z badań S c h w a r t z a i A m o s a (69) insulina zmienia aktywność rybosomów nie tylko w mięśniach szkieletowych: w komórkach zarodka kurzego hodowanych w samej tylko pożywce Eagle'a bez surowicy, synteza białka ulega zahamowaniu, jednakże nie obserwowano przy tym rozpadu polirybosomów (72). Dodaniem insuliny można syntezę białka pobudzić, jakkolwiek w mniejszym stopniu niż przez dodanie 3% surowicy. Z doświadczenia tego, którego rezultaty zestawiono w tablicy 4 wynika zatem,

Tablica 4

Wpływ insuliny na aktywność rybosomów w układach bezkomórkowych otrzymanych z fibroblastów zarodka kurzego wg (69)

Układ z komórek hodowanych w:	RNA informacyjny	Włączanie $^{14}\text{C}$ -fenyloalaniny imp/min/200 $\mu\text{g}$ RNA rybosomowego		
1. pożywce Eagle'a	endogenny	113 $\pm$ 9	129 $\pm$ 13	115 $\pm$ 6
	poli U	139 $\pm$ 7	184 $\pm$ 11	147 $\pm$ 6
2. pożywce Eagle'a z dodatkiem insuliny	endogenny	156 $\pm$ 3	204 $\pm$ 9	158 $\pm$ 10
	poli U	236 $\pm$ 22	310 $\pm$ 9	272 $\pm$ 33
3. pożywce Eagle'a z dodatkiem 3% surowicy	endogenny	239 $\pm$ 15	321 $\pm$ 26	204 $\pm$ 1
	poli U	385 $\pm$ 15	525 $\pm$ 22	375 $\pm$ 17

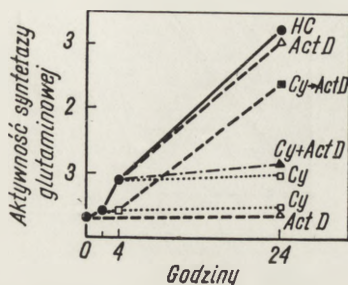
że oprócz insuliny na aktywność rybosomów wpływają również jakieś niezidentyfikowane składniki surowicy, być może inne hormony. Prawdopodobnie jednym z nich mógłby być hormon wzrostowy, bowiem K o r n e r (35, 36) stwierdził zmniejszoną zdolność do syntezy białka *in vitro* w przypadku rybosomów z wątroby szczurów, którym usunięto przysadkę mózgową. Dalsze jego badania (37) wykazały, że wątroba takich szczurów zawiera mniej polirybosomów, a więcej pojedynczych rybosomów niż wątroba szczurów kontrolnych. Zjawiska tego nie można przypisać wyłącznie zmniejszeniu syntezy mRNA, ponieważ obserwowano je również po podaniu aktynomycyny D (37, 38 39). K o r n e r (40) stwierdził również mniejsze włączanie  $^{14}\text{C}$ -lizyny po dodaniu kwasu poliadenylowego do układu bezkomórkowego z wątroby szczurów pozbawionych przysadki w porównaniu ze szczurami, którym podawano hormon wzrostowy, można

zatem sądzić, że hormon ten — podobnie jak insulina — wpływa na zdolność rybosomów do przyłączania mRNA i odczytywania zawartej w nim informacji genetycznej. Zmniejszoną zdolność rybosomów do przeprowadzenia translacji można przywrócić dodając duży nadmiar supernatantu otrzymanego po odwirowaniu rybosomów (40); fakt ten potwierdza wnioski von der Decken (15) co do wpływu rozpuszczalnych składników cytoplazmatycznych na przebieg translacji. Nie stwierdzono, czy obserwowana po dodaniu omówionych hormonów wzmożona synteza białek *in vitro* poprzedzająca syntezę RNA jest wynikiem translacji wszystkich dostępnych rodzajów mRNA, czy też tylko niektórych spośród nich. Ponieważ jednak hormony wywołują często swoiste zmiany fizjologiczne w poszczególnych tkankach wcześniej niż indukcję nowych enzymów, można się spodziewać, że obserwowane zmiany są następstwem wpływu na translację tylko niektórych rodzajów mRNA. Nie wyklucza to oddziaływania hormonów na ogólną szybkość translacji.

O możliwości wywierania przez niektóre hormony wybiórczego wpływu na translację świadczą wyniki doświadczeń Grubera (25), który badał wpływ  $^{17}\beta$ -estradiolu na biosyntezę fosfowityny — składnika żółtka jaja kurzego. Jest to białko powstające w wątrobie niosących się kur. Podanie estradiolu może spowodować syntezę fosfowityny w wątrobie koguta. Po upływie około 20 godzin od chwili wstrzyknięcia hormonu fosfowityna pojawia się w osoczu koguta i ilość jej rośnie przez 60 godzin aż do osiągnięcia wartości maksymalnej, wprost proporcjonalnej do dawki estradiolu, a następnie spada. Nie obserwuje się jednocześnie zmian zawartości innych białek osocza. Podanie aktynomycyny D nie później niż w 8 godzin po wstrzyknięciu hormonu całkowicie hamuje syntezę fosfowityny. Oznacza to, że hormon powoduje w wątrobie koguta transkrypcję mRNA odpowiadającego temu białku. Jeżeli jednak w 100 godzin po pierwszej porcji estradiolu wstrzyknąć drugą — zachodzi ponowny wzrost ilości fosfowityny w osoczu przy czym następuje on znacznie szybciej niż poprzednio i tym razem jest niezależny od podania aktynomycyny D. Sugeruje to, że druga porcja estradiolu działa na poziomie translacji powodując wybiórcze odblokowanie mRNA odpowiadającego fosfowitynie.

Niedawno opublikowana praca Moscona i wsp. (57) rozpatruje podobny przypadek, w którym wpływ hormonu na translację jest wtórny względem transkrypcji, wywierany pośrednio i wybiórczy względem określonego mRNA. Przedmiotem tej pracy jest indukcja hormonalna syntazy glutaminowej (EC 6.3.1.2) w hodowlach siatkówki z zarodka kurzego. Ilość tego enzymu bardzo szybko wzrasta począwszy od 16 dnia rozwoju zarodka tj. w okresie różnicowania się siatkówki. Wzrost ten a jednocześnie rozpoczęcie różnicowania można spowodować we wcześniejszym etapie rozwoju dodając do pożywki hydrokortyzonu lub innego  $^{11}\beta$ -hydroksykortykosterydu. Moscona i wsp. (57) badając ten proces stwierdzili, że zachodzi on następująco. W pierwszym etapie indukcji następuje synte-

za trwałego mRNA, najprawdopodobniej odpowiadającego syntetazie glutaminowej a zatem hormon działa na proces transkrypcji. Jak widać na rysunku 5 — w czasie pierwszych czterech godzin po podaniu hormonu aktynomycyna D hamuje syntezę enzymu, zaś cykloheksimid w tym samym czasie nie wywiera jeszcze żadnego wpływu na ten proces. Następnie — po upływie 4 godzin — zachodzi synteza enzymu z wykorzystaniem nagromadzonego zapasu mRNA, hamowana przez cykloheksimid. Synteza ta pozostaje pod kontrolą 2 czynników — najprawdopodobniej białkowych, gdyż ich działanie zależne jest od syntezy RNA wykazującej różną wrażliwość na aktynomycynę D. Są nimi:



**Rys. 5.** Indukcja syntetazy glutaminowej w hodowli siatkówki zarodka kurzego pod wpływem hydrokortyzonu wg (57)

Act D — w obecności 10  $\mu\text{g/ml}$  aktynomycyny D, Cy — w obecności 2  $\mu\text{g/ml}$  cykloheksimidu, Cy  $\rightarrow$  Act D — w hodowli, do której dodano cykloheksimid w czasie 0 a po upływie 4 godzin przeniesiono tkankę do pożywki z aktynomycyną D, HC — w hodowli kontrolnej

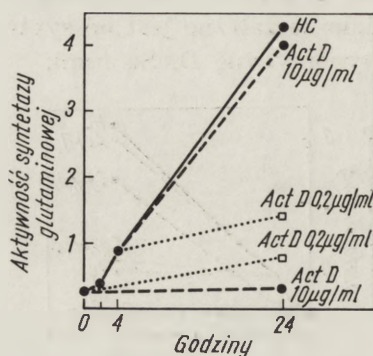
- 1) represor translacji mRNA syntetazy (lub represor degradacji tego enzymu, jeśli przyjąć, że wzrost ilości enzymu spowodowany jest zmniejszeniem szybkości jego rozpadu); tworzenie represora można zatrzymać dużym stężeniem aktynomycyny D.
- 2) derepresor działający przeciwnie niż represor, wrażliwy na niskie stężenie aktynomycyny D.

Dodanie dużej ilości aktynomycyny D do hodowli 4-godzinnej hamuje syntezę całego RNA, a zatem również RNA represora. W tej sytuacji synteza enzymu zachodzi normalnie, gdyż odpowiadający mu mRNA powstał już wcześniej (rysunek 6).

Natomiast podana w tym samym czasie aktynomycyna D nie blokuje syntezy RNA represora, hamuje zaś syntezę RNA derepresora i w ten sposób zatrzymuje również syntezę enzymu. Jak widać na rysunku 6, oba antybiotyki podane w czasie zero znoszą efekt działania hormonu.

W obu rozpatrywanych przypadkach — estradiolu i hydrokortyzonu — wybiórczość wpływu hormonu na translację jest oczywista, jednakże efekt ten jest poprzedzony transkrypcją genów odpowiadających indukowanemu białkom. W przypadku syntetazy glutaminowej — hormonalna indukcja białka enzymatycznego pociąga za sobą wytworzenie białek regulujących wybiórczo jego syntezę na rybosomach a zatem jest to niewątpliwie re-

gulacja pośrednia. Natomiast mechanizm wpływu estradiolu na translację mRNA fosfowityny nie został wyjaśniony. Biorąc pod uwagę szybkość pojawiania się fosfowityny po drugiej dawce estradiolu, można sądzić, że hormon ten działa np. jako efektor allosteryczny specyficznego białka regulującego translację mRNA fosfowityny, przy czym uprzednio indukowałby on syntezę mRNA zarówno dla fosfowityny jak i dla białka regulującego.



**Rys. 6.** Wpływ niskiego i wysokiego stężenia aktynomycyny D na aktywność syntetazy glutaminowej indukowanej hydrokortyzonem w hodowlach siatkówki zarodka kurzego wg (57)

Act D — hodowla z aktynomycyną; antybiotyk podawano w czasie 0, lub 4 godz., HC — hodowla kontrolna

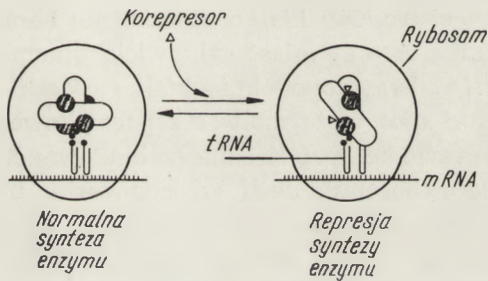
Na podstawie dotychczas uzyskanych danych trudno powiedzieć, czy oddziaływanie hormonu na translację jest zawsze wtórne tj. poprzedzone pobudzeniem transkrypcji określonych genów, odpowiadających białkom o charakterze swoistych regulatorów translacji lub niespecyficznym czynnikom zwiększających ogólną intensywność translacji. Szybkie pobudzenie biosyntezy białka przez niektóre hormony, np. insulinę i tyroksynę, poprzedzające uchwytyny wzrost syntezy RNA informacyjnego i rybosomowego jest zdaniem niektórych autorów (72) dowodem bądź bezpośredniego zwiększenia aktywności rybosomów, bądź też wybiórczego oddziaływania na mRNA, którego translacja nie zachodzi przy braku odpowiedniego hormonu. Każdy z wymienionych poglądów jest uzasadniony wynikami kilku doświadczeń. Konieczne są zatem bardziej wnikliwe badania, mogące wykazać, który z postulowanych obecnie mechanizmów działania hormonów na translację jest prawdziwy.

### 3. Niektóre teorie regulacji translacji

Omówione poprzednio doświadczenie Grubera (25) wykazujące wpływ estradiolu na translację mRNA dla fosfowityny stanowiło jeden z argumentów na korzyść jego teorii przyjmującej, że szybkość translacji jest regulowana przez odłączanie się gotowych cząsteczek białkowych od

rybosomów. W procesie tym współdziałałyby specyficzne dla poszczególnych białek czynniki (np. hapteny, hormony), które powodowałyby przyłączenie przez cząsteczki białkowe konformacji umożliwiającej uwolnienie ich z kompleksu z rybosomem.

Podobne założenie przyjęli Cline i Bock (11) w opublikowanej niezależnie od Grubera, choć niemal jednocześnie z nim, teorii regulacji translacji genów za pośrednictwem zmian konformacji rosnącego łańcucha peptydowego. Autorzy ci uważają, że łańcuch taki zwija się stopniowo w sposób określony sekwencją aminokwasową, przybierając następnie kształt kolidujący z przyłączeniem dalszych cząsteczek aminoacylo-tRNA lub przesuwaniem mRNA względem rybosomu, albo też w przypadku gotowej cząsteczki białka — z jej odłączeniem od rybosomu. Rola czynników regulujących biosyntezę danego białka polegałaby zatem na takiej modyfikacji konformacji łańcucha peptydowego, która bądź zatrzymywałaby bądź przeciwnie — umożliwiała kontynuowanie translacji i odłączenie gotowej cząsteczki. W ten sposób represja lub indukcja syntezy w przypadku enzymu odbywałaby się na poziomie translacji na zasadzie oddziaływania allosterycznego między syntetyzowaną cząsteczką enzymu a substratem, analogiem substratu lub metabolitem innej przemiany enzymatycznej i białkiem regulatorowym. Przykład represji syntezy enzymu przedstawiono na schemacie 1.



**Schemat 1.** Schemat reakcji syntezy enzymu wg (11)

Białe pałeczki — podjednostki katalityczne enzymu, czarne kółka — podjednostki białka regulatorowego, trójkąt — cząsteczki korepresora

Oddziaływanie allosteryczne powoduje w myśl tego schematu zmianę konformacji podjednostek, która przeszkadza przyłączeniu kolejnego aminoacylo-tRNA wskutek zawady przestrzennej.

Cline i Bock przypuszczają, że u bakterii za pośrednictwem translacji regulowana jest transkrypcja w sposób zaproponowany przez Stenta (82). Na poparcie przedstawionej hipotezy przytaczają oni wiele prac doświadczalnych z dziedziny genetyki bakterii, uważają jednak, że u zwierząt regulacja syntezy białka zachodzi na poziomie translacji, jakkolwiek w sposób bardziej złożony; transkrypcja części genów jest blokowana trwale lub okresowo — zależnie od rodzaju komórki, natomiast bardziej

specyficzne i precyzyjne oddziaływanie mechanizmów regulacyjnych na syntezę białek odpowiadających transkrybowanym genom zachodzi w czasie ich translacji.

Teoria Cline'a i Bocka usuwa bardzo jasno i logicznie wiele wątpliwości jakie wynikały z konfrontacji hipotezy Jacoba i Monoda z danymi doświadczalnymi. Zwłaszcza zaś rozwiązuje w prosty sposób problem wpływu represorów na biosyntezę białek, zakłada bowiem wspólne czynniki regulujące na zasadzie sprzężenia zwrotnego aktywność enzymu oraz jego syntezę.

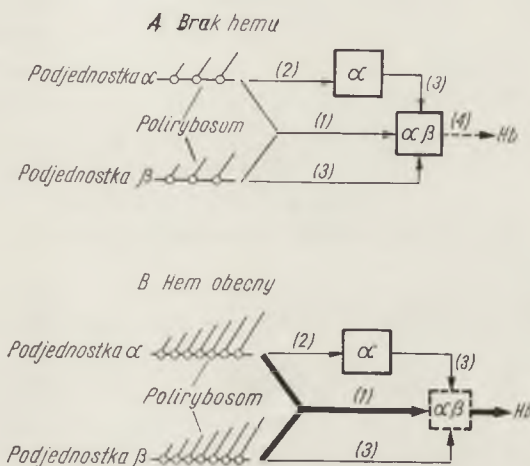
Jakkolwiek niedawna publikacja M o s e s a i Y u d k i n a (58) zdaje się świadczyć o tym, że represja enzymów *E. coli* przez katabolity zachodzi na poziomie translacji, to brak jest prac doświadczalnych przeprowadzonych na mikroorganizmach a bezpośrednio potwierdzających tę teorię. Niemniej jednak porównanie wyników pracy L o d i s h a (45) dotyczącej regulacji translacji RNA fagowego z postulatami Cline'a i Bocka jest bardzo interesujące.

RNA bakteriofaga  $f_2$  badany przez Lodisha jest jednoniciowy i zawiera począwszy od końca 5' kolejno informację o strukturze 3 białek: białka otoczki, które jest głównym składnikiem białkowym faga, tzw. białka A (synonim ang. *maturation protein*) oraz polimerazy RNA. Zapoczątkowanie syntezy pierwszych dwóch białek może odbywać się niezależnie; Lodish stwierdził jednak następującą zależność między translacją poszczególnych cistronów: białko otoczki nie hamuje własnej syntezy ani syntezy białka A, natomiast całkowicie uniemożliwia translację genu polimerazy RNA. Prawdopodobnie białko otoczki przyłącza się do RNA fagowego w taki sposób, że miejsce zapoczątkowania translacji polimerazy nie jest wprawdzie bezpośrednio zablokowane, niemniej jednak jest niedostępne dla rybosomu. Jeśli w środowisku nie ma cząsteczek białka otoczki, to zapoczątkowanie translacji genu polimerazy RNA zachodzi tylko po powstaniu co najmniej sześćoaminokwasowego fragmentu białka otoczki. Lodish sugeruje, że synteza białek fagowych regulowana jest przez zmiany konformacji RNA faga pod wpływem odwracalnego tworzenia kompleksu RNA-białko otoczki a także w czasie translacji genu odpowiadającego temu białku. Przypuszczenie to potwierdza fakt, że odszczepienie części RNA od strony 5' umożliwia dostęp rybosomów do miejsca zapoczątkowania translacji genu polimerazy RNA.

Doświadczenie Lodisha świadczy, że postulowana przez Cline'a i Bocka regulacja translacji genów jednych białek przez cząsteczki innych białek ma istotnie miejsce, jakkolwiek odwracalnemu blokowaniu podlega raczej proces inicjacji, a nie zakończenie syntezy łańcucha peptydowego. Jest to argument przemawiający za regulacją inicjacji, co nie wyklucza, że kontroli podlegają również dalsze etapy translacji. Nasuwa się zatem pytanie, w jakim stopniu omawiana teoria może wytłumaczyć wyniki badań nad biosyntezą białka u zwierząt. Cline i Bock na poparcie swojej



teorii przytaczają prócz wyników doświadczeń nad mikroorganizmami także rezultaty prac na temat biosyntezy hemoglobiny. Mianowicie stwierdzono, że hem pobudza syntezę globiny oraz tworzenie polirybosomów w retikulocytach (9, 23, 24, 44). W związku z tym Grayzel i wsp. (23) oraz Gribble i Schwartz (24) wysunęli przypuszczenie, że działanie hemu polega na uwalnianiu gotowych cząsteczek globiny z rybosomów. Potwierdzałyby to hipotezę Cline'a i Bocka. Jednakże ostatnia praca Tavilla, Grayzela i wsp. (85) świadczy o tym, że hem wpływa na conajmniej trzy etapy syntezy hemoglobiny: tworzenie polirybosomów, połączenie łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  w dimer z pominięciem puli łańcucha  $\alpha$ , który syntetyzowany jest w nadmiarze (droga 1 na schemacie 2) oraz przekształcenie dimerów  $\alpha\beta$  w tetramery (droga 4 na schemacie 2).



**Schemat 2.** Przebieg syntezy hemoglobiny w retikulocytach królika wg (85)

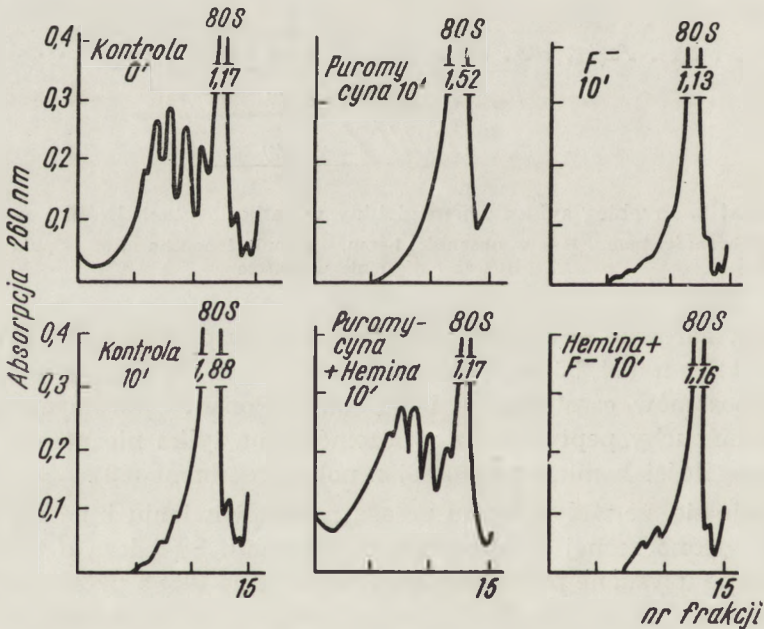
A — w nieobecności hemu, B — w obecności hemu,  $\alpha$  — pula łańcucha  $\alpha$ ,  $\alpha\beta$  — pula dimeru  $\alpha\beta$   
Bliższe omówienie w tekście

Natomiast zarówno Tavill, Grayzel i wsp. (85) jak i Zucker i Schulman (94, 95) stwierdzili, że brak hemu nie hamuje uwalniania się z rybosomów cząsteczek  $\alpha$  i  $\beta$ -globiny. Ponadto puromycyna, która uwalnia łańcuchy peptydowe z rybosomów, ma tylko nieznaczny wpływ na zmianę ilości heminy związanej z polirybosomami (88).

Wydaje się, że wpływ hemu polega na umożliwieniu inicjacji syntezy globiny i jednoczesnej stabilizacji polirybosomu. Świadczą o tym następujące dane uzyskane przez Zuckera i Schulmana (95) a przedstawione na rysunku 7. Jeżeli do układu bezkomórkowego z retikulocytów królików, u których wywołano anemię podawaniem fenylhydrazyny, dodać puromycyny uwalniającej z rybosomów jeszcze nie ukończone łańcuchy peptydowe, to następuje rozpad polirybosomów. Jednoczesne dodanie heminy do układu powoduje, że mimo całkowitego ustania syntezy białka — poli-

rybosomy nie rozpadają się. Natomiast zablokowanie inicjacji przez dodanie do układu NaF pociąga za sobą rozpad polirybosomów niezależnie od tego czy hemina znajduje się w układzie czy też nie.

Te obserwacje oraz omówiony uprzednio wpływ niektórych hormonów na zdolność wiązania mRNA przez rybosomy sugerują, że regulacji podlega proces zapoczątkowania translacji jakkolwiek nie wyklucza to mechanizmu regulacji postulowanego przez Cline'a i Bocka. U mikroorganizmów proces ten badało kilku autorów; czynniki inicjujące (7, 62, 80) niezbędne do wytworzenia połączeń mRNA — podjednostka 30S rybosomu i N-formylometionylo-tRNA-rybosom-mRNA (63, 66) wykazują, jak wynika z doświadczeń prowadzonych w pracowni Boscha (1), pewną specyficzność względem mRNA. Natomiast u zwierząt nie zidentyfikowano jeszcze czynników inicjujących translację, zaś wybiórczość rybosomów względem mRNA stwierdzono badając działanie interferonów, specyficznych gatunkowo białek chroniących komórki zwierzęce przed infekcją wirusową (18). Okazało się, że interferony zapobiegają translacji RNA wirusów, prawdopodobnie indukując syntezę białka, które przyłącza się do rybosomów; powoduje to, że rybosomy komórek inkubowanych w roztworze interferonu wiążą mRNA komórkowy, lecz nie są zdolne do tworzenia kompleksów z RNA fagowym (10,52).



**Rys. 7.** Wpływ puromycyny, NaF i heminy na trwałość polirybosomów w układzie bezkomórkowym z retikulocytów królika (wag 95)

Na osi odciętych odłożone liczby porządkowe frakcji uzyskanych przez wirowanie w gradiencie stężeń sacharozы

Do niedawna przyjmowano, że rybosomy są w zasadzie jednakowe we wszystkich organizmach a różnice w budowie nie mają istotnego znaczenia dla ich funkcjonowania. Jednakże di. *Girolamo* i *Cammara* (21) stwierdzili, że nie wszystkie spośród kilkudziesięciu składników białkowych rybosomów pochodzących z różnych gatunków zwierząt a nawet z różnych tkanek tych samych osobników są jednakowe pod względem ruchliwości elektroforetycznej na żelu poliakrylamidowym. Być może część białek — tych, które są jednakowe lub podobne w preparatach rybosomów różnego pochodzenia — odpowiada za samą czynność rybosomów (59, 87); część zaś ma charakter akceptorów białkowych lub niebiałkowych czynników regulujących translację.

#### 4. Rola białek zasadowych w regulowaniu procesu translacji

Niezwykłe interesujące wyniki, rzucające nowe światło na zagadnienie regulacji translacji przyniosły prowadzone w ostatnich latach badania nad biosyntezą białka w oogenezie i wczesnych stadiach rozwoju zarodka jeźowca i płazów. Badania te, niedawno szczegółowo omawiane na łamach *Postępów Biochemii* (93) wykazały, że w niezaplodnionej, dojrzałej komórce jajowej biosynteza białka nie zachodzi, natomiast rozpoczyna się ona w kilka minut po zapłodnieniu (54). Początkowo sądzono, że jest to spowodowane brakiem mRNA, zaś w chwili zapłodnienia rozpoczyna się transkrypcja genów. Jednakże aktynomycyna D nie zakłóca rozwoju zapłodnionego jaja aż do stadium blastuli i nie wpływa na szybkość syntezy białka, można zatem sądzić, że w pierwszym etapie rozwoju zarodka zachodzi odblokowanie procesu translacji i wykorzystanie powstałego w czasie oogenezy mRNA, który występuje w dojrzałej niezaplodnionej komórce jajowej w postaci uniemożliwiającej jego translację.

Przypuszczenie to potwierdzały prace, w których stwierdzono, że — wbrew pierwotnym poglądom (48) — przed zapłodnieniem mRNA komórek jajowych związany jest nie z rybosomami lecz z cząstkami cięższymi od rybosomów (50, 56, 78, 81), natomiast po zapłodnieniu można go odnaleźć we frakcji mikrosomowej (50). Jednocześnie następuje tworzenie poli-rybosomów z pojedynczych rybosomów (32, 51, 79). Odblokowanie mRNA znajdującego się na niezaplodnionych oocytach można spowodować trypsyną (50) natomiast trawienie innymi proteazami nie jest skuteczne, a zatem związane z mRNA białko ma charakter zasadowy.

Związaną postać mRNA wykryto nie tylko w oocytach i komórkach zarodkowych jeźowca, lecz także w różnych komórkach innych zwierząt (30, 60, 67). Okazało się, że mRNA związany jest z cząsteczkami zasadowego białka złożonego z kilku podjednostek o ruchliwości elektroforetycznej wyraźnie różnej od ruchliwości histonów i białek rybosomowych

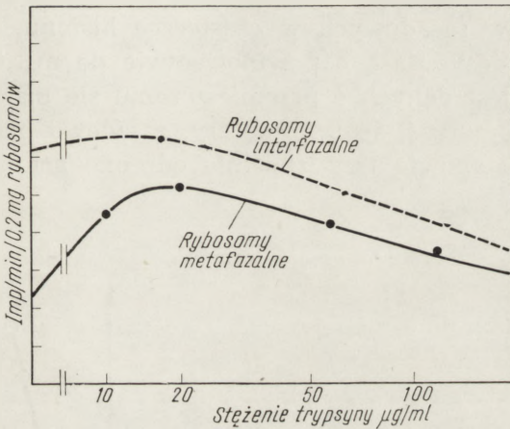
(67). Białko to nazwano informoferem a cząstki złożone z mRNA i informoferów — informosomami. Przypuszcza się, że informosomy są formą transportu mRNA z jądra do cytoplazmy, gdzie następnie zachodzi odłączenie informoferu i udostępnienie mRNA rybosomom.

Pewne dane wskazują, że proces ten zachodzi w sposób wybiórczy i może być związany z regulacją translacji. Mianowicie Spiegel, Ozaki i Tyler (77) oraz Terman i Gross (86) badali białka powstające w czasie rozwoju zarodka jeźowca począwszy od stadium 2 blastomerów aż do stadium blastuli. Wyniki elektroforezy na żelu poliakrylamidowym i autoradiogramy rozdzielonych białek świadczą o tym, że w czasie wczesnego rozwoju zarodka zmienia się zarówno ilość jak i rodzaj syntetyzowanych białek, przy czym zmiany te aż do stadium blastuli zachodzą w jednakowy sposób tak w obecności jak i wobec braku aktynomycyny D. Oznacza to, że odczytywanie informacji genetycznej w zarodku jeźowca zachodzi wybiórczo, a o tym, jaka jej część i z jaką szybkością jest odczytywana decyduje aż do stadium blastuli wyłącznie mechanizm działający na poziomie translacji, a polegający prawdopodobnie na selektywnym odblokowaniu mRNA. Wydaje się, że takie odblokowanie wiąże się między innymi z uaktywnieniem specyficznej proteazy, która według danych Mano (51) wchodzi w skład informosomów. Przejściowy wzrost aktywności proteolitycznej z jednoczesnym wzrostem zawartości azotu niebiałkowego (64) obserwuje się w komórce jajowej w następstwie zapłodnienia (46, 47), co może być związane z odblokowywaniem mRNA. Uaktywnienie proteazy zachodzi pod wpływem nieznanych czynników pochodzenia cytoplazmatycznego; wpływ jądra komórkowego na tę aktywację wykluczono, ponieważ usunięcie go z komórki jajowej i następne jej pobudzenie do rozwoju partenogenetycznego powoduje równie szybkie rozpoczęcie intensywnej syntezy białek jak w normalnych, zapłodnionych komórkach jajowych (6, 16).

Z odwróceniem opisanego zjawiska, tj. zablokowaniem normalnie przebiegającej translacji zetknęli się Scharff i Robbins (68). Autorzy ci stwierdzili, że w komórkach HeLa w czasie metafazy następuje zahamowanie biosyntezy białka, mimo, że pula aminokwasowa nie zmienia się. Jest to związane z degradacją polirybosomów do monorybosomów, jednakże degradacja nie jest wynikiem braku mRNA, ponieważ średni okres półtrwania mRNA w komórkach HeLa wynosi 3—4 godziny, a metafaza trwa 15 minut. Rozpad istniejącego mRNA również nie jest prawdopodobny, gdyż aktywność rybonukleazy nie zmienia się w tym okresie cyklu komórkowego.

Salb i Marcus (65) stwierdzili, że rybosomy metafazalne w komórkach HeLa nie są zdolne do syntezy białka w układzie bezkomórkowym, jednakże łagodna hydroliza trypsyną przywraca im tę zdolność (rysunek 8). Pozwala to przypuszczać że i w tym przypadku czynnikiem

hamującym translację jest białko zasadowe, jednakże wydaje się, że wiąże się ono z rybosomami powodując ich odłączenie od mRNA i — w następstwie — dezagregację polirybosomów, podczas gdy proces opisany w komórkach zarodkowych polega na blokowaniu mRNA. Tym bardziej interesujące są dane *Monroya* i wsp. (55), którzy twierdzą, że w niezapłodnionych komórkach jajowych rybosomy są nieaktywne niezależnie od dodatku egzogennej mRNA, a można je uaktywnić działaniem trypsyny. Można się spodziewać, że przyłączenie białka zasadowego hamuje aktywność wykrytego ostatnio przez *Cohen*a (12) czynnika białkowego przekształcającego monorybosomy w polirybosomy. Przekształcenie takie uważane jest również za jeden z elementów regulacji biosyntezy białka u bakterii (43).



**Rys. 8.** Reaktywacja rybosomów metafazalnych z komórek HeLa pod wpływem niskich stężeń trypsyny wg (65)

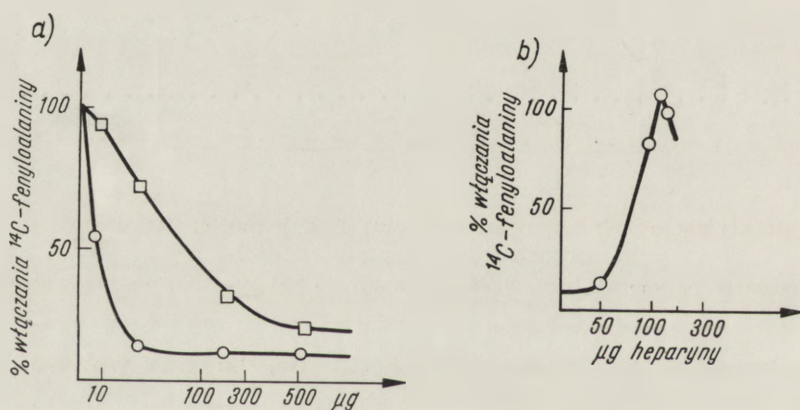
Na osi rzędnych podano włączenie  $^{14}\text{C}$ -fenyloalaniny do białek w układzie bezkomórkowym

Przedstawione tu obserwacje zachęciły do zbadania wpływu białek zasadowych na translację *in vitro*. Doświadczenie takie wykonali *Berlinguet* i *Normand* (4). Uzyskane przez nich wyniki — hamowanie włączania  $^{14}\text{C}$ -fenyloalaniny do białek w układzie bezkomórkowym z wątroby szczura przez histony i polilizylo-ACPC — przedstawia rysunek 9a. Hamujący wpływ obu rodzajów cząsteczek, które mają charakter polikationów, można odwrócić dodając równoważną ilość polianionu-heparyny (rysunek 9b) przy czym w przypadku hamowania histonami można inhibicję odwrócić w 70%, zaś w przypadku polilizylo-ACPC — w 100%. Jak widać na rysunku 9b dodanie nadmiaru heparyny do układu hamuje również biosyntezę białka, jest to jednak spowodowane wiązaniem  $\text{Mg}^{2+}$ .

Z pracy *Kruha* i *Labie* (42) wynika, że *in vitro* histony powodują dezagregację polirybosomów, co tłumaczy wzmożoną biosyntezę

białka, a jednocześnie jest zbieżne z danymi uzyskanymi *in vivo* o wpływie białek zasadowych na translację.

Opierając się na zaobserwowanym hamowaniu syntezy hemoglobiny w układzie bezkomórkowym przez histony w sposób zależny od ich pochodzenia tkankowego bardziej niż gatunkowego, Kruh i Labie (42) wysunęli przypuszczenie, że regulujące czynność genów działanie histonów wywierane jest nie na poziomie transkrypcji lecz translacji. W myśl tego założenia histon przyłączony w chromosomie do miejsca transkrypcji danego genu wędrowałby wraz z odpowiednim mRNA do cytoplazmy, gdzie translacja genu mogłaby zajść dopiero po odłączeniu histonu. Jednak taka interpretacja wyników doświadczeń nie jest jedyną możliwą i zaobserwowane różnice w hamowaniu syntezy hemoglobiny *in vitro* przez poszczególne frakcje histonów można również dobrze wyjaśnić różną zdolnością do wiązania z rybosomami, zależną od liczby dostępnych reszt aminokwasów zasadowych w cząsteczce histonu, a nie specyficznością tkankową decydującą o powinowactwie do mRNA hemoglobiny. W dodatku brak jest danych o przemieszczaniu się histonów z jądra do cytoplazmy, wiadomo zaś, że informofery, zasadowe białka cytoplazmatyczne i histony stanowią trzy zupełnie odrębne grupy białek zasadowych.



**Rys. 9.** Hamowanie biosyntezy białka *in vitro* w układzie bezkomórkowym z wątroby szczura wg (4)

a) Hamowanie przez histony — □ i polimer L-lizylo-ACPC — ○; b) Hamowanie przez polimer L-lizylo-ACPC w obecności heparyny

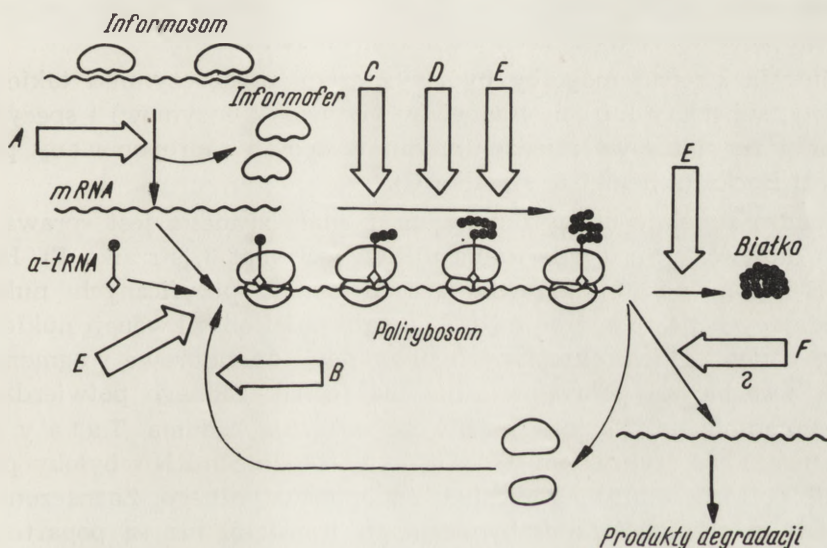
Wyniki prac nad hamowaniem translacji przez białka zasadowe *in vitro* wykazują uderzające podobieństwo do rezultatów badań (2,5) nad hamowaniem transkrypcji przez histony i budzą te same zastrzeżenia co do przenoszenia wniosków z doświadczeń *in vitro* na zjawiska obserwowane *in vivo*. Wydaje się, że w obu przypadkach hamowanie polega na wytworzeniu kompleksu kwas nukleinowy-białko zasadowe i wskutek tego kwas nukleinowy nie może spełniać roli matrycy w syntezie RNA

lub białka. Przy tym składnik białkowy kompleksu jest, jak się wydaje, mało specyficzny i należy przypuszczać, że stanowi tylko narzędzie regulacji, zaś właściwy czynnik regulacyjny pozostaje nieznany.

### 5. Uwagi końcowe

Wyniki dotychczasowych badań nad regulacją procesu translacji składają się na obraz bardzo jeszcze niejasny i fragmentaryczny, prowadzą jednak do jednego, ważnego wniosku: translacja nie jest procesem biernym, polegającym na odczytaniu każdej informacji genetycznej dostarczonej przez jądro komórkowe, lecz procesem czynnym i przynajmniej w równej mierze co transkrypcja decydującym o tym, czy dane białko jest syntetyzowane, w jakiej ilości i z jaką szybkością.

Ogólny schemat regulacji procesu translacji sporządzony na podstawie omówionych tu prac przedstawiono na schemacie 3.



**Schemat 3.** Schemat regulacji procesu translacji

A — wybiórcze odłączenie informoferów, B — nieswoiste hamowanie translacji przez białka zasadowe, które wywołują rozpad polirybosomów, C — nieswoisty lipoproteidowy inhibitor transferazy peptydylowej zawarty w retikulum endoplazmatycznym, D — nieswoista regulacja translacji przez składniki rozpuszczalnej frakcji cytoplazmatycznej, E — regulacja swoista, wywierana przez hormony, substraty i specyficzne białka regulatorowe, F — regulacja długości okresu półtrwania mRNA przez specyficzne nukleazy lub pod wpływem przyłączenia do retikulum endoplazmatycznego

Pierwszym etapem translacji byłoby odblokowanie mRNA, przeniesienie go do cytoplazmy w postaci informosomu. Wspomniane uprzednio badania Termana i Grossa (86) sugerują, że jest to proces swoisty, nie wiadomo jednak, co decyduje o odłączeniu informoferów (schemat 3, strzałka A). O intensywności syntezy danego białka decydowałyby czyn-

niki regulujące zdolność rybosomu do przyłączania mRNA w sposób umożliwiający zapoczątkowanie i kontynuowanie translacji, a zatem to, co określa się zwykle jako aktywność rybosomu, jak również — jeśli słuszna jest hipoteza Cline'a i Bocka — ewentualne czynniki wpływające na przebieg translacji i odłączenie gotowej cząsteczki białkowej.

Drugi etap translacji — inicjacja i trzeci — właściwy proces odczytywania informacji genetycznej mogłaby podlegać kontroli nieswoistej i swoistej. Nieswoista polegałaby na przyłączaniu do rybosomów białek zasadowych (schemat 3, strzałka B), uniemożliwiających powstanie lub powodujących rozpad kompleksu mRNA-rybosomy i tym samym przerwanie translacji. Tego rodzaju mechanizm działałby np. w przypadku zatrzymania syntezy białka w komórkach metafazalnych (68) i wiązałby się z odwracalnym rozpadem polirybosomów. Inny rodzaj kontroli nieswoistej wywierałby inhibitor transferazy peptydylowej (schemat 3, strzałka C) opisany przez Hoaglanda i wsp. (31, 70) oraz rozpuszczalne czynniki cytoplazmatyczne (schemat 3, strzałka D), których badanie rozpoczęła von der Decken (13, 14, 15).

Kontrola swoista mogłaby być wywierana przez czynniki takie jak hormony, substraty lub ich analogi (w przypadku enzymów) i specyficzne białka regulatorowe między innymi w sposób zaproponowany przez Cline'a i Bocka (schemat 3, strzałka C).

Ponadto zupełnie niewytłumaczona, a mało zbadana jest sprawa regulacji długości okresu półtrwania mRNA (schemat 3, strzałka F). Hipoteza Brennera (8) przewidująca istnienie specyficznych nukleaz rozkładających poszczególne mRNA w zależności od sekwencji nukleotydów w odpowiednich, określanych przez geny operatorowe fragmentach mRNA jest bardzo pomysłowa, nie ma jednak żadnego potwierdzenia eksperymentalnego. Na inną możliwość wskazują badania Tata'y (84), który uważa, że czynnikiem określającym trwałość mRNA byłoby przyłączenie polirybosomu do retikulum endoplazmatycznego. Zaznaczone na omawianym schemacie sposoby regulacji translacji nie są poparte doświadczalnie na tyle, żeby można było mówić o ich ostatecznym udowodnieniu, można się jednak spodziewać ich wyjaśnienia w niedługim czasie wobec dużego zainteresowania tą tematyką badawczą.

#### LITERATURA

1. Albrecht J., Voorma H. O., Bosch L., w Biosynteza białek, streszczenia z sympozjum PTBioch., Olsztyn 1968, str. 27.
2. Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, ser. II, 21, 3 (1958).
3. Ames B. N., Hartman P. E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 349 (1963).
4. Berlinguet L., Normand A., *Biochim. Biophys. Acta* 161, 509 (1968).



5. Bonner J., Huang R. C., Gilden R. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 893 (1963).
6. Brachet J., Ficq A., Tencer R., *Exptl. Cell. Res.* **32**, 168 (1963).
7. Brawerman G., Eisenstadt J., *Biochemistry* **5**, 2784 (1966).
8. Brenner S., *Brit. Med. Bull.* **21**, 244 (1965).
9. Bruns G. P., London I. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 236 (1965).
10. Carter W. A., Levy H. B., *Science* **155**, 1254 (1967).
11. Cline A. L., Bock R. M., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 321 (1966).
12. Cohen B. B., *Biochem. J.* **110**, 231 (1968).
13. von der Decken A., *J. Cell. Biol.* **33**, 637 (1967).
14. von der Decken A., Abstracts 4th FEBS Meeting, Oslo 1967, str. 131.
15. von der Decken A., *Eur. J. Biochem.* **4**, 87 (1968).
16. Denny P. C., Tyler A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 245 (1964).
17. Ebouë-Bonis D., Chambaut A. M., Volfin P., Clauser H., *Nature* **119**, 1183 (1963).
18. Finter N. B. (red.) Interferons, North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1966.
19. Garren L. D., Ney R. L., Davis W. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1443 (1965).
20. Gąsior E., *Post. Biochem.* **14**, 485 (1968).
21. Di Girolamo M., Cammarano P., *Biochim. Biophys. Acta*, **168**, 181 (1968).
22. Gorski J., Padnos D., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 100 (1966).
23. Grayzel A., Hörcher P., London I. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 650 (1966).
24. Gribble T. J., Schwartz H. C., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 333 (1965).
25. Gruber M., w Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis, red. V. V. Koningsberger i L. Bosch, Elsevier, Amsterdam 1967, str. 383.
26. Grzelakowska-Sztabert B., *Post. Biochem.*, **14**, 509 (1968).
27. Hamilton T. H., *Science* **161**, 649 (1968).
28. Hendler R. W., *Nature* **207**, 1053 (1965).
29. Henshaw E. C., Bojarski E. B., Hiatt H. H., *J. Mol. Biol.* **7**, 122 (1963).
30. Henshaw E. C., Revel M., Hiatt H. H., *J. Mol. Biol.* **14**, 241 (1965).
31. Hoagland M. B., Scornik O. A., Pfefferkorn L. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1184 (1964).
32. Hultin T., *Exptl. Cell. Res.* **44**, 608 (1964).
33. Jacob F., Monod J., *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
34. Kerr I. M., Cohen N., Work T. S., *Biochem. J.* **98**, 826 (1966).
35. Korner A., *Nature* **181**, 422 (1958).
36. Korner A., *Biochem. J.* **73**, 61 (1959).
37. Korner A., w Mammalian Protein Metabolism, red. J. B. Allison, H. N. Munro, Academic Press, New York 1964, tom 1, str. 177.
38. Korner A., *Rec. Progr. Hormone Res.* **21**, 205 (1965).
39. Korner A., *J. Cell. Comp. Physiol.* **66**, Suppl. 1, 153 (1965).
40. Korner A., *Progr. Biophys.* **17**, 61 (1967).
41. Krause R. L., Sokoloff L., *J. Biol. Chem.* **242**, 1431 (1967).
42. Kruh J., Labie D., *Biochem. Biophys. Acta* **161**, 518 (1968).
43. Lavallé R., de Hauwer G., *J. Mol. Biol.* **37**, 269 (1968).
44. Levere L. D., Kappas A., Granick S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 985 (1967).
45. Lodisch H. F., *Nature* **220**, 345 (1968).
46. Lundblad G., *Exptl. Cell. Res.* **1**, 264 (1950).

47. Maggio R., *J. Cell. Comp. Physiol.* **50**, 135 (1957).
48. Maggio R., Vittorelli M. L., Rinaldi A. M., Monroy A., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **15**, 436 (1964).
49. Manchester K. L., Young F. G., *Biochem. J.* **70**, 353 (1958).
50. Mano Y., Nagano H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 210 (1966).
51. Mano Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 216 (1966).
52. Marcus P. I., Salb M. J., *Virology* **30**, 502 (1966).
53. Martin I. E., Young F. C., *Nature* **203**, 684 (1965).
54. Monroy A., w Morphogenesis, Differentiation and Development, Comprehensive Biochemistry tom 28, red. M. Florkin i E. H. Stotz, Elsevier, Amsterdam 1967, str. 1.
55. Monroy A., Maggio R., Rinaldi A. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 107 (1965).
56. Monroy A., Tyler A., *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 431 (1963).
57. Moscona A. A., Moscona M. H., Saenz N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **61**, 160 (1968).
58. Moses V., Yudkin M. D., *Biochem. J.* **110**, 135 (1968).
59. Mutolo V., Giudice G., Hopps V., Donatuti G., *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 214 (1967).
60. Nemer M., Infante A. A., *Federation Proc.* **24**, 283 (1965).
61. Rampersad O. R., Wool I. G., *Science* **149**, 1102 (1965).
62. Revel M., Gros F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 124 (1966).
63. Revel M., Herzberg M., Becarevic A., Gros F., *J. Mol. Biol.* **33**, 231 (1968).
64. Ricotta C. M., *Naturwissenschaften* **43**, 258 (1956).
65. Salb M. J., Marcus P. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 1353 (1965).
66. Salas M., Hille M. B., Last J. A., Wahba A. J., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 387 (1967).
67. Samarina O. P., Lukanidin E. M., Molmer J., Georgiev G. P., *J. Mol. Biol.* **33**, 251 (1968).
68. Scharff M. D., Robbins E., *Science* **151**, 992 (1966).
69. Schwartz A. G., Amos H., *Nature* **219**, 1366 (1968).
70. Scornik O. A., Hoagland M. B., Pfefferkorn L. C., Bishop E., *J. Biol. Chem.* **242**, 131 (1967).
71. Sharff R., Wool I. G., *Biochem. J.* **91**, 257 (1965).
72. Soeiro R., Amos H., *Science* **154**, 662 (1966).
73. Sokoloff L., Campbell P. L., Francis C. M., Klee C. B., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 329 (1963).
74. Sokoloff L., Francis C. M., Campbell P. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 728 (1964).
75. Sokoloff L., Kaufman S., Campbell P. L., Francis C. M., Gelboin H. V., *J. Biol. Chem.* **238**, 1432 (1963).
76. Sokoloff L., Roberts P. A., Januska M. M., Kline J. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **60**, 652 (1968).
77. Spiegel M., Ozaki H., Tyler A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 135 (1965).
78. Spirin A. S., Nemer M., *Science* **150**, 214 (1965).
79. Stafford D. W., Sofer W. H., Iverson R. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 313 (1964).
80. Stanley W., Salas M., Wahba A. J., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 290 (1966).
81. Stavy L., Gross P. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 735 (1967).
82. Stent G. S., *Science* **144**, 816 (1964).

83. Stirewalt W. S., Wool I. G., Cavicchi P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1885 (1967).
84. Tata J. R., *Nature* **219**, 331 (1968).
85. Tavill A. S., Grayzel A. I., London I. M., Williams M. K., Vanderhoff G. A., *J. Biol. Chem.* **243**, 4987 (1968).
86. Terman S. A., Gross P. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 595 (1965).
87. Walker J. P., *J. Mol. Biol.* **10**, 319 (1964).
88. Waxman H. S., Freedman M. L., Rabinowitz M., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 353 (1967).
89. Wool J. G., Castles J. J., Moyer A. N., *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 333 (1965).
90. Wool I. G., Cavicchi P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 991 (1966).
91. Wool I. G., Krahl M. E., *Am. J. Physiol.* **196**, 961 (1959).
92. Wool I. G., Moyer A. N., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 249 (1964).
93. Zagórska L., *Post. Biochem.* **14**, 537 (1968).
94. Zucker W. V., Schulman H. M., *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 400 (1967).
95. Zucker W. V., Schulman H. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 582 (1968).



CELINA JANION \*

## **Teorie mutagenезy chemicznej w świetle badań nad mutagenicznym działaniem hydroksylaminy**

### **Mechanism of Chemical Mutagenesis in the Light of the Mutagenic Action of Hydroxylamine**

An outline is presented of the chemical basis for the mutagenic action of hydroxylamine and other chemical mutagens; as well as theories of mutation based on the chemical modifications produced by mutagens and the resulting biological effects.

Powstawanie pod wpływem związków chemicznych osobników o cechach niespotykanych u form rodzicielskich otworzyło nowe możliwości badania przyczyn i mechanizmów mutacji zachodzących w przyrodzie. Obecnie wiemy, że zasadą działania mutagenów — czynników powodujących mutacje — jest ich pośrednia, lub bezpośrednia reakcja z DNA, lub z RNA, gdy RNA stanowi podłoże dziedziczności. Sposoby działania mutagenów są rozmaite, efektem musi być zmiana w zapisie genetycznym, brak części informacji, lub zmiana w ułożeniu reszt nukleotydowych. Biologiczne działanie mutagenów próbuje się powiązać z reakcjami chemicznymi zachodzącymi pod ich wpływem w niskocząsteczkowych modelowych składnikach kwasów nukleinowych, polimerach, czy w kwasach nukleinowych. Interpretacja działania mutagenów jest trudna ze względu na ich małą specyficzność (reagują one z różnymi składnikami kwasów nukleinowych, bądź powodują powstawanie kilku produktów w czasie danej reakcji) oraz fakt, że mutacji towarzyszy zawsze inaktywacja układu biologicznego. Inaktywacja może być wynikiem zmiany mutacyjnej która powoduje uszkodzenie czynności istotnych dla życia komórki, lub też wynikiem reakcji prowadzącej tylko do inaktywacji.

---

\* Dr, Zakład Fizykochemii Biologicznej, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: BU — 5-bromouracyl, MeG — 7-metyloguanina, HAC — hydroksycytozyna (III), 2HAC — 5,6-hydroksylamino-hydroksycytozyna (II).

Dlatego o przydatności danego związku jako mutagenu świadczy stosunek zmian mutacyjnych do letalnych.

Obecny przegląd po krótkim wprowadzeniu w rodzaje zmian spowodowanych mutacją i opisanie sposobu działania części używanych mutagenów, będzie poświęcony szczegółowej analizie mutagenicznego działania hydroksylaminy.

## I. Typy mutacji

Większość badanych mutacji rewertujących (wstecznych), spontanicznych czy indukowanych, należy do tak zwanych mutacji punktowych. Są to mutacje łatwo odwracalne, które prawdopodobnie powstają na skutek zmiany jednego nukleotydu, lub pary nukleotydów w dwuniciowym DNA. Freese (31) na podstawie różnic w indukowaniu odwracalności mutacji u fagów T<sub>4</sub> doszedł do wniosku, że mutacje punktowe mogą powstać bądź wskutek tranzycji bądź transwersji. Tranzycją nazwał zastąpienie pirymidyny inną pirymidyną, a puryny inną puryną. Zamiana pary AT na parę GC, lub odwrotnie, jest przykładem tranzycji. Transwersją nazwał zastąpienie puryny pirymidyną, a pirymidyny puryną. Zamiana pary AT na parę TA lub CG, czy też zamiana pary CG na parę GC lub AT są przykładami transwersji.

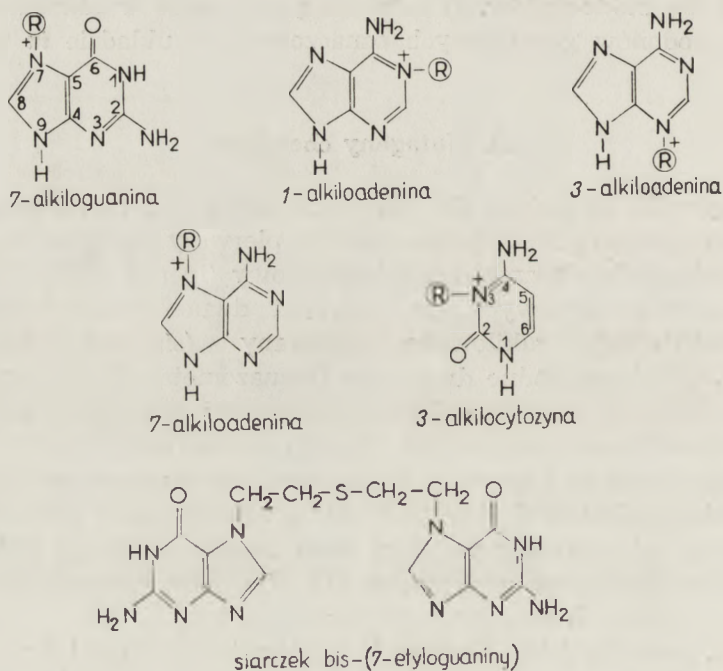
Do mutacji punktowych zalicza się również mutacje powstające przez delecje (wypadnięcie), lub insercje (dodanie) nukleotydu. Te właśnie rodzaje mutacji proponowali Brenner i wsp. (10) dla wytłumaczenia działania mutagenów proflawinowych. Istnienie wszystkich wspomnianych rodzajów mutacji udowodniono pośrednio porównując skład i sekwencję aminokwasów białka normalnego i zmutowanego oraz odpowiadające im kodony genetyczne. W ten sposób ustalono jakim zmianom uległy poszczególne nukleotydy, aby mogły zaistnieć odpowiednie zmiany w kodowanych aminokwasach (88, 110, 120, 123). Szczególną subtelnnością tego rodzaju oznaczeń zwraca uwagę analiza składu aminokwasów mutantów proflawinowych. Addycja, lub delecja jednej zasady zmienia całkowicie odczyt następnych nukleotydów. Jednak można otrzymać ponownie aktywne białko poprzez krzyżowanie dwóch różnych mutantów określonych umownie według Cricka i wsp. (24) jako mutanty o przeciwnych znakach (+) i (-) co w rezultacie prowadzi do odzyskania zdolności do odczytu pierwotnych trójek kodu poza obrębem zmutowanym. Przynależność do klasy (+) i (-) nie określa rodzaju zachodzącej mutacji, świadczy jedynie o tym, że skrzyżowanie mutantów należących do tych dwóch klas daje częściowe lub zupełne odwrócenie skutków mutacji. Nastąpi to na przykład gdy jeden z mutantów powstał przez delecję jednej zasady, a drugi mutant w możliwie niewielkiej odległości ma insercję jednej lub delecję dwóch zasad.

Białko syntetyzowane pod kontrolą podwójnie zmutowanego genu powinno wykazywać różnicę w składzie aminokwasów tylko w odcinku pomiędzy zmutowanymi punktami. Te założenia całkowicie potwierdzili Terzaghi i wsp. (110) oraz Okada i wsp. (88) badając lizozym podwójnych mutantów proflawinowych faga T<sub>4</sub>. Analiza lizozymu jednego z podwójnych mutantów wykazała, że różni się on pięcioma kolejnymi aminokwasami od lizozymu szczepu dzikiego. Z porównania kodonów genetycznych dla tych dwóch różniących się odcinków sekwencji aminokwasowej można było wnosić, że w jednym z punktów nastąpiła delecja, w drugim insercja jednego nukleotydu (110). Lizozym innego podwójnego mutantu proflawinowego odznaczał się brakiem jednego i zmianą następujących pięciu aminokwasów, co wskazywało na podwójną delecję: dwóch nukleotydów w jednym i jednego nukleotydu w drugim punkcie kodonu lizozymu (88). Prace te nie tylko potwierdzają teorie addycji i delecji zasad pod wpływem proflawiny, ale i główne założenie teorii translacji — jednokierunkowy sposób odczytywania kodu, obejmujący pewną liczbę nukleotydów. Potwierdzają one także w układzie *in vivo*, działanie kodonów genetycznych oznaczonych w układzie *in vitro*.

## II. Mutageny chemiczne

1. *Czynniki alkilujące.* Do tej najliczniejszej i najróżnorodniejszej grupy mutagenicznych związków należą: pierwszy z opisanych mutagenów chemicznych, siarczek dwuchloroetylowy (iperyt) S(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub> (3), grupa iperytów azotowych (na przykład dwuchlorometyloetyloamina, CH<sub>3</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>), alkilowane siarczany (siarczan dwuetylowy (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>), pochodne dwuazowe (dwuazometan N<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), oraz wiele innych związków, których działanie biologiczne przypisuje się alkilacji zasad kwasów nukleinowych (76). Zasadą łatwiej ulegającą alkilowaniu jest guanina; adenina i cytozyna alkilowane są znacznie wolniej. Szybkość alkilowania, a niekiedy i pozycja, w którą wprowadzana jest grupa alkilowa, zależy od struktury w jakiej dana zasada występuje. Po alkilacji DNA etylosulfonianem metylowym (12, 70), lub dwuazometanem (63) 86% zmetylowanych zasad stanowi 7-metyloguanina, około 10% 3-metyloadenina, powstają także śladowe ilości 1-metyloadeniny i 3-metylocytozyny oraz przy intensywnej alkilacji śladowe ilości 7-metyloadeniny (71). Natomiast po alkilowaniu RNA, mieszaniny nukleozydów, czy denatowanego DNA, 7-metyloguanina stanowi 61%, 1-metyloadenina 23%, 3-metylocytozyna 16% wszystkich zalkilowanych zasad. Wpływ struktury jest szczególnie widoczny przy porównaniu alkilacji poli A i kompleksu poli A z poli U. W poli A reszty adeniny alkilowane są w pozycji N<sub>1</sub>, a kompleksowanie z poli U hamuje proces alkilacji (79, 80). Te różnice są wynikiem niedostępności pewnych grup chemicznych biorących udział

w budowie danej struktury i czasami mogą być wykorzystane do badań nad strukturą polimeru. Wrażliwość DNA faga  $\Phi X 174$  na działanie formaldehydu stanowi według Sinshaimera (105) jeden z dowodów jego jednoniciowej budowy. Odmienny jest wpływ struktury na działanie nitrozoguanidyny. Związek ten wywołuje mutacje głównie przez alkirowanie guaniny (82, 104, 113), ale wprowadzenie alkilu jest możliwe wyłącznie w polimerach. Czynniki alkilujące zawierające więcej niż jedną grupę funkcyjną, na przykład iperyt, mogą jednocześnie alkilować dwie cząsteczki guaniny powodując wytworzenie pochodnej bis 7-alkilo-guaniny (13, 14, 16). W dwuniciowym DNA taka reakcja prowadzi do wytworzenia wiązań poprzecznych między blisko sąsiadującymi resztami guaniny dwóch różnych łańcuchów, co powoduje wzrost letalności (15, 46, 70, 77, 78) i prawdopodobnie warunkuje łatwo odwracalną denaturację alkilowanego DNA (42, 43). Wszystkie znane produkty powstające w czasie alkilowania kwasów nukleinowych podano na rysunku 1.



**Rys. 1.** Alkilowane pochodne G, A i C, gdzie R oznacza grupę alkilową oraz produkt alkilacji iperytem — bis pochodna guaniny.

Zupełnie niewyjaśnionym działaniem czynników dwufunkcyjnych jest wytwarzanie grup aktywnych w DNA działających nawet po usunięciu nadmiaru nieprzereagowanej części związków alkilujących i powodujących tworzenie nierozpuszczalnego żelu (26).



Do tego złożonego obrazu zmian chemicznych dochodzą zmiany wtórne jak: depurynacja 7-metyloguaniny, 3-metyloadeniny, 7-metyloadeniny, możliwy rozpad łańcucha polinukleotydowego w miejscu depurynacji i przekształcenie w DNA 3-metylocytozyny w 3-metylouracyl a w RNA 1-metyloadeniny w 6-metyloadeninę (13, 63, 66, 70).

Efekt mutageniczny przypisuje się głównie alkilacji guaniny. Badania nad mutacjami i mutacjami wstecznymi, wykazują że pod wpływem czynników alkilujących zachodzi głównie tranzycja par zasad GC do AT, w mniejszym stopniu AT do GC (5, 32, 61), chociaż według *Tessman* a i wsp. (112) w jednoniciowym DNA faga S13 możliwe są tranzycje wszystkich zasad  $A \rightarrow G$ ,  $G \rightarrow A$ ,  $C \rightarrow T$ , a nawet  $T \rightarrow C$ .

2. *Kwas azotawy*. Dezaminuje on guaninę do ksantyny, adeninę do hipoksantyny, cytozynę do uracylu. To jego działanie chemiczne poznano dużo wcześniej niż działanie mutageniczne (8). Był pierwszym czynnikiem mutagenicznym, którym działano bezpośrednio na wyodrębniony RNA z wirusa mozaiki tytoniowej (45) i na transformujące kwasy dezoksyrybonukleinowe (2, 72, 87). Otrzymanie mutantów pod wpływem zmienionych przez  $\text{HNO}_2$  kwasów nukleinowych przyczyniło się do ugruntowania poglądu o bezpośredniej zależności mutacji od zmian w kwasach nukleinowych. Mutageniczny skutek dezaminacji cytozyny do uracylu (tranzycja  $C \rightarrow U$ ) i adeniny do hipoksantyny (tranzycja  $A \rightarrow G$ ) nie budzi wątpliwości. Dezaminację guaniny uważa się za główną przyczynę inaktywującego działania kwasu azotawego. Wskazują na to porównania szybkości reakcji dezaminacji tych trzech zasad przy różnych wartościach *pH* z szybkością inaktywacji fagów. Ilość mutantów u fagów  $T_2$  uzyskanych po reakcji w *pH* 4,2 jest 90-krotnie mniejsza niż po reakcji w *pH* 5 i o tyle samo zmniejsza się szybkość dezaminacji A i C. Natomiast letalność jest 30-krotnie mniejsza podobnie jak szybkość dezaminacji G (102, 115). Związek między letalnym działaniem kwasu azotawego a dezaminacją guaniny jest niezupełnie jasny. Samo powstawanie ksantyny prawdopodobnie nie jest przyczyną letalności, a dezaminacja guaniny w RNA raczej powinna prowadzić do mutacji (83). Letalność prawdopodobnie jest związana z niezupełnie wyjaśnioną reakcją uboczną, którą ujawnia porównanie ilości reszt guaninowych zanikających podczas dezaminacji z ilością pojawiającej się ksantyny (99, 103). Braki w bilansie zanikającej guaniny stanowią od 45% do 65% zależnie od *pH* reakcji (103). Niewielkiej części brakującego związku może odpowiadać wykryta niedawno jako produkt dezaminacji guaniny 2-nitrohipoksantyna (96, 97).

Dodatkową reakcją kwasu azotawego o znaczeniu letalnym jest tworzenie wiązań poprzecznych między dwoma łańcuchami DNA, co prowadzi do łatwo odwracalnej denaturacji DNA (7, 42, 43, 44) i prawdopodobnie jest jedną z przyczyn powstawania delecji w rejonie rII faga  $T_4$  obejmujących nieraz cały ten rejon (111). Prawdopodobnie reakcja ta

uniemożliwia także drugi cykl kopiowania łańcucha dezoksyrybopolinu-kleotydowego na zdezaminowanej  $\text{HNO}_2$  matrycy poli dAT (59).

3. *Analogi zasad*. Stanowią one zupełnie odmienną grupę mutagenów chemicznych, które działają poprzez wbudowywanie się do kwasów nukleinowych (30, 73). Do najczęściej używanych należy 5-bromouracyl — analog tyminy i 2-aminopuryna — analog adeniny. Ponieważ mutacje otrzymane działaniem bromouracylu można łatwo odwrócić działaniem 2-aminopuryny i odwrotnie, F r e e s e (31) przypuszcza, że te dwa analogi zasad powodują przeciwstawne tranzycje par zasad  $\text{AT} \rightarrow \text{GC}$  i wskazuje na tranzycje GC do AT jako uprzywilejowany kierunek działania bromouracylu. Sprawa ta nie jest jednak tak prosta: 5-bromouracyl może zastąpić prawie całkowicie tyminę w DNA faga  $\text{T}_2$  i nie powodować mutacji (27, 73), natomiast ilości 2-aminopuryny, które powodują mutacje są tak małe, że nawet miejsce jej wbudowania nie jest znane (47, 116). Do tego zagadnienia wrócimy jeszcze przy opisie mechanizmu mutacji.

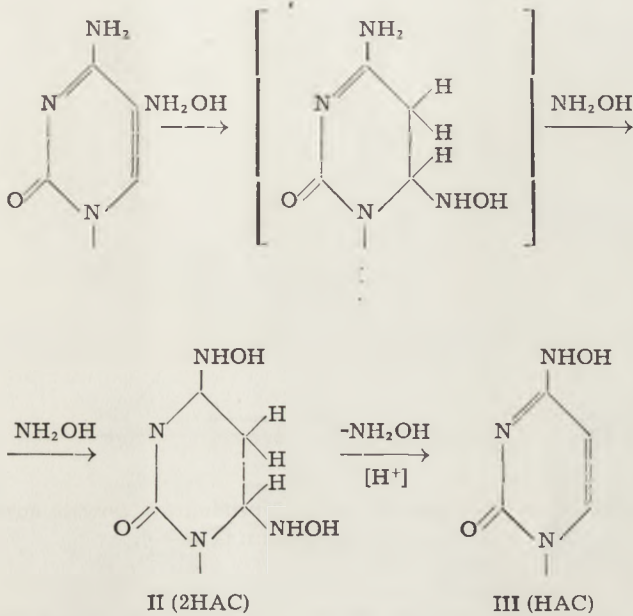
### III. Mutageniczne działanie hydroksylaminy

Hydroksylamina jak i rzadziej stosowane jej metylowe pochodne należą do najbardziej specyficznie działających mutagenów chemicznych. Pierwsze doniesienie o wpływie hydroksylaminy na układy biologiczne dotyczyły jej inaktywującego działania na fagi (60), wirusy zwierzęce i infekcyjny RNA (29). Sądono przytem mylnie, że jest to wynik reakcji z białkami. Wkrótce stwierdzono zależność efektu biologicznego od reakcji z kwasami nukleinowymi i ukazały się pierwsze prace nad mutagenicznymi właściwościami hydroksylaminy (33, 38). Okazało się, że hydroksylamina w dużych stężeniach działa specyficznie spośród zasad kwasów nukleinowych tylko na cytozynę i uracyl (35, 100, 114). Dalszą specyficzność reakcji warunkuje *pH*. Optimum reakcji z cytozyną znajduje się w *pH* około 6,2, z uracylem w *pH* około 10 (100, 114). Różne są też losy poszczególnych pierścieni. Układ pierścieniowy cytozyny po reakcji z hydroksylaminą zostaje zachowany, natomiast pierścień uracylu ulega rozpadowi. Konsekwencją biologiczną rozpadu pierścienia jest raczej inaktywacja (101). Ponieważ w DNA uracyl nie występuje (z wyjątkiem faga PBS2 (75)), zmiany jakie zachodzą pod wpływem hydroksylaminy w DNA dotyczą tylko zmian w pierścieniu cytozyny.

Należy podkreślić, że specyficzne i mutageniczne właściwości hydroksylaminy wykazuje tylko w stężeniach powyżej 1M (6, 38); w stężeniach poniżej 1M, szczególnie w obecności tlenu, rozpada się ona na szereg rodników, nadtlenek wodoru i inne związki, które działają niespecyficznie i mogą powodować zmiany we wszystkich składnikach kwasów nukleinowych (36, 39, 94, 95).

### 1. Przebieg reakcji między hydroksylaminą a związkami cytozyny

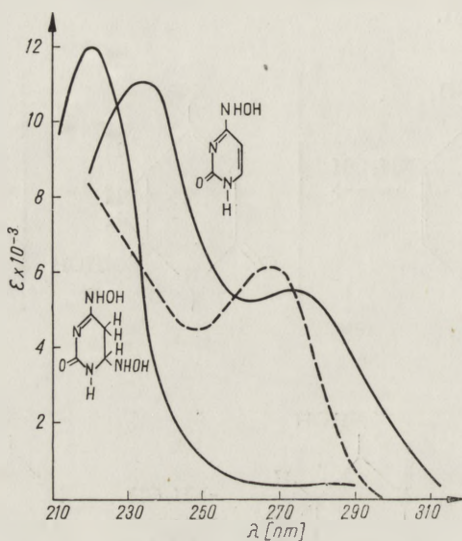
Produkty powstające w wyniku reakcji hydroksylaminy z pierścieniem cytozyny znane były od dawna, natomiast zrozumienie całokształtu stosunków: związek wyjściowy — produkty reakcji jest wynikiem ostatnich badań. Ze względu na aktualność zagadnienia i bezpośrednie odbicie w poglądach na mechanizm działania hydroksylaminy jako mutagenu, warto prześledzić rozwój badań prowadzących do wyjaśnienia chemicznych podstaw reakcji.



**Schemat 1.** Schemat reakcji zachodzącej między pochodnymi cytozyny, a hydroksylaminą według Brown i Schell (19).

Schemat podany przez Browna i Schella (19) oraz Veorvoerda i wsp. (114) i utrzymujący się do niedawna w literaturze przedstawia kolejne etapy reakcji hydroksylaminy z cytozyną lub  $N_1$ -podstawionymi pochodnymi cytozyny (schemat 1). Autorzy proponowali, że w pierwszym etapie reakcji następuje nasylenie wiązania 5,6 z utworzeniem bardzo labilnego związku I. Następnie zachodzi bardzo szybka wymiana grupy aminowej na hydroksylaminową i powstaje 5,6-hydroksylamino-hydroksycytozyna (związek II — 2HAC). Związek ten (II) w warunkach kwaśnych traci cząsteczkę hydroksylaminy i przekształca się w hydroksycytozynę (III — HAC). Powstawanie związku I w sposób bezpośredni nie zostało udowodnione. Ponieważ reakcja zachodzi w dwóch punktach cząsteczki, jest bardzo prawdopodobne, że jeden z nich jest atakowany szybciej niż drugi. Produkt III nie może powstawać w pierw-

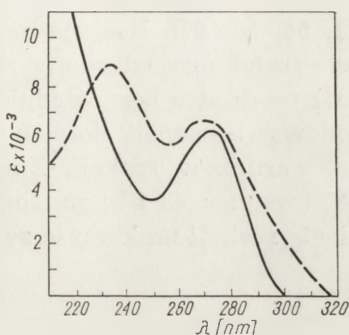
szym etapie reakcji, gdyż okazało się (52), że szybkość tworzenia związku II ze związku III jest znacznie mniejsza niż związku II z cytozyny. Na przejściowe występowanie produktu I wskazują również, obarczone dużym błędem stosowanej metody, badania reakcji hydroksylaminy i znakowanej *O*-metylohydroksylaminy z poli C (18, 92). Pozostałe produkty reakcji,  $N_1$ -podstawione pochodne II i III wyodrębniono w postaci krystalicznej w kilku pracowniach (19, 20, 22, 52).



**Rys. 2.** Widmo absorpcyjne cytozyny (---) i produktów powstających po reakcji cytozyny z hydroksylaminą (—).

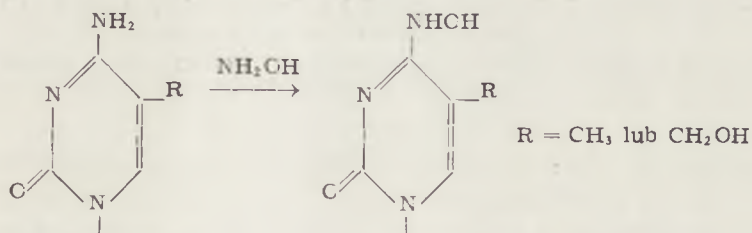
Podstawą badań nad reakcją zasad z hydroksylaminą są zmiany zachodzące w widmie UV. Na rysunku 2 przedstawiono widma cytozyny i powstających produktów. Nasylenie wiązania 5,6 pociąga za sobą bardzo drastyczną zmianę w widmie cytozyny — zanik występującego w widmach wszystkich pochodnych cytozyny maksimum około 270 nm. Związek III wykazuje absorpcję w tym zakresie długości fal, ale ponieważ uważano, że jest to produkt wtórny, śledzenie spadku absorpcji w  $\lambda_{\max}$  związku wyjściowego stało się powszechnie używaną metodą wykrywania reakcji i oznaczania jej szybkości. W ten sposób ustalono, że 5-metylocytozyna nie reaguje z hydroksylaminą, a reakcja z 5-hydroksymetylocytozyną zachodzi bardzo wolno. Przypuszczano przy tym, że produktem reakcji jest odpowiednia pochodna związku II. Zmiany jakie zachodzą w 5-podstawionych pochodnych cytozyny są z tego względu interesujące, że są one bezpośrednią przyczyną mutacji zachodzących u fagów parzystych, na których przeprowadzono większość badań nad mutagenicznymi właściwościami hydroksylaminy. W DNA tych fagów cytozyna jest całkowicie zastąpiona pochodnymi 5-hydroksymetylocytozyny (106, 122).

Właściwe zrozumienie zmian zachodzących pod wpływem działania hydroksylaminy na 5-podstawione pochodne cytozyny stało się możliwe dopiero po oznaczeniu w czasie reakcji zmian krzywej absorpcji nie w jednym wybranym punkcie, ale na całej jej długości (52, 53). Wówczas zauważono, że wskutek działania hydroksylaminy na 5-metylocytozynę powstaje zupełnie inny produkt o prawie tej samej wartości ekstynkcji w  $\lambda_{\max}$  (rysunek 3). Kształt jego widma UV jak i analiza chemiczna wskazuje, że jest to 5-metylo pochodna hydroksycytozyny.



**Rys. 3.** Widmo absorpcyjne 5-metylocytozyny (—) i produktu powstającego po reakcji z hydroksylaminą (- - -) według Janion i Shugar (52).

Podobne badania przeprowadzone na 5-hydroksymetylocytozynie ujawniły, że i w tym przypadku tworzy się jeden produkt reakcji — pochodna hydroksycytozyny (52). Stwierdzenie przez autorów poprzednich prac istnienia reakcji na podstawie spadku absorpcji w punkcie maksymalnym było możliwe tylko dzięki różnicom w absorpcji produktu wyjściowego ( $\lambda_{\max}$  284 nm  $\epsilon_{\max}$  76 000) i produktu reakcji ( $\lambda_{\max}$  273 nm  $\epsilon_{\max}$  54 300). Zmiany zachodzące pod wpływem hydroksylaminy w 5-podstawionych pochodnych cytozyny podano na schemacie 2.

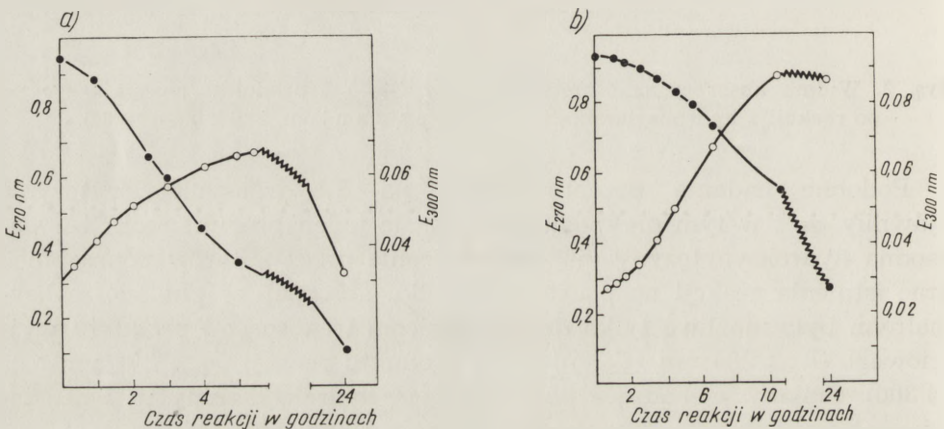


**Schemat 2.** Schemat reakcji zachodzącej między 5-podstawionymi pochodnymi cytozyny a hydroksylaminą.

W przypadku fagów parzystych hydroksylamina jest idealnie działającym mutagenem: powoduje zmianę jednego składnika kwasów nukleinowych i daje jeden produkt reakcji.

Powyższe wyniki wskazujące na możliwość powstawania pochodnych hydroksycytozyny (związek III) nie dzięki reakcji wtórnej, ale poprzez bezpośrednie działanie hydroksylaminy na związek wyjściowy, zwróciły uwagę na niedokładność uprzednio stosowanej metody i stały się punktem wyjścia rewizji ogólnie przyjętego schematu reakcji hydroksylaminy ze związkami cytozyny.

Ponowne przesłedzenie reakcji hydroksylaminy z glikozydowymi pochodnymi cytozyny ale metodą pozwalającą na uchwycenie obydwu produktów wykazało, że produkt III pojawia się obok produktu II na samym początku reakcji (17, 22, 56, 58, 67). Reakcja zachodzi zatem w dwóch kierunkach: jeden z nich został przedstawiony na schemacie 1, drugim jest tworzenie związku III na drodze bezpośredniej wymiany grupy aminowej na hydroksylaminową. Stosunek ilościowy tych dwóch produktów — II/III — zależy od warunków reakcji. Zmniejszenie stężenia hydroksylaminy z 2,5 — 1M (rysunek 4a i b) zmiana pH w kierunku kwaśnym, powoduje przesunięcie reakcji na korzyść związku III (56).



**Rys. 4a, b.** Śledzenie reakcji między poli C i hydroksylaminą w pH 6,5 i 37°C, przy stężeniu (a) — 2,5 M; (b) — 1M hydroksylaminy.

Spadek absorpcji w 270 nm (●●●) jest miarą tworzenia się związku II, wzrost absorpcji w 300 nm (○○○) jest miarą tworzenia związku III (według Janion i Sugar (56)).

Powstawanie hydroksycytozyny jako jednego z produktów reakcji hydroksylaminy z cytozyną nasuwa przypuszczenie, że związek ten nie tylko powoduje mutacje u fagów parzystych, ale być może jest przyczyną mutacji zachodzących w innych układach biologicznych zawierających cytozynę w DNA, na przykład w jednoniciowym DNA faga S13, czy w transformującym DNA *Bacillus subtilis*. Istnieją pewne dane, które wskazują na słuszność takiego przypuszczenia. Na przykład 1000-krotnie mniejsza wydajność mutacji w transformującym DNA niż u fagów T<sub>4</sub> (40), a także znaczne zwiększenie ilości mutacji w transformującym DNA

przy przesunięciach  $pH$  reakcji z 6,2 do 5,5 (40) i 4,2 (6), można uznać za dowód zależności występowania mutacji od obecności pochodnych hydroksycytozyny.

## 2. Próby biologiczne

*Mutageniczna specyficzność działania hydroksylaminy.* Obok badań chemicznych na wysoką specyficzność działania hydroksylaminy wskazują badania biologiczne. Badania nad otrzymywaniem mutacji powstających ze szczepów dzikich, jak i mutacji wstecznych, prowadzących do odzyskania cech właściwych szczepom dzikim, przeprowadzone na fagach  $T_4$  (23, 33, 38) i S13 (112) wskazują, że tylko pewne typy mutantów mogą powstać, względnie ulec rewersji pod wpływem hydroksylaminy. Te badania łącznie z danymi chemicznymi doprowadziły do wniosku, że miejscem mutagenicznego działania hydroksylaminy są reszty cytozyny, a wynikiem — tranzycja CG do AT w dwuniciowym DNA, lub C do T w jednoniciowym DNA.

*Próby z polimerazą RNA.* Działanie polimerazy RNA (EC 2.7.7.6) ma wiele cech wspólnych z działaniem polimerazy DNA (EC 2.7.7.7). Oba te enzymy syntetyzują kwasy nukleinowe tylko z trójfosforanów nukleozydów, a powstający produkt jest komplementarnym odbiciem matrycy polinukleotydowych (28, 109). Uważa się, że polimeraza RNA przenosi informacje z DNA do RNA, czyli powoduje transkrypcję cech zawartych w DNA. Oprócz DNA, który uważa się za matrycę naturalną, polimeraza RNA może między innymi używać jako matrycy poli C, na którym syntetyzuje poli G (28, 109). Philips i wsp. (91) oraz Wilson i Cairns (121) badali wpływ działania hydroksylaminy na właściwości poli C jako matrycy. Autorzy stwierdzili, że poli C pod wpływem hydroksylaminy traci szybko zdolność włączania GTP, którą można częściowo przywrócić przez dodanie ATP. Działanie ATP jest specyficzne, UTP i CTP nie mają wpływu na reakcję. Bezwzględna ilość włączanego ATP jest bardzo mała, stanowi około 1,5%. Jak podają Philips i Brown (90) cytując nieopublikowane wyniki Banks, Brown i Grossmana, na matrycy kopolimeru cytydylo-hydroksycytydylowego ilość włączanego ATP zwiększa się do przeszło 50%. Wyniki te świadczą o tranzycji C do T zachodzącej pod wpływem hydroksylaminy w układzie biologicznym.

Pewnych danych o roli enzymu, bądź wpływie sąsiadujących w matrycy nukleotydów na proces syntezy RNA dostarczyli Budowski i wsp. (21). Używając polimerazy RNA związanej z kwasem dezoksyrybonukleinowym sprawdzali oni, który z 4-ch trójfosforanów rybonukleotydowych, niezbędnych w tym systemie do syntezy, może być zastąpiony przez odpowiednią pochodną związku II lub związku III. Z tych dwóch związków tylko jeden — trójfosforan hydroksycytydyny (pochodna związku III) — może być wbudowany do powstającego łańcucha polimeru, przy

tym nie zastępuje on UTP, na co wskazywałyby doświadczenia poprzednich autorów, a CTP. Tak więc zachowanie się reszt hydroksycytozyny w tym samym układzie biologicznym zależy od tego czy służą one jako matryca (hydroksycytozyna = uracylowi), czy jako substrat (hydroksycytozyna = cytozynie). W świetle tych doświadczeń widać, na co już niektórzy autorzy zwracali uwagę (112), że nie włączanie dXTP do DNA w układzie *in vitro* (9) często uważane za dowód braku mutagenicznych właściwości ksantozyny, niekoniecznie o tym świadczy. Nie wiadomo jak oddziaływałyby reszty ksantozyny wbudowane w łańcuch polinukleotydowy stanowiący matrycę.

#### IV. Wpływ mutagenów na strukturę polimerów

##### 1. Teorie powstawania mutacji

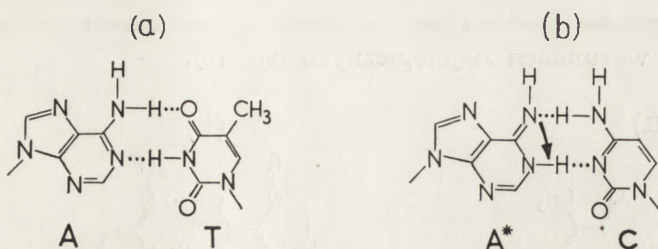
Wszystkie teorie, które dotyczą mechanizmów powstawania mutacji prowadzących do tranzykcji par zasad, stanowią pewną modyfikację teorii błędu parowania (ang. *pairing mistake*) Watsona i Cricka (118, 119). Teoria ta jako próba wytłumaczenia mutacji spontanicznych, została przedstawiona równocześnie z modelem podwójnej spirali DNA i jest na tym modelu oparta.

Jak wiadomo DNA składa się z dwóch nici polinukleotydowych połączonych wiązaniami wodorowymi, występującymi między określonymi parami zasad. Tymina tworzy kompleksy z adeniną, a cytozyna lub 5-hydroksymetylocytozyna z guaniną. Podczas replikacji specyficzność tworzenia wiązań wodorowych warunkuje sposób ułożenia zasad dobudowującego się łańcucha. Podstawą teorii błędu parowania jest zdolność zasad kwasów nukleinowych do tautomerii. Zasady kwasów nukleinowych zależnie od *pH* środowiska mogą występować w dwóch różnych formach. Tylko jedna z tych form występuje w strukturze dwuniciowego DNA, właściwości do kompleksowania drugiej formy nie są znane. Watson i Crick wysunęli przypuszczenie, że w pewnych warunkach dana zasada może przekształcić się w taką rzadko występującą formę tautomeryczną, co prawdopodobnie powoduje zmianę właściwości kompleksowania i w czasie replikacji może prowadzić do zamiany dobudowującego się nukleotydu. Na schemacie 3a para AT ma formę występującą w kwasach nukleinowych, schemat 3b przedstawia adeninę w rzadko występującej formie tautomerycznej oraz sposób, w jaki przypuszczalnie może ona połączyć się z cytozyną.

W podobny sposób Freese (30, 31) oraz Litman i Pardee (74) tłumaczą mechanizm mutagenicznego działania bromouracylu (84). Freese rozróżnia przy tym błąd replikacji od błędu inkorporacji. Przy błędzie replikacji BU wbudowywany jest w miejsce tyminy i sama ta zamiana nie powoduje mutacji, zaś podczas replikacji BU w drugiej formie tautomerycznej mylnie kompleksuje się z guaniną, prowadząc do za-



miany pary AT parą GC. Przy błędzie inkorporacji BU jest mylnie wbudowywany zamiast cytozyny, a podczas replikacji zachowuje się jak tymina dobudowując w powstającym łańcuchu adeninę, co prowadzi do tranzycji pary GC do AT.

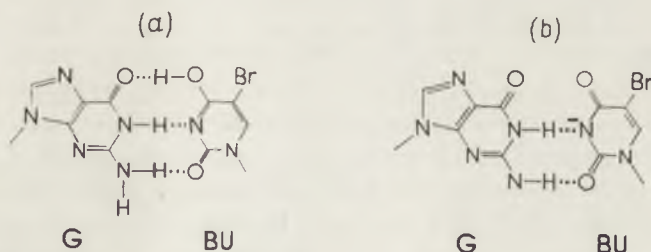


**Schemat 3a, b.** Wytworzenie wiązań wodorowych

(a) między adeniną a tyminą;

(b) po przesunięciu tautomerycznym w adeninie między adeniną a cytozyną (według Watsona i Cricka (118)).

Zwiększoną mutageniczność BU w porównaniu z tyminą Lawley i Brookes (69) upatrują nie w występowaniu innych form tautomerycznych, ale w jonizacji tych zasad. Powodem takich przypuszczeń są znaczne różnice między wartościami  $pK$  tymidyny (9,8) i bromodezoksyurydyny (8,1). Z wartości tych wynika, że prawdopodobieństwo występowania w warunkach fizjologicznych formy zjonizowanej jest większe dla BU (około 8%) niż dla tyminy (około 0,16%). Na schemacie 4 przedstawiono BU w odmianie tautomerycznej i w formie zjonizowanej w kompleksie z guaniną.

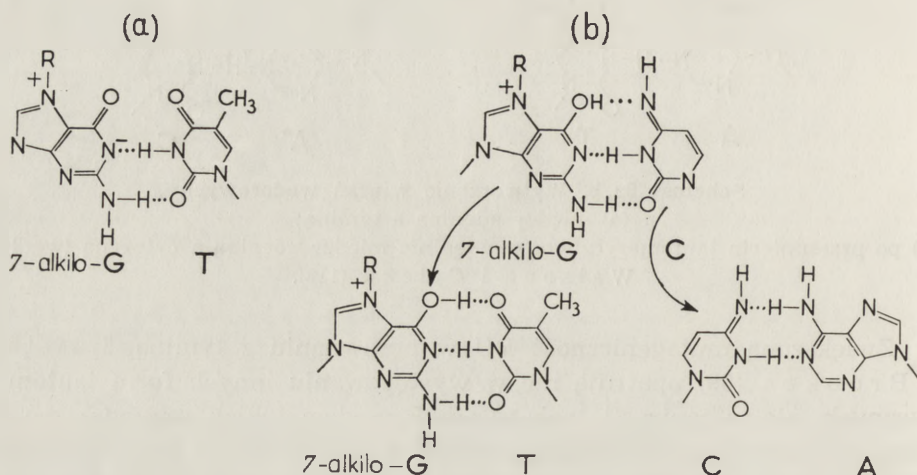


**Schemat 4a, b.** Tworzenie wiązań wodorowych

(a) między guaniną a formą enolową bromouracylu; Litman i Pardee (74);  
(b) między guaniną a formą jonową bromouracylu; Lawley i Brookes (69).

Lawley i Brookes (68), jak też Nagata i wsp. (85) tłumaczą podobnie mutacje zachodzące w wyniku alkilacji  $N_7$  guaniny. Lawley i Brookes przypuszczają, że błąd w kompleksowaniu następuje w wyniku jonizacji 7-alkilo G (schemat 5a), natomiast Nagata i wsp. uważają, że jest on spowodowany zmianą w rozłożeniu gęstości elektronów (schemat 5b). Rysem wyróżniającym ten ostatni model jest założenie, że

właściwości kompleksowania obydwu zasad pary 7-alkilo G : C zmieniają się w wyniku następującego przemieszczenia wiązań wodorowych. Również i w tym przypadku stwierdzenie znacznych różnic między wartościami  $pK$  9,2 dla guanozyny i  $pK$  7,2 dla 7-metylo i 7-etyloguanozyny przemawia za możliwością występowania zjonizowanej formy 7-alkiloganiny w warunkach fizjologicznych (68, 70).



**Schemat 5a, b.** Tworzenie wiązań wodorowych

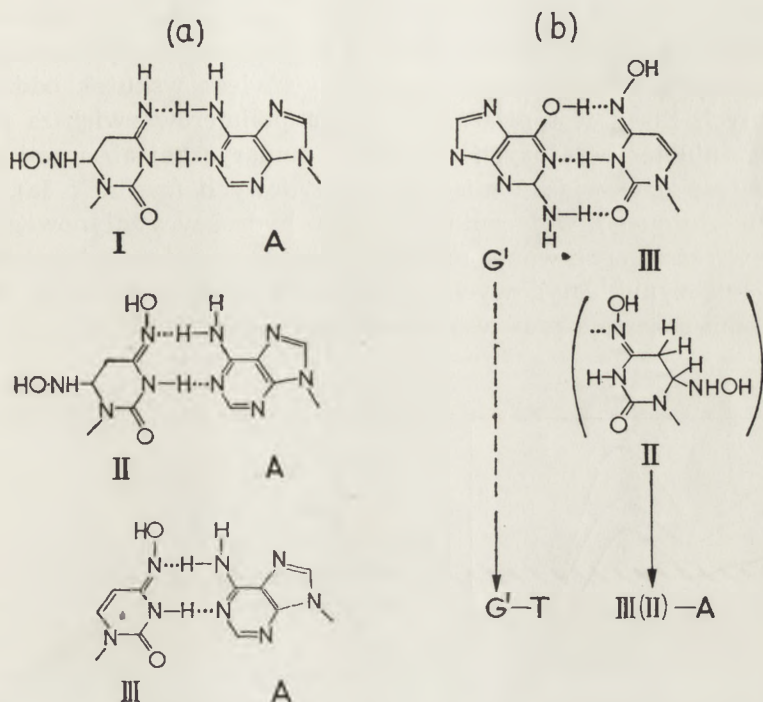
(a) — między formą jonową 7-alkilo-guaniny a tyminą;

(b) — przesunięcie protonów między alkilowaną guaniną a cytozyną oraz wpływ tych zmian na mylne kompleksowanie obydwu zasad w czasie replikacji; B r o o - k e s (12).

Mimo niepewności, który z powstających pod wpływem hydroksylaminy związków (I, II czy III) jest mutageniczny, sądzono, że mutacje wywołane działaniem hydroksylaminy warunkuje ten sam mechanizm, polegający na zmianie właściwości tworzenia kompleksów. O zmienione w stosunku do cytozyny zdolności kompleksowania podejrzewano związek I w formie iminowej (91, 92), a związki II i III w formie oksymoiminowej (34, 62, 89). Proponowano również (podobnie jak w przypadku 7-alkiloganiny) możliwość przemieszczania protonów między związkiem II, lub III a guaniną, które prowadzą do zmian w kompleksowaniu obydwu zasad, pierwotnie połączonych wiązaniami wodorowymi (67, 86). Wszystkie proponowane sposoby tłumaczenia mutacji (62, 86, 89, 90) zachodzących pod wpływem hydroksylaminy przedstawiono na schemacie 6a i b.

Ujemnym rysem tych teorii jest brak poparcia doświadczalnego. O ile teorię udziału wiązań wodorowych w budowie podwójnej spirali można łatwo sprawdzić (zmieszanie w odpowiednich warunkach dwóch polimerów składających się z zasad komplementarnych prawie natychmiast prowadzi do utworzenia kompleksu dwuniciowego (25, 117)), o tyle jak do-

tychczas nie udało się doświadczalnie potwierdzić istnienia kompleksów wytworzonych z zasad, które o zdolność do kompleksowania podejrzewano. Jedynymi dowodami, które mogą stanowić poparcie dla tego rodzaju przypuszczeń, są wspomniane dane o różnicach w wartościach  $pK$  między bromodezoksyurydyną a tymidyną i między 7-alkilo-guanozyną a guanozyną oraz różnice w rozmieszczeniu gęstości elektronów w guaninie po alkilacji i cytozynie, lub hydroksymetylocytozynie po wprowadzeniu grupy hydroksylaminowej (69, 70, 85, 86). Jednak te fakty nie mogą być uznane za równoznaczne ze stwierdzeniem zmian specyficznych zdolności kompleksowania.



**Schemat 6a, b.** (a) — proponowane sposoby wytwarzania kompleksów między pochodnymi hydroksylaminy a adeniną;

(b) — zmiany w rozmieszczeniu wiązań wodorowych i wpływ tych zmian na błędy w kompleksowaniu.

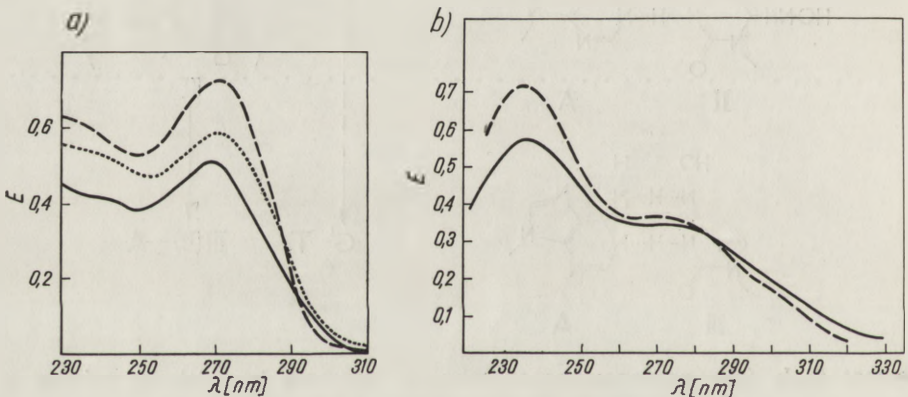
Z badań nad kompleksami wytworzonymi między resztami bromouracylu i adeniny w układach monomerycznych (64), czy w kompleksach trójniciowych: poli A : 2 poli BU (4, 81) wynika, że siła wiązań wodorowych między komplementarną parą zasad bromouracyl : adenina jest nawet wyższa, niż wiązań między parą zasad tymina : adenina. Kompleksy wytworzone między poli 7-MeG i poli C dysocjują w znacznie niższej temperaturze ( $T_m = 69^\circ$ ) niż kompleksy poli G z poli C ( $T_m = 90^\circ$ ), ale przesunięcie stałej dysocjacji reszt 7-metyloguaniny związanych w polimerze

do  $pK$  ponad 10 (84), podważa koncepcję powiązania zmian mutagenicznych ze zwiększoną częstością występowania formy zjonizowanej w warunkach fizjologicznych.

Zmiany właściwości fizykochemicznych i zdolności tworzenia kompleksów zachodzące na skutek wymiany grupy aminowej cytozyny na hydroksylaminową (54, 55, 56, 57) zostaną omówione w rozdziałach następnych.

## 2. Wpływ grupy hydroksylaminowej na konfigurację poli C

Poli C podobnie jak inne polimery wykazują pewien stopień uporządkowania struktury. Ich absorpcja w UV nie równa się sumie absorpcji poszczególnych składników nukleotydowych, lecz wskutek oddziaływań wzajemnych zasad jest niższa. Absorpcja polimerów zwiększa się przy podwyższaniu temperatury, i dorównuje sumarycznej absorpcji składników po rozpadzie wiązań międzynukleotydowych (rysunek 5a). Widmo polimeru złożonego wyłącznie z kwasu hydroksycytydynowego — poli HAC — w czasie ogrzewania nie ulega zmianom, natomiast po rozpadzie wiązań międzynukleotydowych absorpcja wzrasta głównie w 235 nm, a w 270 nm pozostaje prawie bez zmiany (rysunek 5b).



**Rys. 5a, b.** (a) — Widmo absorpcyjne poli C oznaczone w  $t^{\circ}$  pok. (—), w  $85^{\circ}\text{C}$  (···) i po rozpadzie na nukleotydy (---);

(b) — widmo poli HAC w  $t^{\circ}$  od  $0^{\circ}$ — $80^{\circ}\text{C}$  (—) i po rozpadzie na nukleotydy (---). Warunki oznaczania: 0,01M bufor fosforanowy  $pH$  7,8, 0,1M NaCl. Według Janion i Sugar (56).

W  $pH$  3,0 do 5,0 poli C tworzy półprotonowaną, uporządkowaną strukturę (1, 48, 51, 65), której formowanie uniemożliwia oznaczenie wartości  $pK$  metodą stosowaną w przypadku monomerów (98) poprzez badanie zmian absorpcji w widmie UV jako funkcji  $pH$ . Natomiast widmo poli HAC przy zmianie  $pH$  zmienia się w sposób ciągły, poszczególne krzywe zbiegają się w punktach izobestycznych. Świadczy to o braku zdolności

do tworzenia w warunkach kwaśnych półprotonowanej struktury i pozwala na oznaczenie wartości  $pK$  reszt hydroksycytozyny związanych w polimerze ( $pK = 2,7$ ) (55, 56). Zmiany ekstynkcji po rozpadzie wiązań międzynukleotydowych w poli HAC, jak i różnice między wartościami  $pK$  reszt hydroksycytozyny wolnych ( $pK = 2,26$ ) i związanych w polimerze ( $pK = 2,7$ ) mogą wskazywać na istnienie pewnej struktury w poli HAC, powstającej prawdopodobnie w wyniku wzajemnego przylegania zasad (ang. *base stacking*).

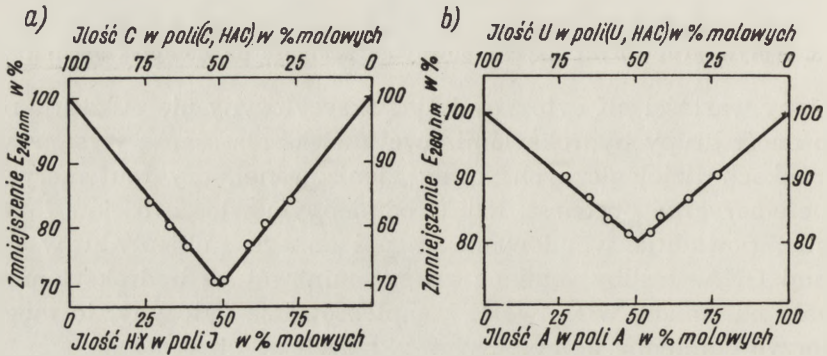
### 3. Wpływ grupy hydroksylaminowej na zdolność do kompleksowania

Zmiany wartości  $pK$  cytozyny i hydroksycytozyny nie wskazują na to, aby obecność grupy hydroksylaminowej zwiększała szansę występowania w warunkach fizjologicznych formy zjonizowanej, czy tautomerycznej, której efemeryczna obecność, dzięki odmiennym właściwościom kompleksowania, powoduje wbudowanie niepożądanego nukleotydu w czasie replikacji DNA. Jeśliby zamiana grupy aminowej na hydroksylaminową wpływała na zmianę właściwości kompleksowania cytozyny, to mogłyby się tworzyć odmienne kompleksy w układach *in vitro*.

Okazało się jednak, że poli HAC i polimer zbudowany z reszt hydroksylamino-hydroksycytidynowych (poli 2HAC, związek II) którego udziału w mutagenezie spowodowanej modyfikacją reszt cytozynowych nie da się wykluczyć, nie tylko tracą zdolność tworzenia kompleksów z poli I (partnerem komplementarnym poli C), lecz także nie kompleksują z żadnym z innych badanych polimerów jak poli A, poli U, czy poli C (56). Te wyniki następnie potwierdzono badając zachowanie się reszt hydroksycytozyny występujących w tak zwanych kopolimerach, w których obok reszt hydroksycytozyny występuje inna zasada o znanej zdolności kompleksowania czyli w warunkach bardziej zbliżonych do naturalnych (54, 55, 56, 57).

Pierwsze badania nad kompleksowaniem kopolimerów przeprowadzili Fresco i Alberts (41), którzy wykazali, że reszty uracylu w kompleksie wytworzonym między kopolimerem AU a poli U nie zajmują miejsc wewnątrz struktury dwuniciowej co by unieczynniało część niekomplementarnych reszt U na przeciwległym łańcuchu, ale wysuwają się na zewnątrz w formie pętli (ang. *loops*). Wytwarzanie kompleksów między kopolimerami, a polimerami jest dogodną metodą stwierdzenia komplementarności zasad, których siła wiązania jest zbyt niska dla utworzenia trwałych kompleksów między homopolimerami (11, 93). Dowodem tworzenia kompleksu jest obniżenie absorpcji występujące po zmieszaniu dwóch polimerów. Obliczenie stosunku stechiometrycznego zasad wchodzących w skład budowy kompleksu przy osiągnięciu najniższego spadku absorpcji, daje odpowiedź czy wszystkie czy tylko część zasad występujących w kopolimerze biorą udział w wytwarzanym kompleksie.

Ta metoda została wykorzystana dla sprawdzenia zdolności komplementarnych reszt hydroksycytozyny (57). Do badań używano dwa rodzaje kopolimerów; poli (C,HAC) dla sprawdzenia czy hydroksycytozyna wykazuje zdolności kompleksowania podobne do cytozyny i poli (U,HAC) w celu przekonania się czy hydroksycytozyna zgodnie z teorią tranzycji zachowuje się podobnie jak uracyl. Rysunek 6a i b przedstawia niektóre z otrzymanych wyników: krzywą mieszania (ang. *mixing curve*) uzyskaną po zmieszaniu w różnych proporcjach poli (C,HAC) zawierającego 80%



Rys. 6a, b. Krzywe mieszania (a) — poli (C, HAC) (20% reszt HAC) z poli I; (b) — poli (U, HAC) (23% reszt HAC) z poli A.

Warunki: 0,01M bufor fosforanowy, 0,1M NaCl. Według Janion i Sugar (57).

reszt cytozyny i 20% reszt hydroksycytozyny z poli I, oraz krzywą mieszania poli (U,HAC) o 77% zawartości reszt uracylu i 23% zawartości reszt hydroksycytozyny z poli A. W obydwu przypadkach w obliczeniach stechiometrycznych pomijano występujące w kopolimerach reszty hydroksycytozyny. W obydwu doświadczeniach najniższy spadek absorpcji występuje wtedy, gdy suma reszt cytozyny w poli (C,HAC) (względnie suma reszt uracylu w poli (U,HAC)) równoważy sumę reszt hipoksantyny w poli I (względnie reszt adeniny w poli A). Otrzymane wyniki potwierdzają dane uzyskane uprzednio w próbach kompleksowania reszt hydroksycytozyny w homopolimerach; nieobecność wystarczająco silnych wiązań wodorowych zdolnych do utrzymania struktury dwuniciowej między resztami hydroksycytozyny a hipoksantyny, ani między resztami hydroksycytozyny a adeniny.

## V. Zakończenie

Z zestawionych danych wynika, że mechanizm zmian prowadzących do mutacji nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Pomijając mutacje, których przyczyną jest bezpośrednia zamiana cytozyny na uracyl, czy adeniny na guaninę, nie ma doświadczalnych podstaw dla twierdzenia, że zmiana komplementarności zasad powoduje błąd w zapisie genetycznym.

Wydaje się, że aby dać odpowiedź na pytanie jakie istnieją powiązania między modyfikacją zasad, a wbudowaniem nieprawidłowego nukleotydu do kwasów nukleinowych, konieczna jest dokładniejsza znajomość roli systemu enzymatycznego w syntezie kwasów nukleinowych. Czy wystarczającym czynnikiem selekcji zgodnie z teorią Watsona i Cricka jest komplementarność zasad czy też polimeraza DNA bierze udział w rozpoznawaniu i selekcji zasad syntetyzowanych nukleotydów. Jest to zagadnienie niełatwe do rozwiązania. Na udział polimerazy DNA w selekcji zasad wskazują Speyer i wsp. (107, 108), którzy stwierdzili znaczne zwiększenie częstości rewersji wśród mutantów faga T<sub>4</sub> zawierających zmutowany gen polimerazy DNA. Według Freese i Bautz-Freese (37) zwiększona częstość mutacji może być tłumaczona mniejszym powinowactwem zmutowanego enzymu do części cukrowo-fosforanowej wskutek czego nawet przy braku lub nieprawidłowych wiązaniach między zasadami, niewłaściwa zasada może być wbudowana do DNA. Za wnioskami Speyera i wsp. przemawiają wyniki Halla i wsp. (49, 50), którzy porównywali działanie polimerazy DNA wyodrębnionej ze szczepu dzikiego i szczepu zmutowanego w układach *in vitro*. Zmutowana polimeraza w porównaniu z normalną wykazuje kilkakrotnie zwiększoną częstość włączania T do poli dC, przy jednakowej częstości włączania C do poli dAT. Autorzy uważają, że w tym przypadku mutacja obejmuje tylko zmianę częstości transwersji G do T i że fakt ten stanowi dowód udziału enzymu w zapewnieniu prawidłowości dobudowywania komplementarnych zasad (50). Badania innych reakcji enzymatycznych zależnych od matryc polinukleotydowych jak synteza RNA, czy synteza białka stanowią inną drogę wyjaśnienia udziału wiązań wodorowych w tych procesach i jego uzależnienia od zmian mutacyjnych. Badania te mogą okazać się jeszcze bardziej owocne, jeśli zastosuje się syntetyczne matryce pozwalające na uniknięcie reakcji ubocznych, a nie matryce naturalne zmodyfikowane czynnikami mutagenicznymi.

Prace własne omawiane w niniejszym przeglądzie zostały wykonane przy częściowym poparciu *Wellcome Trust*, Światowej Organizacji Zdrowia, oraz *Agricultural Research Service*, U.S. Dept. of Agriculture (UR-E21-/32/-30).

#### LITERATURA

1. Akinrimisi E. O., Sander C., Ts'o P.O.P., *Biochemistry* 2, 340 (1963).
2. Anagnostopolus C., Crawford J. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 47, 378 (1961).
3. Auerbach C., Robson J. M., *Nature* 157, 302 (1946).
4. Barszcz D., Shugar D., *European J. Biochem.* 5, 91 (1968).
5. Bautz E., Freese E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 46, 1585 (1960).
6. Bautz-Freese E., Freese E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 52, 1289 (1964).
7. Becker E. F., Jr., Zimmerman B. K., Geiduschek E. P., *J. Mol. Biol.* 8, 377 (1964).

8. Bendich A., *The Nucleic Acids*, red. E. Chargaff, J. N. Davidson, Academic Press. 1955, tom 1, str. 81.
9. Bessman M. J., Lehman J. R., Adler J., Zimmerman S. B., Simms E. S., Kornberg A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **44**, 633 (1958).
10. Brenner S., Barnett L., Crick F. H. C., Orgel A., *J. Mol. Biol.* **3**, 121 (1961).
11. Brimacombe R. L. C., Reese C. B., *J. Mol. Biol.* **18**, 529 (1966).
12. Brookes P., *Chemotherapy of Cancer*, red. P. A. Plattner. Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1964, str. 32.
13. Brookes P., Lawley P. D., *Biochem. J.* **80**, 496 (1961).
14. Brookes P., Lawley P. D., *J. Chem. Soc.* str. 3923 (1961).
15. Brookes P., Lawley P. D. *Biochem. J.* **89**, 138 (1963).
16. Brookes P., Lawley P. D., *Exptl. Cell Res. (Suppl.)* **9**, 521 (1963).
17. Brown D. M., Hewlins J. E., *J. Chem. Soc.* str. 1922 (1968).
18. Brown D. M., Phillips J. H., *J. Mol. Biol.* **11**, 663 (1965).
19. Brown D. M., Schell P., *J. Mol. Biol.* **3**, 709 (1961).
20. Brown D. M., Schell P., *J. Chem. Soc.* str. 208 (1965).
21. Budowsky E. I., Swerdlov E. D., Osterman L. A., Sympozjum „Molekularnaja Biologija” Moskwa 12—17 VI 1967.
22. Budowsky E. I., Sverdlov E. D., Shibaeva R. P., Monastyrskaya G. S., Kochetkov N. K., *Molekularnaja Biologia* **2**, 329 (1968).
23. Champe S. P., Benzer S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 532 (1962).
24. Crick F. H. C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R. J., *Nature* **192**, 1227 (1961).
25. Davies D. R., Rich A., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1003 (1958).
26. Doskocil J., Sormowa Z., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 313 (1963).
27. Dunn D. B., Smith J. D., *Nature* **174**, 305 (1954).
28. Fox C. F., Robinson N. S., Haselkorn R., Weiss S. B., *J. Biol. Chem.* **239**, 186 (1964).
29. Franklin R. M., Wecker E., *Nature* **184**, 343 (1959).
30. Freese E., *J. Mol. Biol.* **1**, 87 (1959).
31. Freese E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **45**, 622 (1959).
32. Freese E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 540 (1961).
33. Freese E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 845 (1961).
34. Freese E., *Molecular Genetics*, red. J. H. Taylor Część I, Academic Press, New York 1963, str. 207.
35. Freese E., Bautz-Freese E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 845 (1961).
36. Freese E., Bautz-Freese E., *Biochemistry* **4**, 2419 (1965).
37. Freese E., Bautz-Freese E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 650 (1967).
38. Freese E., Bautz-Freese E., Bautz E., *J. Mol. Biol.* **3**, 133 (1961).
39. Freese E., Bautz-Freese E., Graham S., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 17 (1966).
40. Freese E., Strack H. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1796 (1962).
41. Fresco J. R., Alberts B. N., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 311 (1960).
42. Geiduschek E. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 950 (1961).
43. Geiduschek E. P., *J. Mol. Biol.* **4**, 467 (1962).
44. Geiduschek E. P., w dyskusji nad pracą P. Brookes, P. D. Lawley, *J. Cell. Phys. Suppl.* **1**, **64**, 111 (1964).
45. Gierer A., Mundry K. W., *Nature* **182**, 1457 (1958).
46. Goldacre R. J., Loveless A., Ross W. C. J., *Nature* **163**, 667 (1949).
47. Gottschling H., Freese E., *Z. Naturforsch.* **16b**, 515 (1961).
48. Guschlbauer W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1441 (1967).



49. Hall Z. W., Anraku N., Lehman I. R., *Federation Proc.* **27**, Nr 1024 (1968).
50. Hall Z. W., Lehman I. R., *J. Mol. Biol.* **36**, 321 (1968).
51. Hartman K. A., Rich A., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 2033 (1965).
52. Janion C., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **12**, 337 (1965).
53. Janion C., Shugar D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 617 (1965).
54. Janion C., Shugar D., Abstracts of Fifth FEBS Meeting, Praha 1966, str. 282.
55. Janion C., Shugar D., Primul Simpozion National Acidii Nucleici Biologic Activi Centrul de Documentare AL Academici Republicii Socialiste Romania 1967, str. 85.
56. Janion C., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **15**, 107 (1968).
57. Janion C., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **16**, 219 (1969).
58. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., Sverdlov E. D., Shibaeva R. P., Shibaev V. N., Monastyrskaya G. S., *Tetrahedron Letters* **34**, 3253 (1967).
59. Kotaka T., Baldwin R. T., *J. Mol. Biol.* **9**, 323 (1964).
60. Kozloff L. M., Lute M., Henderson K., *J. Mol. Biol.* **228**, 511 (1957).
61. Krieg D. R., *Genetics* **48**, 561 (1963).
62. Krieg D. R., *Progress in Nucleic Acid Research*, red. J. N. Davidson, W. E. Cohn. Academic Press, New York 1963, tom 2, str. 125.
63. Krieg E., Emmelot P., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 59 (1964).
64. Kyogoku Y., Lord R. C., Rich A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 250 (1966).
65. Langridge R., Rich A., *Nature* **198**, 725 (1963).
66. Lawley P. D., *Proc. Chem. Soc. str.* 290 (1957).
67. Lawley P. D., *J. Mol. Biol.* **24**, 75 (1967).
68. Lawley P. D., Brookes P., *Nature* **192**, 1081 (1961).
69. Lawley P. D., Brookes P., *J. Mol. Biol.* **4**, 216 (1962).
70. Lawley P. D., Brookes P., *Biochem. J.* **89**, 127 (1963).
71. Lawley P. D., Brookes P., cytowane przez P. D. Lawleya w *Acidi nucleici e loro funzione biologica* Institute Lombardo: Fondazione Baselli, 1964, str. 25.
72. Litman R. M., *J. Chem. Phys.* **58**, 997 (1961).
73. Litman R. M., Pardee A. B., *Nature* **178**, 529 (1956).
74. Litman R. M., Pardee A. B., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 131 (1960).
75. Lonngridge R., Marmur J., *Science* **143**, 1450 (1964).
76. Loveless A., *Genetic and Allied Effects of Alkylating Agents*, Butterworths Londyn, 1966.
77. Loveless A., Stock J. C., *Proc. Roy. Soc. B* **150**, 423 (1959).
78. Loveless A., Wheatley P., dane niepublikowane cytowane według A. Loveless *Genetic and Allied Effects of Alkylating Agents* — Butterworths. Londyn, 1966, str. 137.
79. Ludlum D. B., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 674 (1965).
80. Ludlum D. B., Warner R. C., Wahba A. J., *Science* **145**, 397 (1964).
81. Massoulie J., Michelson A. M., Pochon F., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 16 (1966).
82. McCalla D. R., *Biochim. Biophys. Acta* **155**, 114 (1968).
83. Michelson A. M., Monny C., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 460 (1966).
84. Michelson A. M., Pochon F., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 469 (1966).
85. Nagata C., Imamura A., Saito H., Fukui K., *Gann.* **54**, 109 (1963).
86. Nagata C., Martensson O., *J. Theoret. Biol.* **19**, 133 (1968).
87. Nester E. W., Ledeborg J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 52 (1961).

88. Okada Y., Terzaghi E., Streisinger G., Emrich J., Inouye M., Tsugita A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 1692 (1966).
89. Orgel L. E., *Advan. Enzymol.* **27**, 289 (1965).
90. Phillips J. H., Brown D. M., *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Academic Press Inc, New York 1967, tom 7, str. 349.
91. Phillips J. H., Brown D. M., Adman R., Grossman L., *J. Mol. Biol.* **12**, 816 (1965).
92. Phillips J. H., Brown D. M., Grossman L., *J. Mol. Biol.* **21**, 405 (1966).
93. Rabczenko A., Szer W., *Acta Biochim. Polon.* **14**, 369 (1967).
94. Rhaese H. J., Freese E., *Biochim. Biophys. Acta* **155**, 476 (1968).
95. Rhaese H. J., Freese E., Melzer M. S., *Biochim. Biophys. Acta* **155**, 491 (1968).
96. Shapiro R. J., *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 2948 (1964).
97. Shapiro R., Pohl S. H., *Biochemistry* **7**, 448 (1968).
98. Shugar D., Fox J. J., *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 199 (1952).
99. Schuster H., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **2**, 320 (1960).
100. Schuster H., *J. Mol. Biol.* **3**, 447 (1961).
101. Schuster H., *Virology* **19**, 421 (1963).
102. Schuster H., Vielmutter W., *J. Chim. Phys.* **58**, 1005 (1961).
103. Schuster H., Wilhelm R. C., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 554 (1963).
104. Singer B., Frankel-Conrat H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 234 (1967).
105. Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **1**, 43 (1959).
106. Sinsheimer R. L., *Nucleic Acid Red. E. Chargaff, J. N. Davidson Academic Press Inc., New York 1960, tom 3, str. 187.*
107. Speyer J. F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 6 (1965).
108. Speyer J. F., Karam J. D., Lenny A. B., *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **31**, 693 (1966).
109. Stevens A., Henry J., *J. Am. Chem. Soc.* **239**, 196 (1964).
110. Terzaghi E., Okada Y., Streisinger G., Inouye M., Tsugita A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 500 (1966).
111. Tessman I., *J. Mol. Biol.* **5**, 442 (1962).
112. Tessman I., Poddar R. K., Kumar S., *J. Mol. Biol.* **9**, 352 (1964).
113. Valdo M., Cradock M. R. C., *Abstracts of Fifth FEBS Meeting, Praha 1968, str. 305.*
114. Verwoerd D. W., Kohlhage H., Zillig W., *Nature* **192**, 1038 (1961).
115. Wielmutter W., Schuster H., *Z. Naturforsch.* **15b**, 304 (1960).
116. Wacker A., Kirschfeld S., Träger L., *J. Mol. Biol.* **2**, 241 (1960).
117. Warner R. C., *J. Biol. Chem.* **229**, 711 (1957).
118. Watson J. D., Crick F. H. C., *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **18**, 123 (1953).
119. Watson J. D., Crick F. H. C., *Nature* **171**, 964 (1953).
120. Weigert M. G., Garen A., *Nature* **206**, 992 (1965).
121. Wilson R. G., Caicuts M. J., *J. Mol. Biol.* **241**, 1725 (1966).
122. Wyatt G. R., Cohen S. S., *Biochem. J.* **55**, 774 (1953).
123. Yanofsky C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 898 (1965).

## RECENZJE

**W. Kunicki-Goldfinger, Życie Bakterii, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1968, stron 560.**

Podręcznik W. Kunickiego-Goldfingera jest przeznaczony zasadniczo dla studentów biologii. Może on być również wykorzystywany przez studentów medycyny, weterynarii, zootechniki lub wydziału rolnego. Ze względu na szersze opracowanie niektórych części student biochemii i mikrobiologii znajdzie w tym podręczniku wiele ciekawego materiału.

„Życie Bakterii” nie jest klasycznym, tradycyjnym podręcznikiem mikrobiologii. Materiał został wyłożony w formie 16 rozdziałów oraz 2 addendum. Obejmuje on historię mikrobiologii, metody mikrobiologiczne, metabolizm, genetykę, wzajemny wpływ bakterii i środowiska. Poza tym omówiono systematykę bakterii, mikrobiologię stosowaną oraz wirusologię.

Autor potrafił przedstawić nawet trudne zagadnienia w prostej, ciekawej formie. Zrozumienie materiału ułatwia 74 tabel oraz 348 rycin i schematów, między innymi rysunki Szymona Kobylińskiego.

Za ciekawą szatą, przystępną formą, pięknym stylem kryje się dobry, nowoczesnie ujęty wykład mikrobiologii. W wielu miejscach autor przedstawia swoje własne poglądy.

Autor opierał się na piśmiennictwie do 1967 roku włącznie. Od tego czasu poglądy na pewne zagadnienia uległy zmianom: na przykład na stronie 102—3 autor podaje, że „Nić DNA w nukleoidzie nie występuje w połączeniu z białkami związanymi z DNA...”. Badania Roaf i Bonnera (1968) wykazały obecność nukleoproteidów w nukleoidach bakteryjnych. Przy tym stwierdzono, że podobnie do histonów białka te hamują syntezę RNA. Na str. 283 zakradła się nieścisłość, że kolicyny powodują lizę bakterii.

W następnym wydaniu byłoby pożądane rozszerzenie materiału poświęconego mechanizmowi działania antybiotyków.

Te drobne uwagi nie pomniejszają dużej wartości tego nowoczesnego podręcznika.

*Z. Lorkiewicz*

1914

W. J. ... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

R. Jusiak, P. Począpko — Metabolizm zwierząt stałocieplnych a metabolizm izolowanych tkanek . . . . .	487
J. Sliwowski — Mechanizmy reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami. B. Metody badania . . . . .	507
K. Szyborski — O możliwości występowania oddziaływań donorowo-akceptorowych w układach biologicznych . . . . .	531
S. Szala, J. Filipiński — Stabilność struktury drugorzędowej DNA . . . . .	551
I. Szumiel — Regulacja transkrypcji genów u zwierząt . . . . .	565
C. Janion — Teorie mutagenyzy chemicznej w świetle badań nad mutagenicznym działaniem hydroksylaminy . . . . .	591
Recenzja książki (Z. Lorkiewicz) . . . . .	613

W 1-szym zeszycie 16 tomu ukażą się:

1. Kalcytonina, jej własności i rola w homeostazie wapnia, *J. Geisler*
2. Renina i angiotensyna, *J. Tomaszewski, K. Woźniak*
3. Działanie „transportowe” insuliny a synteza białek, *K. Wiśniewski*
4. Tkankowe enzymy kolagenolityczne, *E. Bańkowski, W. Gałasiński*
5. Udział lipidów i lipoproteidów w procesie hemostazy, *K. Worowski, R. Farbiszewski*
6. Jony w katalizie enzymatycznej, *G. Muszyńska*
7. Fosfohydrolazy monoestrów ortofosforanowych, *E. Dziembor*
8. Inhibitory trypsyny pochodzenia roślinnego, *J. Janicki, J. Warchalewski, J. Kowalczyk, J. Skupin*
9. Układ biosyntezy białka u bakterii termo- i psychrofilnych, *E. Krajewska*

## POSTĘPY BIOCHEMII

November 1969

### ARTICLES IN POLISH

R. Jusiak, P. Poczopko — Metabolism of Homeothermic Animals and Metabolism of Their Isolated Tissues (Inst. Animal Physiol. Nutr., Pol. Acad. Sci., Jabłonna) . . . . .	487:7
J. Śliwowski — Mechanism of Enzymic Reactions with Two or More Substrates and Products (Dep. Biochem. Univ., Warszawa) . . . . .	507:7
K. Szyborski — On the Possibility of Donor-Acceptor Interactions in Biological Systems (Dep. Biophys. Univ., Warszawa) . . . . .	531:1
S. Szala, J. Filipski — Stability of Secondary Structure of DNA (Inst. Oncol., Gliwice) . . . . .	551:1
I. Szumił — Regulation of gene translation in Animals (Inst. Nucl. Res., Warszawa) . . . . .	565:5
C. Janion — Mechanism of Chemical Mutagenesis in the Light of the Mutagenic Action of Hydroxylamine (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	591:1
Chronicle . . . . .	613:3

Należy podawać kolejno: L. p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202, 793 (1953). Wykaz skrótów tytułów czasopism podają *Post. Biochem.* 7, 601 (1961). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, wydawcę, miejsce i rok wydania; np.: Baranowski T., *Podręcznik Biochemii*, PZWL, Warszawa 1963. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule 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, Academic Press, New York 1957, str. 680.

## SPIS TREŚCI

R. Jusiak, P. Poczopko—Metabolizm zwierząt stałocieplnych a metabolizm izolowanych tkanek . . . . .	487
J. Sliwowski—Mechanizmy reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami. B. Metody badania . . . . .	507
K. Szyborski—O możliwości występowania oddziaływań donorowo-akceptorowych w układach biologicznych . . . . .	531
S. Szala, J. Filipiński—Stabilność struktury drugorzędowej DNA . . . . .	551
I. Szumiel—Regulacja translacji genów u zwierząt . . . . .	565
C. Janion—Teorie mutagenyzy chemicznej w świetle badań nad mutagenicznym działaniem hydroksylaminy . . . . .	591
Recenzja książki (Z. Lorkiewicz) . . . . .	613