

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1969
tom 15
nr 2

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, opatrzonej kolejnym numerem odpowiadającym użytemu w tekście, np. Tablica 1, Wzór I, Rys. 1 lub Schemat 1. Fotografie i wykresy należy oznaczyć jako rysunki. Wszystkie załączniki należy oznaczyć u góry nazwiskiem autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

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

Podpisy i objaśnienia pod rysunkami i schematami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można napisać na wykresie, 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

Jaduley

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIŁKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1969
tom XV
zeszyt 2

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: B. Filipowicz (Łódź)
Członkowie: J. Chmiel (Poznań), W. Gajewski (Warszawa),
Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen
(Wrocław), J. Pawelkiewicz (Poznań), T. Szczepkowski (Kra-
ków), J. Trojanowski (Lublin), K. L. Wierzchowski (War-
szawa)

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 1968

Nakład 2050 (1927)+125	Oddano do składania 29.I.1969 r.
Ark. wyd. 13.0 ark. druk. 10,75	Podpisano do druku w czerwcu
Papier druk. sat. kl. V, 70 × 100	Druk ukończono w czerwcu
Cena zł 20.—	Zam. nr 241/69 P-95.

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

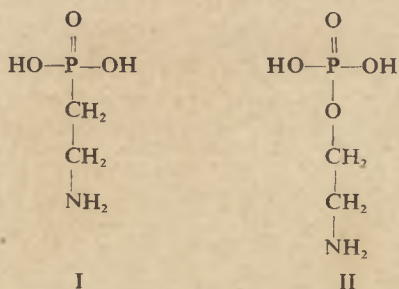
PRZEMYSŁAW MASTALERZ *

Biochemia wiązania fosfor-węgiel

The Biochemistry of Carbon-Phosphorus Bond

A review of natural occurrence and metabolism of compounds with P-C bond, covering literature as of February 1968.

Wśród drobnocząsteczkowych składników żywej materii spotykamy szereg połączeń, których cząsteczki zawierają elementy budowy rzadko występujące w związkach pochodzenia naturalnego. Do takich niepospolitych elementów strukturalnych można zaliczyć na przykład wiązanie potrójne $C\equiv C$ w związkach występujących w niektórych roślinach (14), grupę dwuazową w takich aminokwasach jak azaseryna i 6-aza-5-okso-norleucyna (22), czy wreszcie grupę nitrową (16) i wiązanie węgiel-chlor (1). Związki zawierające te i inne niepospolite w naturze wiązania i grupy atomów można uważać za swego rodzaju osobliwości biochemiczne. Jednym z takich osobliwych połączeń jest odkryta w roku 1959 ciliatyna (33, 34), aminokwas (I), pod względem strukturalnym przypominający taurynę i β -alaninę, a jednocześnie zbliżony budową do fosforanu kolaminy (II).



Rolę grupy kwasowej w tym aminokwasie spełnia grupa fosforanowa $-\text{PO}_3\text{H}_2$. Ciliatyna, czyli kwas 2-aminoetylofosfonowy, zawiera element strukturalny nie spotykany dotychczas wśród składników żywych organizmów, a mianowicie atom fosforu połączony bezpośrednio z atomem węgla. Obecność wiązania P-C sprawia, że ciliatyna jest związkiem fosforowym całkowicie odmiennym od często występujących w naturze estrów

* Doc. dr, Katedra Chemii Organicznej I, Politechnika Wroclawska, Wroclaw.

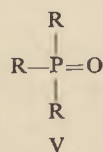
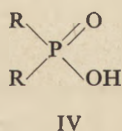
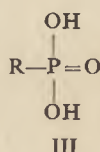
i amidów kwasu fosforowego, w których atom fosforu jest połączony z węglem za pośrednictwem atomu tlenu lub azotu.

Sam fakt występowania wiązania P-C w przyrodzie zasługuje niewątpliwie na uwagę i otwiera pole do interesujących badań nad biosyntezą i rozkładem tego wiązania, ale zainteresowanie tym zagadnieniem pozostałoby zapewne niewielkie, gdyby wiązanie P-C było rzadkością w świecie ożywionym. Okazało się jednak, że związki zawierające fosfor połączone bezpośrednio z węglem są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Tym samym pojawiło się zagadnienie o podstawowym znaczeniu — biochemii wiązania P-C. Jego znaczenie jest tym większe, że uchwytnie ilości ciliatyny występują w tkankach a prawdopodobnie także i w mleku zwierząt przeżuwających. Ponadto znaczne ilości związków zawierających wiązanie P-C wykryto w mięczakach masowo spożywanych przez ludność niektórych rejonów świata (61). Nasuwa się w związku z tym pytanie, jaki jest los tych połączeń w organizmie człowieka.

I. Ogólna charakterystyka związków zawierających wiązanie P-C

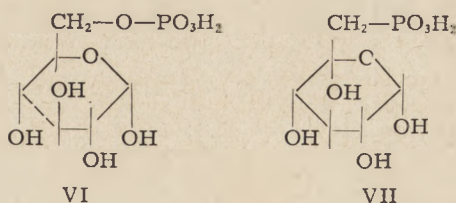
Chemia organiczna zna wiele tysięcy związków zawierających atomy węgla połączone bezpośrednio z atomami fosforu. Ilość znanych połączeń tego typu przewyższa nawet ilość wszystkich innych związków fosforoorganicznych, w których atomy tego pierwiastka są połączone z węglem za pośrednictwem atomów tlenu, siarki czy azotu. Dla prostoty i dla odróżnienia od innych związków fosforoorganicznych wygodnie jest nazywać połączenia zawierające wiązanie P-C związkami fosfonowymi. Nazwa ta zaczyna zdobywać prawo obywatelstwa także w nomenklaturze biochemicznej. Mówi się na przykład o fosfolipidach, w odróżnieniu od zwykłych fosfolipidów (9).

Wśród związków zawierających pięciowartościowy fosfor wyróżniamy trzy zasadnicze typy połączeń: kwasy fosfonowe (III), kwasy fosfinowe (IV) i tlenki fosfin (V). Z biochemicznego punktu widzenia interesujące są zwłaszcza kwasy fosfonowe, ponieważ do tej grupy związków należą wszystkie wykryte dotychczas w przyrodzie połączenia zawierające wiązania P-C.



Kwasy fosfonowe są bliskimi analogami strukturalnymi odpowiednich estrów kwasu fosforowego, od których różnią się tylko brakiem atomu tlenu między fosforem a węglem. Na przykład fosfonowym odpowiedni-

kiem estru glukozy-6-fosforanowego (VI) jest kwas glukozy-6-fosfonowy (VII). Związek ten nie występuje w przyrodzie, otrzymano go jednak syntetycznie (23).



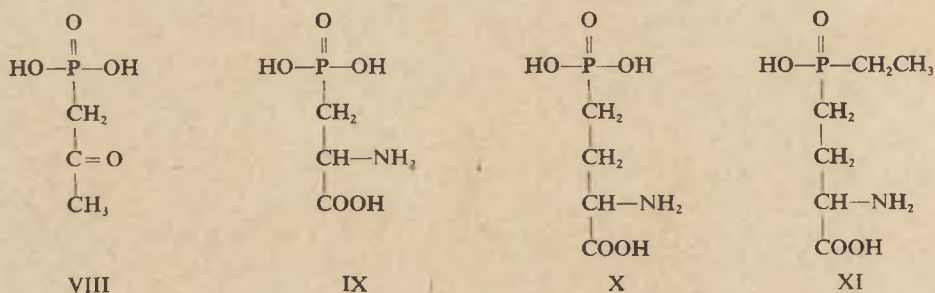
Mimo bliskiego podobieństwa strukturalnego istnieje zasadnicza różnica między kwasami fosfonowymi i odpowiadającymi im estrami kwasu fosforowego. W warunkach, w których wszystkie estry kwasu fosforowego ulegają hydrolizie, typowe kwasy fosfonowe są zupełnie odporne (21, 50, 62), co wykorzystano do wykrywania ich w materiałach biologicznych. Ciliatyna na przykład nie ulega najmniejszym nawet zmianom po 48 godzinach ogrzewania w 8N HCl w temperaturze 150°C (44), względnie po 8 godzinach w 5N NaOH w 120°C (34). Kwasy fosfonowe są także odporne na działanie fosfataz (44, 48, 57).

Poza całkowicie odmiennym zachowaniem się w warunkach hydrolizy kwasy fosfonowe i odpowiadające im budową estry kwasu fosforowego wykazują znaczne podobieństwo własności. Zarówno jedne jak i drugie są średnio mocnymi kwasami dwuzasadowymi. Rozmiary cząsteczek różnią się tylko nieznacznie, a polarność ich jest praktycznie taka sama. Dzięki temu kwasy fosfonowe mogą być przyłączane przez centra aktywne enzymów katalizujących przemiany odpowiednich estrów kwasu fosforowego. W przypadku fosfataz prowadzi to do kompetycyjnego hamowania reakcji enzymatycznej (48, 57). Na zasadzie podobieństwa strukturalnego ciliatyna może zastępować fosforan kolaminy w reakcjach enzymatycznej syntezy fosfolipidów (15, 38, 39).

Szczególnie wyraźnych przykładów podobieństwa własności dostarczyły badania nad syntetycznymi fosfolipidami i odpowiadającymi im fosfolipidami. Według Baera i Jagannadha Rao (4) L- α -dwumyristoilolecytyna i jej fosfonowy analog zawierający ciliatynę zamiast fosforanu kolaminy nie mogą być rozdzielone za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej na żelu krzemionkowym przy użyciu sześciu różnych układów rozpuszczalników. Ciliatynę i fosforan kolaminy również trudno jest rozróżnić za pomocą chromatografii i elektroforezy bibułowej (29).

Charakterystyka kwasów fosfonowych byłaby jednak niepełna, zwłaszcza z biochemicznego punktu widzenia, gdyby nie uwzględniała połączeń o wyjątkowych własnościach, wykazujących niezwykłą dla tego typu związków nietrwałość wiązania P-C. Przede wszystkim należy tu wymienić kwasy β -ketofosfonowe, które łatwo ulegają rozkładowi z wydzielaniem fosforanu nieorganicznego. Na przykład próba otrzymania kwasu

2-ketopropanofosfonowego (VIII) przez hydrolizę jego estru doprowadziła do powstania acetonu, kwasu fosforowego i alkoholu jako jedynych produktów reakcji (51). Podobną skłonność do rozkładu wiązania P-C wykazują kwasy α -ketofosfonowe.



Labilny charakter wiązania P-C w kwasach ketofosfonowych sugeruje mechanizm degradacji aminokwasów fosfonowych występujących w przyrodzie. Mogłyby one być przekształcone na drodze utleniania albo transaminacji w nietrwałe ketokwasy, rozkładające się z rozerwaniem wiązania P-C.

II. Chemiczne własności aminokwasów fosfonowych

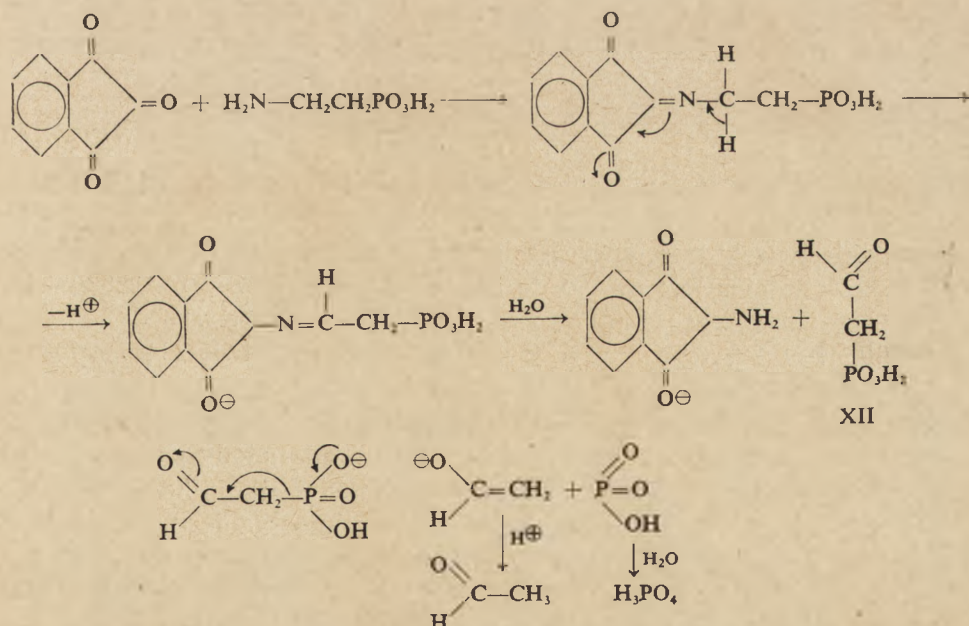
Aminokwasy fosfonowe były znane zanim odkryto je w przyrodzie, głównie dzięki pracom Chavane (18, 19), Kosolapoffa (49, 50) oraz Kabacznika i Medwed (36). Na szczególne podkreślenie zasługują prace Chavane, który pierwszy zastanawiał się nad możliwością występowania aminokwasów fosfonowych w przyrodzie i przeprowadził syntezę kilku połączeń z tej grupy dla poznania ich własności. Zwracając swoją uwagę przede wszystkim w kierunku fosfonowych analogów tauryny i kwasu cysteinowego, Chavane otrzymał syntetycznie kwas 2-aminoetylofosfonowy (ciliatynę) i kwas 2-amino-3-fosfonopropionowy, czyli β -fosfonoalaninę (IX). Pierwsze syntezy kwasów α -aminofosfonowych wykonali Kosolapoff (49) i niezależnie od niego Kabacznik i Medwed (36). Syntezę fosfonowego (X) i fosfinowego (XI) analogu kwasu glutaminowego przeprowadził Mastalerz (54, 56). Połączenia te okazały się inhibitorami enzymu syntetyzującego glutaminę (55). Po odkryciu aminokwasów fosfonowych w przyrodzie nastąpił znaczny wzrost zainteresowania tymi połączeniami. Między innymi Chambers i Isbell (17) opracowali ogólną metodę syntezy kwasów α -aminofosfonowych, dzięki której te połączenia stały się łatwo dostępne.

Dotychczasowe badania chemiczne nad aminokwasami fosfonowymi ograniczały się głównie do opracowania metod ich syntezy i opisu podsta-

wowych własności, jak temperatura topnienia, rozpuszczalność, trwałość w warunkach hydrolizy i własności kwasowo — zasadowe. Znacznie mniej uwagi poświęcono chemicznym przemianom tych połączeń.

Aminokwasy fosfonowe reagują z ninhydryną podobnie jak aminokwasy karboksylowe, dając takie samo zabarwienie (17, 34). Przebieg reakcji jest podobny, jedynie zamiast dwutlenku węgla wydziela się fosforan nieorganiczny. Według Warrena (79), który badał tę reakcję z kwasem aminometylofosfonowym, przy rozpadzie wiązania P—C powstaje anion metafosforanowy, działający jako niespecyficzny czynnik fosforylujący. Gdy reakcję prowadzono w metanolu albo glikolu etylenowym w mieszaninie reakcyjnej pojawiały się fosforany tych alkoholi. Reakcję ninhydryny z ciliatyną badał de Koning (45). Według niego produktem pośrednim tej reakcji jest aldehyd fosfonoctowy (XII), który spontanicznie rozkłada się do aldehydu octowego i kwasu fosforowego (schemat 1). De Koning nie zakłada wprawdzie powstawania metafosforanu podczas rozkładu aldehydu fosfonoctowego, należy się jednak liczyć z możliwością wytwarzania HPO_3 w tej reakcji, podobnie, jak to ma miejsce przy degradacji kwasów α -aminofosfonowych pod wpływem ninhydryny. Jeżeli mechanizm przedstawiony na schemacie 1 jest słuszny, to podczas reakcji z ninhydryną powinno wystąpić fosforylujące działanie ciliatyny, czego jednak dotychczas nie badano. Przypuszcza się, że aldehyd fosfonoctowy jest także produktem enzymatycznej degradacji ciliatyny (59).

Interesujących wyników dostarczyły badania reakcji ciliatyny z kwasem azotawym (57), w wyniku której powstaje etylen, azot i ortofosforan.



Schemat 1. Mechanizm reakcji ciliatyny z ninhydryną

III. Metody wykrywania związków fosfonowych w materiałach biologicznych

Badania nad występowaniem związków fosfonowych w przyrodzie utrudnia brak bezpośredniej metody analitycznej, pozwalającej na wykrycie wiązania P-C. Ze względu na różnorodność połączeń zawierających to wiązanie i ich skrajnie różne własności opracowanie ogólnej metody wykrywania, opartej na własnościach chemicznych wydaje się mało prawdopodobne. Wiązanie P-C nie wykazuje charakterystycznej absorpcji w ultrafiolecie ani w zakresie widzialnym, a spektroskopia w podczerwieni nie znajduje zastosowania do analizy złożonych mieszanin.

Możliwość zastosowania magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) była rozpatrywana przez Quina (61). Widmo NMR pozwala wprawdzie na łatwe odróżnienie związków fosfonowych od innych połączeń fosforu, nie zawierających wiązania P-C, jednak dostępne obecnie spektrometry NMR wymagają stosowania próbek o dużym stężeniu. Wyklucza to zastosowania tej metody do analizy materiałów biologicznych, gdzie chodzi o wykrywanie śladowych zawartości poszukiwanych składników.

Znaczenie metody ogólnej, jakkolwiek o ograniczonym zastosowaniu, posiada metoda oparta na oznaczaniu fosforu po spaleniu próbki (fosfor całkowity) i po wyczerpującej hydrolizie (fosfor estrowy). Jeżeli wyniki tych dwóch oznaczeń różnią się w sposób istotny, to badany materiał niewątpliwie zawiera odporne na hydrolizę związki fosfonowe. Warunkiem uzyskania prawidłowych wyników jest oczywiście przeprowadzenie hydrolizy w sposób zapewniający całkowity rozkład estrów kwasu fosforowego. Według Quina (61) wystarczająca jest hydroliza za pomocą 6N HCl w 105°C przez 48 godzin. Praktyczne znaczenie tej prostej metody ogranicza jednak jej bardzo mała czułość. Biorąc pod uwagę osiągalną dokładność kolorymetrycznego oznaczania fosforu można ocenić, że wykrycie związków fosfonowych tą metodą nie jest możliwe, jeżeli zawarty w nich fosfor stanowi mniej niż 3% fosforu całkowitego. Ponadto nie wszystkie związki fosfonowe są odporne na długotrwałą hydrolizę. Metodę tę z powodzeniem stosowano do analizy jamochłonów i mięczaków (60, 61), które zawierają wyjątkowo dużo związków fosfonowych.

Ponieważ występujące w przyrodzie związki zawierające wiązanie P-C są przeważnie aminokwasami, można dla ich wykrycia stosować metodę, jaką posłużył się Horiguchi (30) badając rozpowszechnienie związków fosfonowych w przyrodzie. Według tej metody próbkę poddaje się wyczerpującej hydrolizie, a następnie frakcjonuje na kolumnie kationitu Dowex 50 H⁺ w celu usunięcia fosforanu nieorganicznego. Miarą zawartości aminokwasów fosfonowych jest ilość fosforu zatrzymanego na kolumnie przemytej wodą. Tym sposobem można wykryć obecność związków fosfonowych nawet wtedy, gdy zawarty w nich fosfor stanowi mniej niż 0,1% fosforu całkowitego.

Do wykrywania związków fosfonowych stosowano także chromatografię i elektroforezę bibułową (40). Połączenia z grupą $-PO_3H_2$ związaną bezpośrednio z węglem można lokalizować na chromatogramach za pomocą odczynników używanych do wykrywania estrów kwasu fosforowego, na przykład odczynnika H a n e s a I s h e r w o o d a (24) albo odczynnika R o s e n b e r g a (64). W odróżnieniu od fosforanów organicznych, które tworzą z tymi odczynnikami trwałe niebieskie zabarwienie, kwasy fosfonowe zostają uwidocznione w postaci szybko zanikających plam o odcieniu zielonym. Do lokalizacji aminokwasów fosfonowych można oczywiście stosować ninhydrynę.

IV. Rozpowszechnienie związków fosfonowych w przyrodzie

Pierwszy aminokwas fosfonowy w żywym organizmie przypadkowo odkryli H o r i g u c h i i K a n d a t s u (33), zajmując się szczegółową analizą składu chemicznego pierwotniaków z przewodu pokarmowego przeżuwaczy. Poddali oni hydrolizie surową frakcję lipidową mieszaniny pierwotniaków, pobranych ze żwacza owcy i wyodrębnili oraz zidentyfikowali nowy aminokwas. Odkrywczy nazwali go ciliatyną aby podkreślić, że po raz pierwszy został on wykryty w pierwotniakach należących do gromady *Ciliata* (orzęski).

Dalsze badania H o r i g u c h i i K a n d a t s u (30, 37) dotyczyły rozpowszechnienia aminokwasów fosfonowych w przyrodzie. Posługując się własną metodą analityczną autorzy stwierdzili obecność zawierających wiązanie P—C aminokwasów w szeregu organizmów jednokomórkowych (pierwotniaki, bakterie) i wielokomórkowych (robaki obłe, ślimaki). Spośród badanych organizmów największą zawartością związków fosfonowych odznaczał się pierwotniak *Tetrahymena*, w którym fosfor związany z węglem może stanowić do 15% fosforu całkowitego (30). Zestawienie jednokomórkowych organizmów, w których wykryto dotychczas związki fosfonowe podaje tablica 1.

Realizując program badań składu chemicznego jamochłonów z mórz południowych K i t t r e d g e i wsp. (44) stwierdzili nieoczekiwanie znaczne ilości ciliatyny w ukwiale *Anthopleura elegantissima*. Po tym odkryciu w pracowni K i t t r e d g e (40, 42) rozpoczęto systematyczne poszukiwania związków fosfonowych w jamochłonach (*Coelenterata*). Stosując ekstrakcję tkanek 70%-owym etanolem, wyczerpującą hydrolizę ekstraktu kwasem solnym, a następnie chromatografię kolumnową hydrolizatu na wymiennikach jonowych oraz chromatografię i elektroforezę bibułową, stwierdzono występowanie znacznych ilości ciliatyny w każdym spośród 19 badanych jamochłonów, należących do różnych gromad. Ponadto już wstępna analiza chromatograficzna wykazała, że w badanych jamochłonach występuje obok ciliatyny jeszcze przynajmniej 8 innych związków

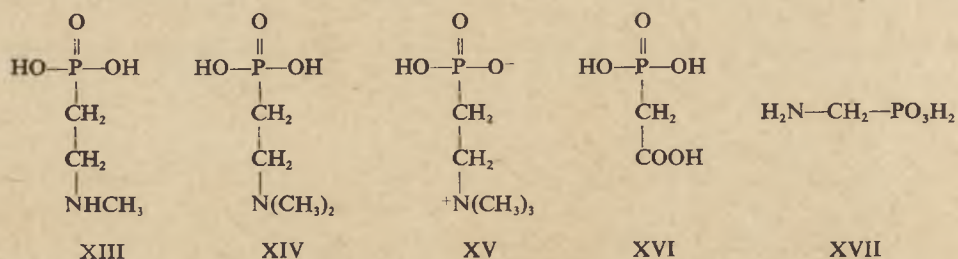
Tablica 1

Występowanie związków fosfonowych w mikroorganizmach

Nazwa	Fosfor P-C jako % P całkowitego	Pozycja literatury	Nazwa	Fosfor P-C jako % P całkowitego	Pozycja literatury
<i>Ciliata</i> ze żwacza (mieszanina)	3,4—6,5	20, 30, 34	<i>B. subtilis</i>	0,15—0,17	30
<i>Entodinium caudatum</i>	nie określono	20	<i>Agrob. tumefaciens</i>	0,14	30
<i>Euglena gracilis</i>	0,10	30	Zooplankton	3,2	30
<i>Paramecium</i> K 32	0,82	30	<i>Clostridium butyricum</i>	0,29—0,40	30
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	10,6—15,0	30, 37, 42, 65	<i>E. coli</i>	0,06—0,07	30
Bakterie ze żwacza	1,0	30	<i>Coryn. facians</i>	0,25	30

fosfonowych, w tym 5 aminokwasów, dających na chromatogramach typowe zabarwienie pod wpływem ninhydryny. Prace nad ich identyfikacją są w toku. Rozważając możliwe drogi biosyntezy ciliatyny Kittredge i Hughes (42) założyli, że ciliatyna może powstawać przez dekarboksylację fosfonoalaniny czyli kwasu α -amino- β -fosfonopropionowego (IX), podobnie jak kolamina z seryny. Systematyczne poszukiwania β -fosfonoalaniny w organizmach obfitujących w ciliatynę wykazały, że aminokwas ten jest szeroko rozpowszechniony w jamochłonach i występuje też w *Tetrahymena*, ale zawartość jego jest zwykle niewielka i wynosi tylko od 1 do 10% zawartości ciliatyny. 100g komórek *Tetrahymena pyriformis* zawiera około 10mg fosfonoalaniny.

Ostatnio Kittredge i wsp. (43) oraz Shelbourne i Quin (74) zidentyfikowali trzy nowe aminokwasy fosfonowe w ukwiałach *A.xanthogrammica* i *Metridium dianthus*. Są to N-metylowe pochodne ciliatyny (XIII), (XIV) i (XV). Połączenia (XIII) i (XV) wydzielono w stanie krystalicznym. Kwas β -trójmetyloaminoetylofosfonowy (XV) jest fosfonowym analogiem fosforanu choliny. Związki te występują w ukwiałach w dość znacznych ilościach. Na przykład z 5 kg *A.xanthogrammica* wy-



dzielono 376 mg krystalicznego kwasu β -metyloaminoetylofosfonowego (XIII).

Oprócz wymienionych połączeń Kittredge (40) znalazł w jamochłonach kwasy fosfonowe, które podczas chromatografii bibułowej i elektroforezy zachowywały się jak kwas fosfonooctowy (XVI), α -amino- γ -fosfonomasłowy (X) i aminometylofosfonowy (XVII). Ostateczna identyfikacja tych związków wymaga dodatkowych badań.

Występowanie związków fosfonowych w jamochłonach przedstawia tablica 2.

Tablica 2

Występowanie związków fosfonowych w jamochłonach

Gatunek	Ciliatyna	β -fosfonoalanina	Inne związki fosfonowe	Pozycja literatury
<i>Pelagia colorata</i>	+	—	+	40
<i>Tubipora musica</i>	+	+	+	40
<i>Muriciopsis flavida</i>	+	+		40
<i>Eucinea succinea</i>	+	+	+	40
<i>Briarium asbestinum</i>	+	ślady	+	40
<i>Microspicularia</i>	+	+	+	40
<i>Renilla collikeri</i>	+	+	+	40
<i>Zoanthus sociatus</i>	+	+		40, 42
<i>Harenactis</i>	+	+	+	40
<i>Tealia felina</i>	+	+	+	40, 60, 61, 74
<i>Anthopleura elegantissima</i>	+	ślady	+	40, 44, 72, 76
<i>A. xanthogrammica</i>	+	—	+	40, 43, 74
<i>A. kurogane</i>	+	—		40
<i>A. pacifica</i>	+	—		40
<i>Metridium senile</i>	+	—	+	40
<i>M. dianthus</i>	+		+	60, 61, 75
<i>Aiptisia pallida</i>	+			74
<i>Bunadosoma cavernata</i>	+			74
<i>Paractis rapiformis</i>	+			74
<i>Actinia equina</i>	+			74
<i>Acropora pulchra</i>	+	—	+	40
<i>Stylophora pistillata</i>	+	+		40
<i>Fungia fungites</i>	+	—	+	40
<i>Favia speciosa</i>	+	—	+	40

Związki fosfonowe wykryto także w innych bezkręgowcach, przede wszystkim w licznych organizmach należących do różnych gromad typu *Mollusca*. Badania mięczaków nie były jednak tak szczegółowe jak badania jamochłonów i dotyczyły głównie występowania fosfonolipidów w ślimakach, małżach i głowonogach (tablica 3).

Systematycznych badań nad występowaniem związków fosfonowych w innych bezkręgowcach dotychczas nie przeprowadzono, choć związki te znaleziono w robaku obłym *Panagrellus redivivus* (30) i szkarłupni

Asterias forbesi (61). Na podstawie kilku zbadanych organizmów można sądzić, że stawonogi nie zawierają aminokwasów fosfonowych.

Tablica 3

Mięczaki, w których znaleziono związki fosfonowe

Małże	Pozycja literatury	Ślimaki	Pozycja literatury	Głównogi	Pozycja literatury
<i>Crassostrea virginica</i>	62	<i>Helix euhadra</i>	31	<i>Loligo</i>	
<i>Mytilus edulis</i>	60, 61	<i>Haliotis midae</i>	46	<i>edulis</i>	26
<i>Venus mercenaria</i>	60, 61	<i>Busycon canaliculatum</i>	60, 61	<i>Polypus</i>	
<i>Corbicula sandai</i>	27, 29	<i>Incillaria</i>	30	<i>vulgeris</i>	26
<i>Corbicula japonica</i>	29	<i>Heterogen longispira</i>	28		
<i>Unio biwae</i>	29	<i>Turbo cornutus</i>	26, 27		
<i>Inversidens hirasei</i>	29	<i>Tegula argyrostoma</i>	26		
<i>Anodonta lauta</i>		<i>Monodonta labio</i>	26		
<i>rostrata</i>	29	<i>Tegula pfeifferi</i>	26		
<i>Cristaria plicata</i>	29	<i>Sinotaia histrica</i>	26		
<i>Corbicula leana</i>	26	<i>Purpura bronni</i>	26		
<i>Pinctada martensi</i>	26	<i>Cellana eucosmia</i>	26		
<i>Hyriopsis schleglii</i>	26	<i>Haliotis gurneri</i>	26		
		<i>Stomatella lyrata</i>	26		
		<i>Pugillina terratana</i>	26		
		<i>Batillaria multiformis</i>	26		
		<i>Semisulcospira bensoni</i>	26		
		<i>Helix pomatia</i>	41		
		<i>Amonyx nugax</i>	41		

W jamochłonach i mięczakach zawartość związków fosfonowych jest często zdumiewająco duża. W ukwiale *Tealia felina* na 100g suchej masy przypada 410mg fosforu w formie wiązania P-C, co stanowi około 50% fosforu całkowitego. Z innego ukwiału, *Metridium dianthus*, wydzielono ciliatynę w ilości odpowiadającej około 1% suchej masy tego organizmu. W ślimaku *Busycon canaliculatum* związki fosfonowe reprezentują około 30% fosforu całkowitego. Znaczne ilości związków fosfonowych występują w jadalnych małżach i ślimakach, między innymi w omółku jadalnym (61), ślimaku winniczku (41), słuchotce kalifornijskiej (46, 47). W ślimaku winniczku fosfor związków fosfonowych stanowi około 5% fosforu całkowitego.

Jednym z bardziej interesujących wyników badań nad rozpowszechnieniem związków fosfonowych w przyrodzie jest wykrycie ich w tkankach zwierząt przeżuwających. Najpierw znaleziono ciliatynę w wątrobie, nerce, śledzionie i mleku kozy (30, 32, 38). Najwięcej, bo około 75 µg/g

występuje w wątrobie. Poziom ciliatyny w mleku przeżuwaczy jest rzędu kilku $\mu\text{g/l}$. Ciliatynę znaleziono także w rozpuszczalnej w kwasie trójchłrooctowym frakcji mózgu wołowego. Z 28kg mózgu Shimizu i wsp. (75) otrzymali 18mg krystalicznego związku. Uwzględniając straty przy oczyszczaniu autorzy oceniają, że poziom wolnej ciliatyny w mózgu wołowym wynosi około 2 $\mu\text{g/g}$. Nie stwierdzono, ale też nie wykluczono, obecności ciliatyny związanej.

Koza i wół są dotychczas jedynymi kręgowcami, w których stwierdzono występowanie aminokwasu fosfonowego. Zarówno Shimizu i wsp. (75) jak Kandatsu i Horiguchi (38) podkreślają, że obecność ciliatyny w tkankach przeżuwaczy jest zapewne spowodowana przenikaniem jej z przewodu pokarmowego w następstwie strawienia pierwotniaków i bakterii obfitujących w ten aminokwas. Horiguchi (30) ocenia, że organizm krowy absorbuje dziennie od 150 do 600mg ciliatyny. W tkankach przeżuwaczy musi zatem ustalać się pewien stały poziom ciliatyny, wynikający ze stosunku szybkości wchłaniania oraz rozkładu i wydalania. Wyjaśnienie związanych z tym zagadnień wymaga dodatkowych badań.

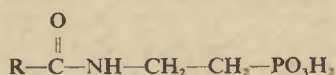
Dalsze badania nad rozpowszechnieniem aminokwasów fosfonowych w przyrodzie będą zapewne zmierzały do ostatecznego ustalenia, czy połączenia te są endogennymi składnikami kręgowców. Interesującym a zupełnie do tej pory nie zbadanym zagadnieniem jest występowanie związków fosfonowych w świecie roślinnym. Kandatsu i Horiguchi (37) sądzą, że „drożdże, grzyby, rośliny i wyższe zwierzęta nie zawierają ciliatyny lub zawierają jej bardzo mało”. Można przypuszczać, że związki fosfonowe, o ile nawet występują w wyższych organizmach roślinnych i zwierzęcych to raczej w niewielkich ilościach i nie mają takiego znaczenia, jak w pierwotniakach, jamochłonach i mięczakach.

V. Ciliatyna jako składnik białek

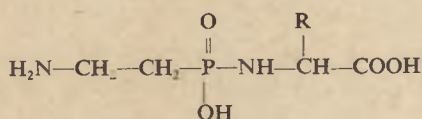
Spśród wszystkich związków fosfonowych znalezionych dotychczas w przyrodzie ciliatyna jest najbardziej rozpowszechniona i występuje w największych ilościach. Jest ona dotychczas jedynym aminokwasem fosfonowym, który zidentyfikowano jako składnik bardziej złożonych połączeń, przede wszystkim fosfolipidów i białek.

O występowaniu ciliatyny w białkach wiadomo niewiele. Rosenberg (65) znalazł ten aminokwas w nierozpuszczalnej frakcji białkowej *Tetrahymena pyriformis*, jednak trawienie enzymami proteolitycznymi nie doprowadziło do powstania rozpuszczalnych peptydów zawierających fosfor. Z badań Quina (61, 62) wynika, że ciliatyna występuje w białkach licznych jamochłonów. W ukwiale *Metridium dianthus* występują bliżej nieokreślone substancje białkowe, zawierające do 0,5% fosforu

w formie wiązania P-C. Trawienie ich pepsyną daje rozpuszczalne polipeptydy, w których ciliatyna stanowi około 4⁰/. Występowanie tego aminokwasu w proteidach można tym samym uznać za udowodnione, jednak nie wiadomo czy ciliatyna jest składnikiem łańcucha peptydowego. Z jej budowy wynikają dwie możliwości połączenia z łańcuchem peptydowym: poprzez zwykłe wiązanie peptydowe między grupą karboksylową a grupą aminową ciliatyny (XVIII), oraz poprzez wiązanie fosfonoamidowe między grupą fosfonową a grupami aminowymi aminokwasów (XIX). Gdyby ciliatyna występowała w środku łańcucha peptydowego, to oba te wiązania musiałyby istnieć równocześnie.



XVIII



XIX

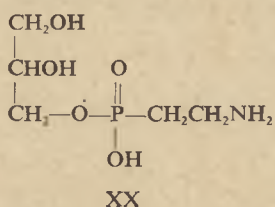
Po reakcji rozpuszczalnych frakcji peptydowych zawierających ciliatynę z dwunitrofluorobenzenem i hydrolizie próbki Q u i n (61) nie otrzymał DNP-ciliatyny, co dowodzi, że w badanych peptydach grupa aminowa ciliatyny jest zablokowana.

Ostateczne wyjaśnienie sposobu powiązania ciliatyny z łańcuchami peptydowymi wymaga wyodrębnienia i ustalenia budowy krótkich peptydów zawierających ten aminokwas. Peptydy takie nie są dotychczas znane. Wydaje się, że synteza peptydów zawierających ciliatynę i inne aminokwasy fosfonowe jest jednym z pilniejszych zagadnień w biochemii związków fosfonowych.

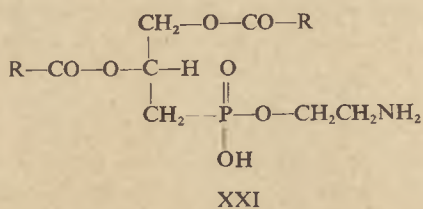
VI. Ciliatyna jako składnik fosfolipidów

W pierwotniakach, jamochłonach i mięczakach endogenna ciliatyna występuje głównie w formie związanej we frakcji lipidowej, skąd można ją uwolnić przez hydrolizę. Dowodzi to, że ciliatyna jest składnikiem fosfolipidów, podobnie jak fosforan kolaminy.

Pierwszym bezpośrednim dowodem występowania ciliatyny w fosfolipidach było wydzielenie estru glicerynowego (XX), którego znaczne ilości znajdują się w alkoholowo-wodnych wyciągach ukwiału *A. elegans* (42) i krążkopławu *Pelagia colorata* (40). Jego budowa wskazuje, że w jamochłonach może występować fosfonowy analog kefaliny (XXII), zawierający ciliatynę zamiast fosforanu kolaminy.



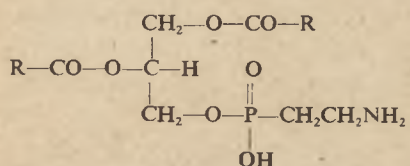
XX



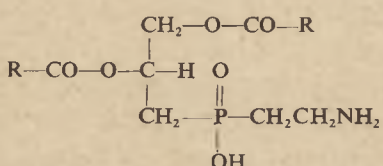
XXI

Możliwość występowania w przyrodzie fosfolipidów zawierających wiązanie P—C wzbudziła duże zainteresowanie w ośrodkach zajmujących się biochemią i chemią lipidów. Podjęto próby wydzielenia czystych fosfolipidów ze źródeł naturalnych (20, 26, 27, 28, 29, 46, 47, 72, 76), a jednocześnie Baer i wsp. (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) i niezależnie od niego Rosenthal i wsp. (67, 68, 69, 70, 71) otrzymali drogą chemicznej syntezy wiele fosfonowych analogów występujących w przyrodzie fosfolipidów, co umożliwiło bliższe poznanie i porównanie ich własności. Ze względu na trudności rozdzielania naturalnych mieszanin lipidów synteza chemiczna jest praktycznie jedyną drogą uzyskania czystych fosfolipidów.

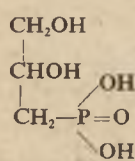
Teoretycznie możliwe są trzy typy fosfonowych analogów fosfolipidów, zależnie od tego, które z wiązań P—O—C zostanie zastąpione wiązaniem P—C. Na przykładzie kefaliny można je przedstawić wzorami (XXI), (XXII), (XXIII).



XXII



XXIII

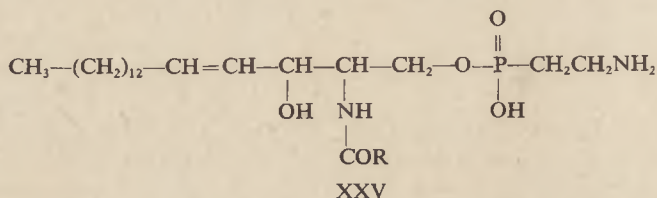


XXIV

Badania Rosenthala i wsp. dotyczyły głównie syntezy fosfolipidów typu (XXI), w których glicerynowy fragment cząsteczki jest połączony bezpośrednio z atomem fosforu. Fosfonolipidy takie można uważać za pochodne kwasu 2,3-dwuhydroksypropanofosfonowego (XXIV). W przyrodzie nie znaleziono dotąd związków tego typu. Cytowana seria prac zespołu Baera jest poświęcona przede wszystkim syntezie fosfonowych analogów kefalin i lecytyn, a więc związków typu (XXII), zawierających ciliatyne względnie jej trójmetylową pochodną połączone wiązaniem estrowym z dwuglicerydem. Fosfonowe analogi lipidów zawierające dwa wiązania P—C nie są znane.

Pierwszą próbę wydzielenia fosfonolipidów ze źródeł naturalnych podjęto gdy Kittredge (40) znalazł glicerynowy ester ciliatyny w jamochłonach. Pracujący w tym samym ośrodku zespół Rousera (72) wyodrębnił z ukwiału *A.elegantissima* fosfonolipid zawierający ciliatyne, okazało się jednak, że nie jest to fosfonowy analog kefaliny lecz sfingomieliny. Wśród produktów hydrolizy wydzielonego lipidu znaleziono tylko kwasy tłuszczowe, sfingozynę i ciliatyne. Nowemu lipidowi przypisano zatem budowę estru ciliatyny i ceramidu (XXV). Dla ustalenia, która z grup hydroksylowych sfingozyny jest połączona z ciliatyną przeprowadzono degradację za pomocą nadjodanu (76). Jednocześnie Baer i Pal (5) otrzymali na drodze syntezy ester ciliatyny i dwuhydroceramidu, któ-

rego widmo w podczerwieni było takie samo jak widmo naturalnego lipidu, z wyjątkiem pasma charakterystycznego dla podwójnego wiązania sfingozyny. Simon i Rouser (76) stwierdzili, że u *A.elegantissima* fosfonosfingomielina stanowi 9,3% ogólnych lipidów, a aż 20% frakcji fosfolipidowej, która nie zawiera poza tym innych fosfonolipidów. W świetle tych wyników występowanie wolnego estru gliceryny i ciliatyny w *A.elegantissima* pozostaje zagadką.



Dla zilustrowania trudności analitycznych wynikających z podobieństwa fosfolipidów i fosfonolipidów Simon i Rouser (76) przypominają, że w latach 1958—1962 trzy różne zespoły badaczy zajmowały się badaniami fosfolipidów ukwiału *A.elegantissima*, a jednak przeoczono występowanie tak dużej ilości fosfonosfingomieliny.

Nie jest zatem wykluczone, że u innych organizmów ponowne badania też ujawnią występowanie fosfolipidów zawierających wiązanie P-C. W latach 1964—1967 fosfonosfingomielinę zidentyfikowano jako składnik licznych mięczaków słodkowodnych i morskich, przede wszystkim w wyniku badań Hori i wsp. (26, 27, 28, 29).

Fosfonolipidy typu kefaliny znaleziono po raz pierwszy w larwach muchy domowej, hodowanych na pożywkach zawierających ciliatynę (15). Fosfonokefalina może stanowić nawet do 8% frakcji fosfolipidowej, nie jest jednak naturalnym składnikiem, ponieważ nie stwierdzono jej obecności w larwach hodowanych na pożywkach nie zawierających ciliatyny. Enzymy wprowadzające pobraną z pożywki ciliatynę do cząsteczki fosfotydu są najwidoczniej mało swoiste i nie odróżniają jej od fosforanu kolaminy. Nie zidentyfikowane fosfonolipidy znaleziono także w wątrobie szczura, otrzymującego w diecie ciliatynę (39).

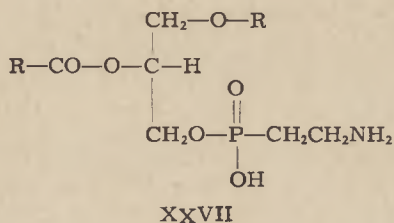
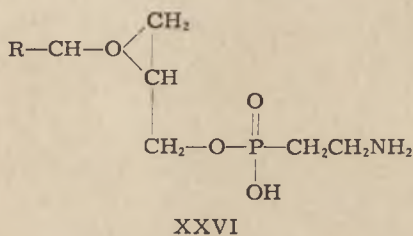
Fosfonokefalinę jako naturalny składnik żywego organizmu odkryli w roku 1966 Liang i Rosenberg (52) w *T.pyriformis*. Wyodrębnili oni czystą frakcję kefalin, zawierającą fosfatydylociliatynę i fosfatydyloetanoloaminę w stosunku 1:13. Należy jednak pamiętać, że *Tetrahymena* zawiera do 15% fosforu w formie wiązania P-C i dlatego ta mała zawartość fosfonokefaliny może odpowiadać zaledwie niewielkiej części ciliatyny obecnej w tym pierwotniaku.

Duże ilości fosfonolipidów glicerynowych występują w pierwotniakach z przewodu pokarmowego zwierząt przeżuwających. Dawson i Kemp (20) stwierdzili, że w mieszaninie pierwotniaków pobranych ze

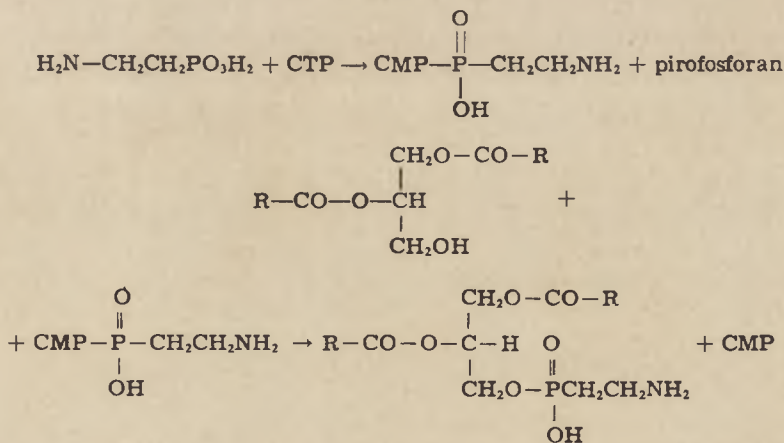
żwacza fosfonokefalina stanowi 11%, a w czystej kulturze *Entodinium caudatum* 18% fosfolipidów. Znalezione też około 5% fosfonosfingomieliny. Stosunek fosfonokefaliny do kefaliny w *E. caudatum* wynosi 1:1,1, jest zatem znacznie wyższy niż w *T. pyriformis*.

Dawson i Kemp (20) odkryli w pierwotniakach fosfonolipid typu plazmalogenu (XXVI). W mieszaninie pierwotniaków ze żwacza stanowi on około 2% fosfolipidów.

Thompson i Woo (77) znaleźli w *T. pyriformis* fosfonolipid (XXVII), którego charakterystyczną cechą jest występowanie wiązania eterowego w miejscu jednego z wiązań estrowych.



Mechanizm biosyntezy fosfonokefaliny w *Tetrahymena* wyjaśnili Liang i Rosenberg (52) (schemat 2). Pierwszym etapem syntezy jest reakcja ciliatyny z cytydynotrójfosforanem (CTP), prowadząca do powstania cytydynofosfociliatyny (CMP-ciliatyny), fosfonowego analogu cytydynodwufosfokolaminy. CMP-ciliatyna reaguje następnie z α,β -dwuglicerydem, w wyniku czego powstają fosfonokefalina i cytydino-5-fosforan (CMP).



Schemat 2. Biosynteza fosfonokefaliny z dwuglicerydu i ciliatyny

Można przypuszczać, że drogi biosyntezy innych fosfonolipidów są takie same, jak ich fosfolipidowych analogów. Wydaje się prawdopodobne,

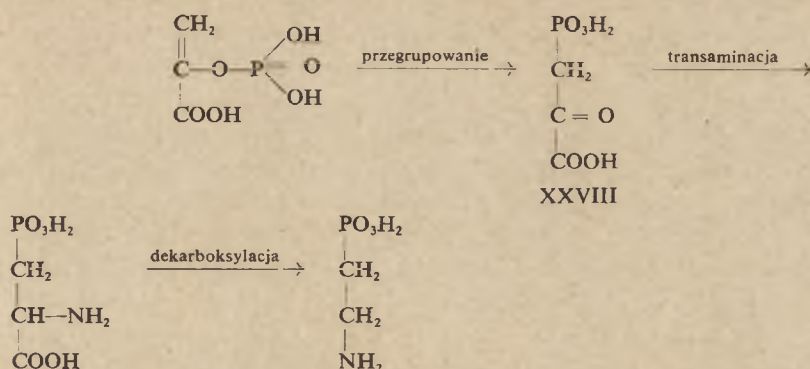
że enzymy syntetyzujące fosfolipidy są identyczne z enzymami syntetyzującymi zwykle fosfolipidy. Przemawia za tym wbudowywanie egzogennej ciliatyny do fosfolipidów u zwierząt, w których ten aminokwas nie występuje (15, 39).

VII. Biosynteza ciliatyny

Pierwsze doświadczenia zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu biosyntezy wiązania P-C wykonał Rosenberg (65) w 1964 roku badając włączanie radioaktywnego fosforanu do ciliatyny u *Tetrahymena*. Okazało się, że znakowany fosforan jest o wiele szybciej wbudowywany do ciliatyny związanej z lipidami niż do wolnego aminokwasu. Wyciągnięto stąd wniosek, że bezpośrednim prekursorem, z którego powstaje ciliatyna jest związek typu lipidowego. Na podstawie tych wyników Segal (73) zaproponował mechanizm biosyntezy ciliatyny. Synteza ta odbywałaby się w obrębie cząsteczki fosfolipidu i polegałaby na skomplikowanym, wielostopniowym przegrupowaniu kefaliny do fosfonokefaliny. Jednak późniejsze doświadczenia Lianga i Rosenberga (53), w których *T.pyriformis* hodowano na pożywce zawierającej etanoloaminę ^{14}C wykazały, że nie jest ona prekursorem ciliatyny. Gdyby zaś mechanizm proponowany przez Segala był słuszny, to powinno nastąpić szybkie wcielanie atomów węgla z etanoloaminy do ciliatyny, wiadomo bowiem, że *Tetrahymena* zawiera aparat enzymatyczny, potrzebny do syntezy fosfolipidów z etanoloaminą.

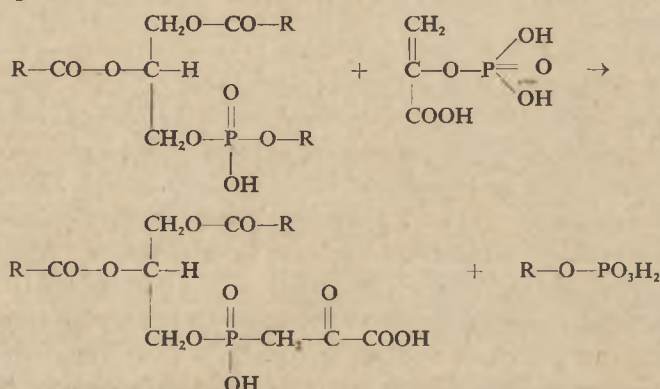
Na przełomie lat 1967/1968 opublikowano kilka doniesień wyjaśniających, jak się wydaje, mechanizm biosyntezy ciliatyny. Liang i Rosenberg (53), Trebst i Geike (78) oraz Warren (80) równocześnie i niezależnie od siebie starali się ustalić, jakie związki dostarczają atomów węgla do syntezy ciliatyny w *Tetrahymena*. *T.pyriformis* hodowano w obecności różnych związków znakowanych węglem ^{14}C i określano radioaktywność wydzielonej z komórek ciliatyny. Mimo pewnej rozbieżności wyników cytowani autorzy zgodnie stwierdzają, że źródłem atomów węgla ciliatyny jest glukoza, która w cyklu glikolitycznym przekształca się w prekursor tego aminokwasu. Tym samym wybór prekursora ciliatyny został ograniczony do kilku zaledwie możliwości. Rozpatrując budowę poszczególnych produktów pośrednich glikolizy Warren (80) uznał, że najbardziej prawdopodobną reakcją, w której powstaje wiązanie P-C, jest przegrupowanie fosfoenolopirogronianu do kwasu 3-fosfopirogronowego (XXVIII). Kwas ten mógłby się przekształcić w ciliatynę na drodze transaminacji i dekarboksylacji (schemat 3).

Liang i Rosenberg (53) również wyrażają pogląd, że prekursorem związków fosfonowych jest fosfoenolopirogronian. Według nich jednak w reakcji powstawania wiązania P-C uczestniczy niescharaktery-



Schemat 3. Mechanizm biosyntezy ciliatyny (wg 80)

zowany bliżej fosfolipid, z którym (schemat 4) fosfoenolpirogonian tworzyłyby lipidowo związany kwas 3-fosfonopirogrogonowy. Dalsze etapy syntezy ciliatyny, transaminacja i dekarboksylacja, odbywałyby się w obrębie fosfolipidu.



Schemat 4. Powstawanie wiązania P-C (wg 53)

Taki przebieg reakcji jest najbardziej zgodny z wynikami doświadczeń, według których wbudowywanie radioaktywnego fosforanu z pożywkami następuje szybciej do ciliatyny związanej lipidowo niż do wolnego aminokwasu.

Przebieg pierwszych etapów biosyntezy byłby według obu schematów wspólny dla ciliatyny i β -fosfonoalaniny. Jest to zgodne ze spostrzeżeniem W a r r e n a (80), że oba te aminokwasy, wydzielone z *T.pyriformis* hodowanej na pożywkę z glukozą znakowaną ^{14}C w pozycji 1 lub 2, wykazują tę samą radioaktywność.

Badania nad biosyntezą związków fosfonowych znajdują się zaledwie w początkowej fazie, dlatego też przedstawione powyżej reakcje powstawania wiązania P-C należy narazie uważać za hipotezy robocze. Nie wyczerpują one oczywiście wszystkich teoretycznie dopuszczalnych możliwości powstawania związków fosfonowych. Na przykład z nieopublikowanych doświadczeń H o r i g u c h i (32) wynika, że biosynteza ciliatyny

związana jest z bliżej nieokreślonym metabolitem cyklu kwasów trójkarboksylowych. Możliwe, że w najbliższej przyszłości nowe wyniki podważą przyjęte obecnie poglądy na biosyntezę wiązania P-C.

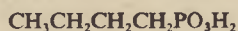
VIII. Degradacja związków fosfonowych w organizmach żywych

Zagadnienie enzymatycznego rozkładu wiązania P-C pojawiło się początkowo w związku z badaniami metabolizmu niektórych insektycydów zawierających to wiązanie.

W roku 1956 Hoskin (35) stwierdził, że podany szczurom radioaktywny kwas metylofosfonowy ($\text{CH}_3^{32}\text{PO}_3\text{H}_2$) jest w całości wydalany w niezmienionej postaci. Przypuszczał on zatem, że wiązanie fosfor-węgiel nie jest rozkładane przez żywe organizmy.

Pierwszy przykład degradacji związków fosfonowych w żywym organizmie opisali w roku 1963 Zeleznicki i wsp. (82). Zaobserwowali oni, że kwas metylofosfonowy a także etylofosfonowy jako jedyne źródło fosforu podtrzymują wzrost *Escherichia coli* Crookes, co wskazywało na rozkład wiązania P-C w tych prostych kwasach fosfonowych i wykorzystywanie uwolnionego z nich fosforu.

W latach 1965—1967 wykryto nowe rodzaje bakterii, zdolnych do rozkładania wiązania P-C. Mastalarz i wsp. (58) badali wzrost bakterii na syntetycznych pożywkach, w których jedynym źródłem fosforu był kwas etylofosfonowy albo 2,3-dwuhydroksypropanofosfonowy (XXIV). Uzyskane wyniki przemawiają za tym, że zdolność do wykorzystywania fosforu z prostych związków fosfonowych nie jest szeroko rozpowszechniona w świecie bakterii. Spośród 9 badanych szczepów tylko 6 udało się zaadoptować do pożywek syntetycznych, a z nich tylko dwa, *E. coli* 307 i *E. freundii*, przyswajały fosfor z kwasu etylofosfonowego. Nieco lepszym źródłem fosforu okazał się kwas 2,3-dwuhydroksypropanofosfonowy, który oprócz wymienionych szczepów *Escherichia* podtrzymywał także wzrost *Mycobacterium phlei*. Natomiast wzrost *Pseudomonas fluorescens* w obecności kwasu butylofosfonowego (XXIX) okazał się szybszy, niż w obecności fosforanu nieorganicznego (81). Dowodzi to, że w niektórych przypadkach fosfor z kwasu fosfonowego może być nawet łatwiej przyswajalny dla żywego organizmu niż nieorganiczny fosforan. Efekt ten nie wystąpił, gdy ortofosforan w pożywce zastąpiono kwasem etylofosfonowym. Tym samym wykazano, że łatwość przyswajania fosforu z kwasu fosfonowego zależy od długości łańcucha węglowego. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych badań.



XXIX

W roku 1966 Harkness (25) badał wzrost bakterii na syntetycznych pożywkach, zawierających aminokwasy fosfonowe jako jedyne

źródło fosforu. Wyniki uzyskane na materiale, obejmującym 10 szczepów i 8 różnych aminokwasów wykazują, że aminokwasy fosfonowe są na ogół lepszym źródłem fosforu, niż proste związki fosfonowe nie zawierające grup aminowych. Spośród badanych szczepów tylko *Bacillus subtilis* okazał się niezdolny do wykorzystywania do wzrostu fosforu z aminokwasów fosfonowych. *Salmonella typhimurium* i *Proteus mirabilis* wzrastały tylko na pożywkach zawierających ciliatynę. Pozostałe szczepy wykazywały mniej lub bardziej szybki wzrost na kilku z badanych aminokwasów. W każdym przypadku ciliatyna była najlepszym źródłem fosforu dla bakterii. Niektóre organizmy, na przykład *Shigella sonnei*, wzrastały równie szybko na pożywkach z ciliatyną jak z fosforanem nieorganicznym.

Zestawienie bakterii badanych dotychczas z punktu widzenia zdolności do rozkładania wiązań P-C w kwasach fosfonowych zawiera tablica 4.

Tablica 4

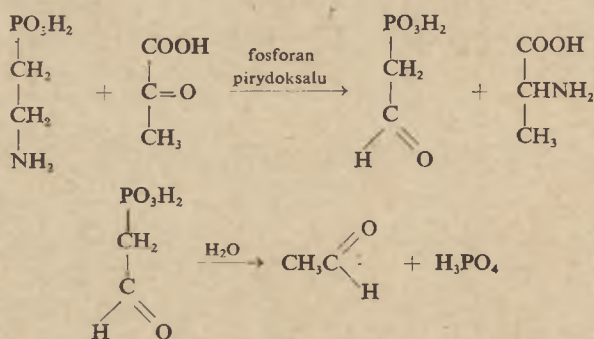
Bakterie rozkładające wiązanie P-C

Szczep	I	II	III	IV	V	Pozycja literatury
<i>Escherichia coli</i> Crookes	+	+		+	+	25, 82
<i>Escherichia coli</i> 307		+	+			58
<i>Escherichia coli</i> B	+			+	+	25
<i>Escherichia freundii</i>		+	+			58
<i>Mycobacterium phlei</i>		-	+			58
<i>Pyocyanus fluorescens</i>		+				81
<i>Bacillus cereus</i> (6 szczepów)				+		66
<i>Aerobacter cloacae</i>	+			+	+	25
<i>Aerobacter aerogenes</i>	+			+	+	25
<i>Serratia marcescens</i>	+			+	+	25
<i>Klebsiella</i> typ 16	-			+	+	25
<i>Salmonella typhimurium</i>	-			+	-	25
<i>Proteus mirabilis</i>	-			+	-	25
<i>Shigella sonnei</i>	+			+	+	25
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	25, 58

Substraty. I — kwas metylofosfonowy, II — kwas etylofosfonowy, III — kwas 2,3-dwuhydroksypropylofosfonowy, IV — ciliatyna, V — inne aminokwasy fosfonowe

Znaczny postęp w kierunku poznania dróg rozkładu aminokwasów fosfonowych przez bakterie przyniosły prace La Nauze i Rosenberga (59, 66) nad metabolizmem ciliatyny u *Bacillus cereus*. Ciliatyna (ale nie inne aminokwasy fosfonowe) okazała się dobrym źródłem fosforu dla kilku szczepów tego organizmu, jednak z pożywki zawierającej ciliatynę obok ortofosforanu, najpierw pobierany jest ortofosforan. Warunkiem wykorzystywania ciliatyny jest wytworzenie się indukowanego układu enzymatycznego umożliwiającego wnikanie tego aminokwasu ze środka-

wiska do wnętrza komórki. Rosenberg i La Nauze (66) uzyskali bezkomórkowy wyciąg z *Bacillus cereus*, zachowujący zdolność rozkładu ciliatyny do nieorganicznego fosforanu. Reakcję przyspiesza fosforan pirydoksalu, a hamują inhibitory transaminaz, na przykład hydroksylamina. Niezbędny jest dodatek pirogronianu jako akceptora grupy aminowej. Autorzy wyrażają zatem przypuszczenie, że rozkład ciliatyny przebiega na drodze transaminacji i że pierwszym produktem reakcji jest aldehyd fosfonoctowy, ulegający szybko dalszemu rozkładowi do fosforanu i aldehydu octowego (schemat 5). Analiza chromatograficzna mieszaniny po reakcji wykazała obecność nieznannej substancji zawierającej fosfor i grupę aldehydową, która prawdopodobnie jest aldehydem fosfonoctowym.



Schemat 5. Enzymatyczna degradacja ciliatyny (wg 59)

Również Roberts i wsp. (63) badając rozkład 17 aminokwasów fosfonowych w bezkomórkowych wyciągach z *E.coli*, *T.pyriformis*, wątroby myszy i ukwiału *A.elegantissima* wykazali, że transaminacja jest jednym z etapów tego procesu. Akceptorem grupy aminowej w tych doświadczeniach był ketoglutaran. Ze wszystkich badanych aminokwasów ciliatyna okazała się najlepszym substratem dla transaminazy z *T.pyriformis* i *A.elegantissima*, a więc organizmów zawierających duże ilości tego aminokwasu. β -Fosfonoalanina ulegała transaminacji w każdym z badanych wyciągów. Transaminacja pod wpływem wyciągu z wątroby myszy dowodzi, że aminokwasy fosfonowe mogą być substratami transaminazy aminokwasów karboksylowych.

Produktem transaminacji β -fosfonoalaniny jest kwas 3-fosfopirogronowy, którego nie udało się jednak wyosobnić z mieszaniny reakcyjnej. Uzyskanie czystych β -ketokwasów fosfonowych miałoby duże znaczenie dla przyszłych badań nad metabolizmem związków fosfonowych.

IX. Uwagi końcowe

Występowanie związków fosfonowych w przyrodzie nie jest dostatecznie zbadane. Szczególnie odczuwa się brak informacji o ich występowaniu w świecie roślinnym. Ze świata zwierzęcego dokładniej badane były tylko

Protozoa, *Coelenterata* i *Mollusca*. Istotną lukę stanowi brak wiadomości o występowaniu związków fosfonowych w organizmach zajmujących pośrednie szczeble rozwoju między *Coelenterata* i *Chordata*.

Z dotychczas zebranych danych wynika jednak jasno, że zdolność do syntezy wiązania P-C pojawiła się już w najbardziej pierwotnych formach życia, a więc w bakteriach i pierwotniakach i osiągnęła maksimum w jamochłonach. U zwierząt wyżej zorganizowanych zdolność ta ulegała stopniowemu zanikowi.

Wydaje się, że zarysowujący się schemat rozpowszechnienia związków fosfonowych w przyrodzie rzuca pewne światło na interesujące, a dotąd w piśmiennictwie nie rozważane zagadnienie pochodzenia tych związków w żywych organizmach. Zdaniem autora niniejszego opracowania związki zawierające wiązanie P-C powstały znacznie wcześniej niż pierwsze formy życia w wyniku reakcji chemicznych odbywających się w pierwotnej atmosferze i w pierwotnym oceanie. Pierwsze formy życia organizowały się zatem w kontakcie ze związkami fosfonowymi i dlatego mogły się wytworzyć układy enzymatyczne niezbędne do ich zużytkowywania. Brak tych związków w organizmach wyższych zwierząt może oznaczać, że stanowią one swego rodzaju „ślepy tor” biochemicznej ewolucji świata zwierzęcego. Można sądzić, że związki fosfonowe ostatecznie okazały się mało efektywne w spełnianiu funkcji życiowych i zostały odrzucone w miarę postępu ewolucji, a ich rolę przejęły w całości estry kwasu fosforowego. W takim przypadku związki fosfonowe we współczesnych nam organizmach zwierzęcych byłyby reminiscencją odległych epok geologicznych, w których tworzyły się zalążki życia.

Autor składa serdeczne podziękowanie dr H. Rosenbergowi z *Australian National University* za pomoc w zebraniu kompletnej literatury przedmiotu, rady, słowa zachęty i udostępnienie wyników badań własnych przed ich opublikowaniem. Pomoc w napisaniu niniejszego artykułu okazał także dr J. S. Kittredge z *City of Hope Medical Center*, Duarte, California, udostępniając nieopublikowane fragmenty pracy doktorskiej oraz dr Masaaki Horiguchi z *Tokyo University*.

LITERATURA

1. Argo udelis A. D., Herr R. R., Mason D. L., Pyke T. R., Ziesel J. F., *Biochemistry* 6, 165 (1967).
2. Baer E., Basu H., Pal B. C., *Can. J. Biochem.* 45, 1467 (1967).
3. Baer E., Jagannadha Rao K. V., *Lipids* 1, 291 (1966).
4. Baer E., Jagannadha Rao K. V., *Can. J. Biochem.* 45, 317 (1967).
5. Baer E., Pal B. C., *Can. J. Biochem.* 45, 1478 (1967).
6. Baer E., Robinson R., *Lipids* 2, 194 (1967).
7. Baer E., Sarma G. R., *Can. J. Biochem.* 43, 1953 (1965).
8. Baer E., Sarma G. R., *Can. J. Biochem.* 45, 1755 (1967).

9. Baer E., Stanacev N. Z., *J. Biol. Chem.* **239**, 3209 (1964).
10. Baer E., Stanacev N. Z., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 879 (1965).
11. Baer E., Stanacev N. Z., *J. Biol. Chem.* **240**, 44 (1965).
12. Baer E., Stanacev N. Z., *J. Biol. Chem.* **240**, 3754 (1965).
13. Baer E., Stanacev N. Z., *Can. J. Biochem.* **44**, 893 (1966).
14. Bohlmann F., Grenz M., *Chem. Ber.* **99**, 3197 (1966).
15. Bridges R. G., Ricketts J., *Nature* **211**, 199 (1966).
16. Burrows B. F., Turner W. B., *J. Chem. Soc. C str.* 255 (1966).
17. Chambers J. R., Isbell A. F., *J. Org. Chem.* **29**, 832 (1964).
18. Chavane V., Hackspill L., *Compt. Rend.* **224**, 406 (1947).
19. Chavane V., *Ann. chim. (Paris)* **4**, 372 (1949).
20. Dawson R. M. C., Kemp P., *Biochem. J.* **105**, 837 (1967).
21. Freedman L. D., Doak G. O., *Chem. Rev.* **57**, 479 (1957).
22. Greenstein J. P., Winitz M., *Chemistry of the Amino Acids* N. York-Londyn 1961, t. I, s. 35.
23. Griffin B. S., Burger A., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2336 (1956).
24. Hanes C. S., Isherwood F. A., *Nature* **164**, 1107 (1949).
25. Harkness D. R., *J. Bacteriol.* **92**, 623 (1966).
26. Hori T., Arakawa I., Sugita M., *J. Biochem.* **62**, 67 (1967).
27. Hori T., Itasaka O., Inoue H., *J. Biochem.* **59**, 570 (1966).
28. Hori T., Itasaka O., Inoue H., Akai M., *Jap. J. Exptl. Med.* **35**, 81 (1965).
29. Hori T., Itasaka O., Inoue H., Yamada K., *J. Biochem.* **56**, 477 (1964).
30. Horiguchi M., *J. Agr. Chem. Soc. Jap.* **40**, R25 (1966).
31. Horiguchi M., *Tanpashits-Kakusan-Kohso (Proteins-Nucleic Acids-Enzymes)* **4**, 315 (1966).
32. Horiguchi M. doniesienie prywatne.
33. Horiguchi M., Kandatsu M., *Nature* **184**, 901 (1959).
34. Horiguchi M., Kandatsu M., *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* **24**, 565 (1960).
35. Hoskin F. C. G., *Can J. Biochem. Physiol.* **34**, 743 (1956).
36. Kabacznik M. I., Medwed T. J., *Izwiestja Akad. Nauk S.S.R.R. Ser. Chim. str.* 868 (1953).
37. Kandatsu M., Horiguchi M., *Agr. Biol. Chem.* **26**, 721 (1962).
38. Kandatsu M., Horiguchi M., *Agr. Biol. Chem.* **29**, 781 (1965).
39. Kandatsu M., Horiguchi M., Tamari M., *Agr. Biol. Chem.* **29**, 779 (1965).
40. Kittredge J. S., Praca doktorska (1965), University of California, La Jolla, California.
41. Kittredge J. S., doniesienie prywatne.
42. Kittredge J. S., Hughes R. R., *Biochemistry* **3**, 991 (1964).
43. Kittredge J. S., Isbell A. F., Hughes R. R., *Biochemistry* **6**, 289 (1967).
44. Kittredge J. S., Roberts E., Simonsen D. G., *Biochemistry* **1**, 624 (1962).
45. Koning de A. J., *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 521 (1966).
46. Koning de A. J., *J. Sci. Fd. Agric.* **17**, 460 (1966).
47. Koning de A. J., *Nature* **210**, 113 (1966).
48. Kochman M., Mastalerz P., Wolna E., *Arch. Imm. Ter. Dośw.* **12**, 106 (1964).
49. Kosolapoff G. M., *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 1283 (1948).
50. Kosolapoff G. M., *Organophosphorus Compounds*, New York, 1950.
51. Kretzschamp N., Kayser H., *Chem. Ber.* **89**, 1614 (1956).
52. Liang C. R., Rosenberg H., *Biochim. Biophys. Acta* **125**, 548 (1966).

53. Liang C. R., Rosenberg H., *Biochim. Biophys. Acta* **156**, 437 (1968).
54. Mastalerz P., *Acta Biochim. Polon.* **4**, 19 (1957).
55. Mastalerz P., *Arch. Imm. Ter. Dośw.* **7**, 201 (1959).
56. Mastalerz P., *Roczniki Chem.* **33**, 985 (1959).
57. Mastalerz P., wyniki nieopublikowane
58. Mastalerz P., Wieczorek Z., Kochman M., *Acta Biochim. Polon.* **12**, 151 (1965).
59. La Nauze J. M., Rosenberg H., *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 811 (1967).
60. Quin L. D., *Science* **144**, 1133 (1964).
61. Quin L. D., *Biochemistry* **4**, 324 (1965).
62. Quin L. D., Topics in Phosphorus Chemistry, tom IV, red. M. Grayson i E. J. Griffith, New York 1966, str. 23.
63. Roberts E., Simonsen D. G., Horiguchi M., Kittredge J. S., *Science* **159**, 886 (1968).
64. Rosenberg H., *J. Chromatog.* **2**, 487 (1959).
65. Rosenberg H., *Nature* **203**, 299 (1964).
66. Rosenberg H., La Nauze J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **141**, 79 (1967).
67. Rosenthal A. F., *J. Chem. Soc. str.* 7345 (1965).
68. Rosenthal A. F., *J. Lipid. Res.* **7**, 779 (1966).
69. Rosenthal A. F., Kosolapoff G. M., Geyer R. P., *Rec. Trav. chim.* **83**, 1273 (1964).
70. Rosenthal A. F., Pousada M. *Rec. trav. chim.* **84**, 833 (1965).
71. Rosenthal A. F., Pousada M., *Proc. Chem. Soc. str.* 358 (1964).
72. Rouser G., Kritchevsky G., Heller D., Lieber E., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **40**, 425 (1963).
73. Segal W., *Nature* **208**, 1284 (1964).
74. Shelbourne F. A., Quin L. D., *Biochim. Biophys. Acta* **148**, 595 (1967).
75. Shimizu H., Kakimoto J., Nakajima T., Kanazawa A., Sano I., *Nature* **207**, 1197 (1965).
76. Simon G., Rouser G., *Lipids* **2**, 55 (1967).
77. Thompson G. A., Jr., Woo P., *Biochemistry* **6**, 2015 (1967).
78. Trebst A., Geike F., *Z Naturforsch. Sect. B.* **22**, 989 (1967).
79. Warren S. G., *J. Chem. Soc. str.* 1349 (1966).
80. Warren W. A., *Biochim. Biophys. Acta* **156**, 340 (1968).
81. Wieczorek Z., Mastalerz P., Kochman M., IX Int. Congress for Microbiology, Moscow, July 1966, str. 118.
82. Zeleznick L. P., Myers T. C., Titchener E. B., *Biochim. Biophys. Acta.* **78**, 546 (1963).

Nagrody przyznane w 1968 roku

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego z prawdziwą przyjemnością powiadamia czytelników o przyznaniu dorocznych nagród Towarzystwa:

Nagroda Imienia Bolesława Skarżyńskiego

w wysokości 3000 zł. została przyznana dr *JANUSZOWI SŁAWIŃSKIE-MU* za artykuł pt. „*Chemiluminescencja w biologii*” opublikowany w *Postęпах Biochemii*, **13**, (1967).

Nagroda Imienia Jakuba Parnasa

w wysokości 5000 zł. została przyznana dr *CELINIE JANION* i prof. dr *DAWIDOWI SHUGAROWI* za pracę doświadczalną pt. „*Reaction of amines with dihydrocytosine analogues and formation of aminoacid and peptidyl derivatives of dihydropyrimidines*” opublikowaną w *Acta Biochimica Polonica* **14**, 293 (1969).

BRONISŁAW FILIPOWICZ *

Enzymy nukleolityczne w analityce**

Nucleolytic Enzymes in Analytics

The use of nucleases in the analysis of the structure of nucleic acids is reviewed.

I. Wstęp

Rola enzymów nukleolitycznych (nukleaz) w organizmie nie została dotychczas sprecyzowana. Wysuwane są różne sugestie na ten temat. Tak np. sugerowany jest udział dezoksyrybonukleaz w syntezie DNA. Zauważono, że w okresie maksymalnej syntezy DNA wzrasta również w komórce zawartość tych enzymów, a niektóre polimerazy, katalizujące syntezę DNA, wykazują zarazem aktywność nukleazową. Dezoksyrybonukleazy chronią też komórkę przed obcogatunkowymi kwasami nukleinowymi, a w szczególności przed dopływem obcego materiału genetycznego (46). Wysuwane są też podobne przypuszczenia na temat udziału rybonukleaz w syntezie RNA. Stwierdzono np. w jęczmieniu (44), w *Tiobacillus thio-parus* (50) i w innych organizmach, że wzmożonej syntezie oligonukleotydów towarzyszy wzmożona aktywność rybonukleaz. Wysuwano także sugestie (2, 38, 76) o występowaniu w preparatach rybonukleaz odmiennych frakcji, jednych katalizujących procesy syntezy i innych związanych z procesami degradacji RNA.

Określenie roli tych enzymów jest trudne zwłaszcza, że w jednym organizmie występuje przeważnie kilka różnych nukleaz. Zauważono to w śledzionie, trzustce, wątrobie różnych organizmów zwierzęcych. Podobnie np. w paciorkowcach stwierdzono cztery enzymy depolimeryzujące DNA (77), a w *E.coli* pięć oraz trzy dość dobrze scharakteryzowane rybonukleazy (45). Dwie rybonukleazy (o optimum działania w pH 5 i 7) wy-

* Prof. dr, Katedra Chemii Ogólnej i Fizjologicznej, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna, Łódź

** Treść tego artykułu była przedmiotem referatu na V Sympozjum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Krakowie, 1967

izolowano w naszym Zakładzie z *Paramecium aurelia* (25, 26). Gołaszewski z marchwi wyizolował i scharakteryzował dwie rybonukleazy (24), podobnie dwie specyficznie działające rybonukleazy występują w Ta-kadiastazie *Aspergillus oryzae* (17), itd.

Poznanie wielu swoiście działających nukleaz w dużej mierze ułatwiło badanie struktury kwasów nukleinowych. Dla oznaczania składu nukleoty-dowego znaleziono już dość dawno różne sposoby chemiczne. Na przy-kład RNA, poddany hydrolizie alkalicznej rozpada się, poprzez cykliczne nukleotydy, na mieszaninę 2' i 3'-monofosfonukleozydów, które można rozdzielić i oznaczyć ilościowo.

Z DNA można usunąć w odpowiednich warunkach zasady purynowe lub pirymidynowe i otrzymać kwas apurynowy (51, 69, 70), bądź apirymi-dynowy (10), co ułatwia dalsze badania łańcucha.

Natomiast przy ustalaniu pełnej sekwencji nukleotydów w łańcuchach kwasów nukleinowych niezastąpione stały się metody enzymatyczne. Dotyczy to zwłaszcza tRNA, których masa cząsteczkowa wynosi zaledwie około 25 000. Wysoka masa cząsteczkowa naturalnych DNA i innych odmian RNA zmusza jeszcze do ograniczenia badania tego materiału do sekwencji nukleotydów we fragmentach łańcucha, w oligonukleotydach lub do oznaczeń względnych częstości występowania pewnych sekwencji.

II. Specyficzność działania nukleaz

Do niedawna w rozważaniach na temat działania enzymów nukleoli-tycznych dzielono je (60) na:

1. Dezoksyrybonukleazy i rybonukleazy w związku ze swoistością dzia-łania na kwasy nukleinowe zawierające odpowiednie pentozy.
2. Endo i egzokleazy (podobnie jak endo i egzopeptydazy).
3. Enzymy specyficzne w zależności od budowy sąsiadującej zasady pury-nowej lub pirymidynowej.
4. Enzymy, których produktami działania są bądź 3'-nukleotydy, bądź 5'-nukleotydy.
5. Enzymy działające na jedno lub dwuniciowe łańcuchy kwasów nuklei-nowych.

Żadne z tych kryteriów nie utrzymało się w pełni. Na przykład nukle-azy z *Azotobacter* (67), z mózgu cieląt (28), z mitochondriów wątroby szczura (12) rozszczepiają obie odmiany kwasów nukleinowych. Te nukle-azy Heppel (31) nazywa, po prostu, fosfodwuesterazami. Nie utrzymał się także podział na endo i egzokleazy. Rybonukleaza z trzustki atakuje nie tylko międzynukleotydowe wiązania wewnątrz łańcucha, lecz rozszcze-pia także cykliczne rybonukleozydo-2,3-fosforany do odpowiednich 3'-nu-kleotydów. Nukleazy u *Staphylococcus aureus* w pierwszym okresie dzia-łania katalizują hydrolizę wiązań położonych w głębi łańcucha, a w koń-

cowych etapach odszczepiają skrajne nukleotydy. W pracowniach Laskowskiego (73) i Šorma (15) stwierdzono, że niektóre dezoksyrybonukleazy w początkowych etapach działania atakują wiązania między-nukleotydowe w sąsiedztwie innych zasad niż w końcowych stadiach reakcji. Specyficzność reakcji zmienia się więc w miarę jej przebiegu. Nie bez wpływu jest też rodzaj aktywującego kationu (6). Ostatnio kwestionowana jest nawet swoistość działania rybonukleazy trzuskowej (22), o której było wiadomo, że z łańcucha RNA uwalnia oligonukleotydy zawsze zakończone nukleotydem pirymidynowym.

Omawiając specyficzność działania nukleaz posłużymy się klasyfikacją ustaloną przez Komisję Enzymową Międzynarodowej Unii Biochemicznej (18). Według tej klasyfikacji enzymy katalizujące hydrolizę kwasów nukleinowych do oligonukleotydów, nukleotydów i nukleozydów zaliczono głównie do hydrolaz, w szczególności do pod-podklasy — hydrolaz dwu-estrów fosforanowych, zwanych potocznie dwu-esterazami, oraz hydrolaz mono-estrów fosforanowych, zwanych mono-esterazami. Wyjątek stanowią rybonukleazy, zaliczane do klasy transferaz, ponieważ pierwszym etapem ich działania jest przenoszenie grup 3'-fosforanowych z pozycji 5' sąsiadujących nukleotydów na pozycję 2' z utworzeniem cyklicznego nukleotydu.

W niniejszym artykule ograniczymy się do omówienia tych pod-podklas, które obejmują enzymy stosowane w badaniach budowy łańcuchów kwasów nukleinowych (tablica 1).

Tablica 1

Enzymy katalizujące procesy rozpadu kwasów nukleinowych

Nazwy pod-podklas	Numeracja Komisji Enzymowej (19)
Hydrolazy dwu-estrów fosforanowych	EC 3.1.4
Nukleotydylotransferazy (rybonukleazy)	EC 2.7.7
Hydrolazy mono-estrów fosforanowych	EC 3.1.3

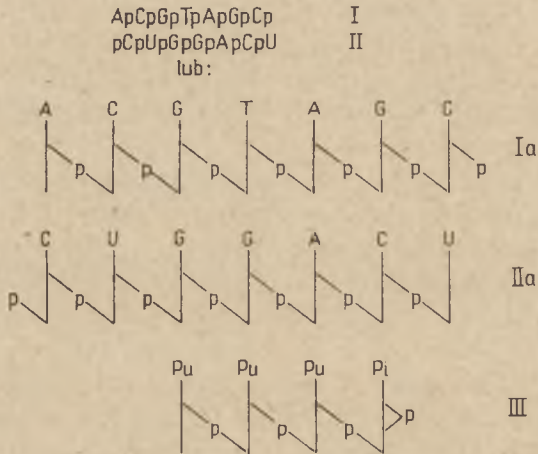
Pierwsze dwie z wymienionych grup w tablicy 1 można zaliczyć do dwu-esteraz. W skład trzeciej grupy wchodzi mono-esterazy.

Przed omówieniem specyficzności działania nukleaz należy przypomnieć stosowane, zgodnie z propozycją Smitha i Markhama (65), skróty w zapisie łańcuchów polinukleotydowych (schemat 1).

1. Hydrolazy dwu-estrów fosforanowych

W tej pod-podklasie Komisja Enzymowa sklasyfikowała tylko 5 nukleaz, z których dwie działają na DNA, a pozostałe na obie odmiany kwasów nukleinowych (tablica 2).

Endonukleazy. Cztery spośród sklasyfikowanych hydrolaz dwustrów fosforanowych rozszczepiają wiązania dwustrowe wewnątrz łańcucha i dlatego nazywane są endonukleazami.



Schemat 1. Fragmenty łańcuchów polinukleotydydowych

W łańcuchach I i II: A — adenozyina, G — guanozyina, C — cytydyna, U — urydyna, T — tymidyna, X — nieznaną nukleotydyd; p — fosforan w pozycji 3' (jeżeli jest po dużej literze) lub w pozycji 5' (jeżeli poprzedza dużą literę), lub też wiązanie 3'—5' (jeżeli jest pomiędzy dużymi literami)

We wzorze Ia i IIa pionowa linia oznacza pentozę. Wzór III przedstawia fragment łańcucha IIa strawionego rybonukleazą zakończony cyklicznym nukleotydem. Pu — zasada purynowa, Pi — zasada pirymidynowa

Poznano już jednak kilkadziesiąt takich enzymów różnego pochodzenia. Znaczna ich część, w odpowiednich warunkach, działa dość specyficznie i dzięki temu analityk dysponuje dziś dużym arsenałem środków. Szczególnie bogatym źródłem tego rodzaju nukleaz okazały się bezkręgowce: owady i drobnoustroje, z których izolowane są nukleazy o znacznej swoistości działania. Tak np. ze *Streptococcus pyogenes* wyizolowano endonukleazę, zwaną dawniej streptodornazą (EC 3.1.4.5). Enzym ten znacznie silniej katalizuje hydrolizę rodzimego DNA niż kwasu zdenaturowanego.

Egzonukleazy. Wśród fosfodwuesteraz odszczepiających skrajny mononukleotyd od jednego z końców łańcucha na szczególną uwagę zasługuje fosfohydrolaza dwustrów ortofosforanowych (EC 3.1.4.1.). Pod tym numerem sklasyfikowano mało specyficzne enzymy atakujące zarówno DNA jak i RNA. Pewna specyficzność zależy od pochodzenia enzymu. Przykładem są fosfodwuesterazy z jadu węży i ze śledziony. Pierwsza atakuje oligonukleotydy odszczepiając stopniowo 5'-fosfonukleozydy. Optymalnym substratem dla tej fosfodwuesterazy jest polinukleotyd zawierający wolną resztę 3'-OH z jednego końca łańcucha i zestryfikowaną resztę 5'-O-p z drugiego końca (schemat 2, łańcuch I). Oligonukleotyd z wolną resztą 3'-OH ale pozbawiony pierwszorzędowej grupy fosforanowej z drugiego

Tablica 2

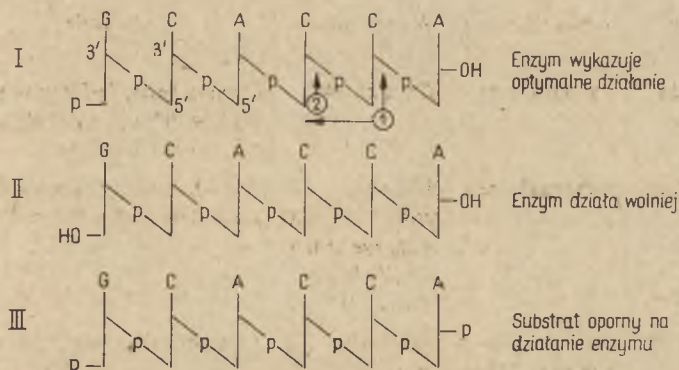
Hydrolazy dwustrów fosforanowych (EC 3.1.4)

Nr EC	Nazwa potoczna	Występowanie	Produkty reakcji	Preferencje
3.1.4.5	Dezoksyrybonukleaza (endo) (23)	Trzustka, paciorkowce (streptodornaza) (42)	5'-Oligonukleotydy (64)	pPu-pPi (41)*
3.1.4.6	Dezoksyrybonukleaza II (4)	Śledziona, grasicca	3'-Oligonukleotydy	W początkowych etapach Gp-Cp (15), w końcowych Pip-Pup* (13)
3.1.4.7	Nukleaza mikrokoków (endo, a następnie egzo) (49)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Działa na DNA i RNA, tworzy 3'-oligonukleotydy	A-T
3.1.4.9	Nukleaza z <i>Azotobacter</i> (endo) (66)	—	Działa na DNA i RNA, tworzy 5'-oligonukleotydy	
3.1.4.1	Fosfodwuesteraza	Śledziona (32), jad węży (43)	Działa na DNA i RNA, tworzy 3'-mononukleotydy, 5'-mononukleotydy	

* Pu — puryna

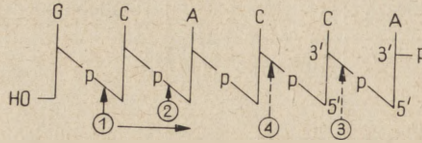
* Pi — pirymidyna

krańca łańcucha, jest rozkładany znacznie wolniej (schemat 2, łańcuch II). Natomiast oligonukleotyd zakończony w położeniu 3' grupą fosforanową jest bardzo oporny na działanie tego enzymu (schemat 2, łańcuch III). Podobnie działa fosfodwuesteraza ze śluzówki przewodu pokarmowego.



Schemat 2. Działanie fosfodwuesterazy z jadu węży

Natomiast fosfodwuesteraza ze śledziona odszczepia od oligonukleotydu 3'-fosfonukleozydy (schemat 3, strzałka 1, 2 itd). W przeciwieństwie do fosfodwuesterazy z jadu węży, w tym procesie wolna grupa 5'-OH ułatwia wiązanie się enzymu z substratem.



Schemat 3. Działanie fosfodwuesterazy ze śledziona

Podany na schemacie 3 proces hydrolizy może być również katalizowany przez fosfodwuesterazę z jadu węży, lecz odszczepianie nukleotydów rozpoczyna się wówczas od drugiego końca (schemat 3; najpierw strzałka 3, następnie 4 itd.), a szybkość reakcji wynosi wówczas zaledwie 0,1% szybkości działania fosfodwuesterazy ze śledziona (63).

Powyższe uwagi o specyficzności tych enzymów należy traktować z zastrzeżeniami. Jeżeli mianowicie substratem są wielkocząsteczkowe polimery, wówczas fosfodwuesterazy mogą rozszczepiać również wiązania wewnątrz łańcucha, a wolna grupa -OH na końcu łańcucha nie jest bezwzględnie konieczna do ich działania.

2. Nukleotydylotransferazy

W tej pod-odklasi sklasyfikowano tylko trzy rybonukleazy (tablica 3).

Tablica 3

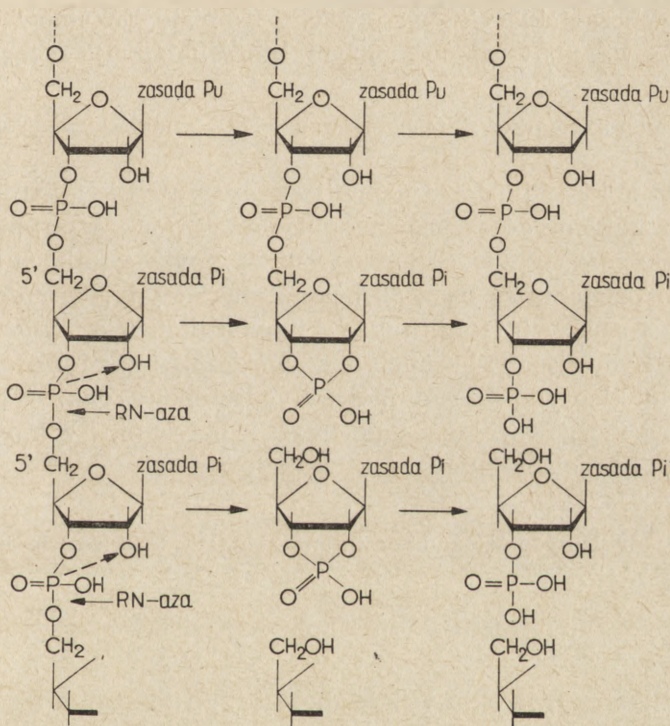
Nukleotydylotransferazy (EC 2.7.7)

Nr EC	Nazwa potoczna	Występowanie	Reakcje
2.7.7.16	Rybonukleaza	Trzustka (40)	Przenosi resztę fosforanową nukleotydów Pi^* z 5' na 2' (48), szybciej Cp niż Up (54)
2.7.7.17	Rybonukleaza	Rośliny: trawa morska (ang. <i>rye grass</i>) (59), liście szpinaku (71)	Przenosi reszty fosforanowe nukleotydów Pu^* i Pi^* z 5' na 2'
2.7.7.26	Guanylorybonukleaza (57)	<i>Aspergillus oryzae</i> (58)	Przenosi tylko reszty guanylowe

* Pu — puryna
* Pi — pirymidyna

Wszystkie trzy enzymy w pierwszym etapie działania mają własności cyklizujące, w drugim zaś rozszczepiają powstały cykliczny układ, dając przeważnie 3'-nukleotydy.

Rybonukleaza z trzustki wołu jest najlepiej poznana. Enzym ten atakuje głównie międzynukleotydowe wiązania nukleotydów pirymidynowych. Dlatego w produktach degradacji RNA powstają, odporne na działanie nukleazy, oligonukleotydy purynowe (rdzeń) zakończone cyklicznym nukleotydem pirymidynowym. Ten ulega w następnym etapie rozszczepieniu, a więc ostatecznymi produktami są oligonukleotydy purynowe zakończone nukleotydem pirymidynowym i 3'-nukleotydy pirymidynowe (schemat 4).



Schemat 4. Działanie rybonukleazy trzustkowej

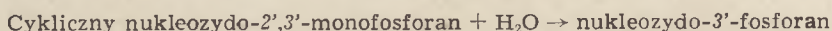
Rybonukleazy roślinne rozszczepiają RNA na cykliczne mononukleotydy zarówno purynowe jak i pirymidynowe. Poznano kilka z nich. Niektóre jak rybonukleaza z ziemniaków rozszczepiają RNA do nukleotydów. W ziemniakach znaleziono również nukleazę atakującą zarówno RNA jak i DNA (16).

Guanylorybonukleaza. Bardzo cennym osiągnięciem japońskich badaczy było wyodrębnienie tej nukleazy z Takadiastazy, otrzymanej z hodowli *Aspergillus oryzae*. Enzym ten, w pH 7,5 rozszczepia wiązanie

Gp-Xp i tworzy oligonukleotydy zakończone guanozyno-2',3'-cyklicznym fosforanem.

Szczegółowsze badania enzymów zawartych w Takadiastazie wykazały, że występują tam dwie rybonukleazy (72). Jedna z nich, rybonukleaza T₁, rozszczepia wiązanie Gp-Xp, dając bądź oligonukleotyd zakończony cyklicznym guanozynofosforanem, bądź cykliczny kwas guanylowy. Druga rybonukleaza T₂ preferuje rozszczepianie wiązania Ap-Xp (55). Oba te enzymy, analogicznie do działania enzymu z trzustki, katalizują przejście skrajnych cyklicznych nukleotydów w odpowiednie 3'-nukleotydy. Wymienione enzymy często używane są do badań sekwencji nukleotydów w łańcuchach RNA.

Dwuesterazy hydrolizujące cykliczne nukleozydomonofosforany nie zostały dotychczas sklasyfikowane przez Komisję Enzymową. W jądzie *Crotalus adamanteus* występuje enzym, który katalizuje reakcję:



W odróżnieniu od innych rybonukleaz enzym ten katalizuje hydrolizę cyklicznych nukleotydów zarówno purynowych jak i pirymidynowych (14). Podobne enzymy występują również w innych tkankach (75), a produktami ich działania są bądź 3', bądź 2'-nukleotydy. Z mózgow bydlęcych, psich, szczyrzych (16), a także z innych tkanek otrzymano enzymy katalizujące hydrolizę cyklicznych nukleozydo-2,3-monofosforanów do odpowiednich nukleozydo-2-fosforanów. Wyodrębniono również, np. z psiego serca, z kory mózgowej, kory nadnercza, z nerek (9) i z innych tkanek zwierzęcych, hydrolazy katalizujące reakcję:



3. Hydrolazy monoestrów fosforanowych

Komisja Enzymowa sklasyfikowała w tej grupie tylko trzy nukleazy, które działają zarówno na rybo- jak i dezoksynukleotydy i oligonukleotydy (tablica 4). Punktem zaczepienia jest prawdopodobnie reszta fosforanowa. Enzymy te, rozpowszechnione w świecie roślinnym i zwierzęcym, są dość odporne na działanie podwyższonej temperatury.

5'-Nukleotyduazy wykazują niewielką specyficzność zależną zarówno od pochodzenia jak i sposobu wyodrębniania enzymu (tablica 5).

Na uwagę zasługują nukleotyduazy z plazmy nasienia, z których jedna (a) wykazuje bardzo małą specyficzność, a druga (b) spośród badanych kilku odmian nukleotydów hydrolizuje tylko adenozydo-5'-fosforan. S u ł k o w s k i i wsp. (68), badając szczegółowo aktywność 5'-nukleotyduazy z *Bothrops atrox* stwierdzili, że do procesu hydrolizy konieczna jest zasada

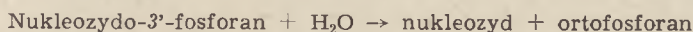
przy C-1' rybozy i wolna grupa -OH przy C-3'. Przy C-2' może być bądź grupa -OH, bądź -H (dezoksynukleotydy).

Tablica 4

Hydrolazy monoestrów fosforanowych (EC 3.1.3)

Nazwa potoczna	Numeracja Komisji Enzymowej
5'-Nukleotydaza (61)	EC 3.1.3.5
3'-Nukleotydaza (62)	EC 3.1.3.6
3'-Nukleotydaza fosfoadenylanowa (1, 3)	EC 3.1.3.7

3'-Nukleotydzasy występują głównie w organizmach roślinnych i w mikroorganizmach. Najbogatszym źródłem okazały się nasiona rajgrasu. Enzymy te katalizują reakcję:



Substratami są prawie wszystkie 3'-rybonukleotydy oraz oligonukleotydy zakończone grupą fosforanową przy C-3', lecz szybkość procesów

Tablica 5

Porównanie szybkości hydrolizy różnych 5'-nukleotydów przez 5'-nukleotydzasy uzyskane:

a) z plazmy nasienia (30), b) z plazmy nasienia (74), c) z ziemniaków, d) z jadu *Bothrops atrox* (39)

Substrat	Względna aktywność enzymu*			
	a	b	c	d
Adenozyno-5'-fosforan	100	100	100	100
Guanozyno-5'-fosforan	—	0	—	42
Inozyno-5'-fosforan	113	—	125	41
Cytydino-5'-fosforan	268	0	—	89
Urydino-5'-fosforan	220	0	133	36
Dezoksyguanozyno-5'-fosforan	—	—	94	33
Dezoksytydino-5'-fosforan	—	—	112	62

* za 100 przyjęto względną aktywność danego enzymu w stosunku do adenozyno-5'-fosforanu

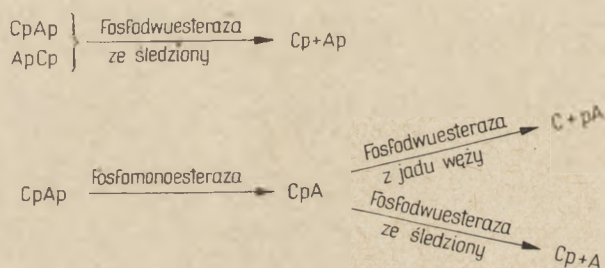
hydrolizy jest różna. Natomiast dezoksyadenozyno-3'-fosforan nie jest atakowany, co wskazywałoby, że do przebiegu procesu konieczna jest wolna grupa -OH przy C-2' rybozy (3, 11).

3'-Nukleotydzasa fosfoadenylanowa (EC 3.1.3.7), która katalizuje reakcję:

Adenozyno-3',5'-dwufosforan + H₂O → adenozyno-5'-monofosforan + ortofosforan
działa również na 3'-fosfoadenylilosiarczan.

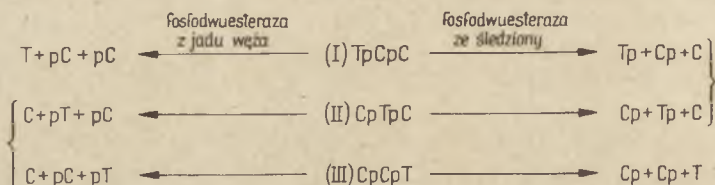
III. Ustalenie sekwencji nukleotydów

Fosfomonoesterazy znalazły zastosowanie w analityce. Między innymi Burton (8) podaje przykłady ich zastosowania w badaniu struktury oligonukleotydów. Dwunukleotyd CpAp (schemat 5) nie jest rozkładany przez fosfodwuesterazę jadu węża, ponieważ zawiera pierwszorzędową resztę fosforanową przy węglu 3'-adenozyny. Hydroliza dwuesteraz ze śledziona daje mieszaninę 3'-fosfoadenozyny i 3'-fosfocytydyny. Otrzymane produkty nie dają żadnej informacji o sekwencji tych nukleotydów, ponieważ takie same związki otrzymanoby w wyniku hydrolizy dwunukleotydu ApCp. Natomiast po odszczepieniu pierwszorzędowo związanej reszty fosforanowej fosfomonoesterazą można zastosować fosfodwuesterazę z jadu węży i ustalić sekwencję dwunukleotydu analizując produkty obu reakcji (schemat 5).



Schemat 5. Zastosowanie fosfomonoesterazy w badaniach sekwencji oligonukleotydów

Innym przykładem jest zastosowanie fosfodwuesteraz do analizy sekwencji. Zbadanie sekwencji trójdezoksyrybonukleotydu, składającego się z dwóch reszt dezoksycytydyny i jednej tymidyny, jest możliwe poprzez porównanie produktów trawienia powstających w wyniku działania fosfodwuesteraz ze śledziona i z jadu węża (schemat 6).

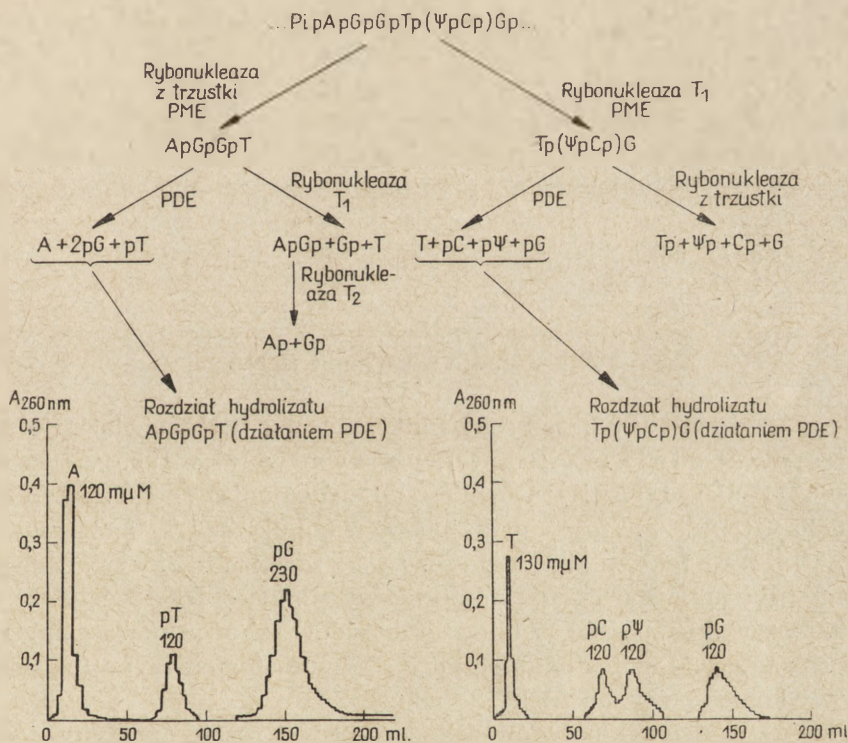


Schemat 6. Zastosowanie fosfodwuesteraz w badaniach sekwencji oligonukleotydów

Na schemacie 6 zaznaczono, że w wyniku działania fosfodwuesterazy ze śledziona na izomery I i II powstają jednakowe produkty trawienia. Na rozstrzygnięcie między tymi dwoma izomerami pozwala dopiero do-

datkowa analiza hydrolizatu uzyskanego za pomocą fosfodwuesterazy z jadu węża. Z kolei analiza hydrolizatu, uzyskanego działaniem samej fosfodwuesterazy z jadu węża, pozwala na zaproponowanie sekwencji II i III, a rozstrzygnięcie przynosi porównanie hydrolizatów otrzymanych działaniem obu fosfodwuesteraz.

Bardziej złożonym przykładem jest ustalenie sekwencji ośmionukleotydu (79), otrzymanego z dłuższego fragmentu łańcucha tRNA. Oligonukleotyd ten poddano działaniu rybonukleazy trzustkowej, rybonukleazy T_1 i fosfomonoesterazy, a następnie ponownie działaniu tych samych enzymów oraz fosfodwuesterazy i rybonukleazy T_2 . Otrzymane nukleotydy i nukleozydy rozdzielono na kolumnie chromatograficznej wypełnionej DEAE-celulozą, a zawartość poszczególnych frakcji oznaczono spektrofotometrycznie w 260 nm (schemat 7).



Schemat 7. Analiza ośmionukleotydu (wg 79)

Reprodukowane za zgodą wydawnictwa Pergamon Press

U góry: Enzymatyczna hydroliza oligonukleotydów PME — fosfomonoesteraza, PDE — fosfodwuesteraza

U dołu: Rozdział na kolumnie z DEAE-celulozy i analiza spektrofotometryczna niektórych końcowych produktów hydrolizy enzymatycznej

W ostatnich latach dzięki stosowaniu odpowiednich nukleaz zdołano już oznaczyć kolejność nukleotydów kilku tRNA np.:

- a) tRNA alaniny, zbudowany z 77 nukleotydów; jego antykodonem jest IGC (34),
- b) tRNA seryny zawierający 84 nukleotydy i IGA jako antykodon (78),
- c) tRNA tyrozyny zawierający 78 nukleotydów i antykodon z nietypowym nukleozydem — pseudourydyną (G ψ A) (47),
- d) tRNA fenyloalaniny zawierający również 78 nukleotydów i nietypową zasadę (metylowaną guaninę) w antykodonie (2-O-Me-GAA) (52).

Te i inne nieraz znacznie już zaawansowane prace w dziedzinie budowy innych odmian tRNA pozwoliły na pewne uogólnienia dotyczące struktury cząsteczki tRNA (21). Tak np. piąta zasada akceptorowego końca łańcucha wiąże się komplementarnie z guaniną drugiego końca łańcucha, w każdym ze zbadanych tRNA występują przynajmniej trzy pętle, z których jedna zawiera trójnukleotyd T ψ C, druga antykodon, trzecia dwuhydrouacyl itd.

Ostatnio zdołano również ustalić sekwencję nukleotydów w łańcuchu RNA 5S z rybosomów komórek nowotworu KB człowieka (20). Łańcuch zawiera 120 lub 121 nukleotydów. Jest to pierwsza praca, w której ustalono sekwencję nukleotydów w kwasie nukleinowym pochodzenia zwierzęcego. Kwas rybonukleinowy znakowany ³²P trawiono rybonukleazą trzustkową i rybonukleazą T₁, a produkty rozdzielano metodą dwuwymiarowej elektroforezy na bibule. Metoda ta została opracowana w pracowni S a n g e r a (7, 56).

IV. Ustalanie sekwencji tRNA

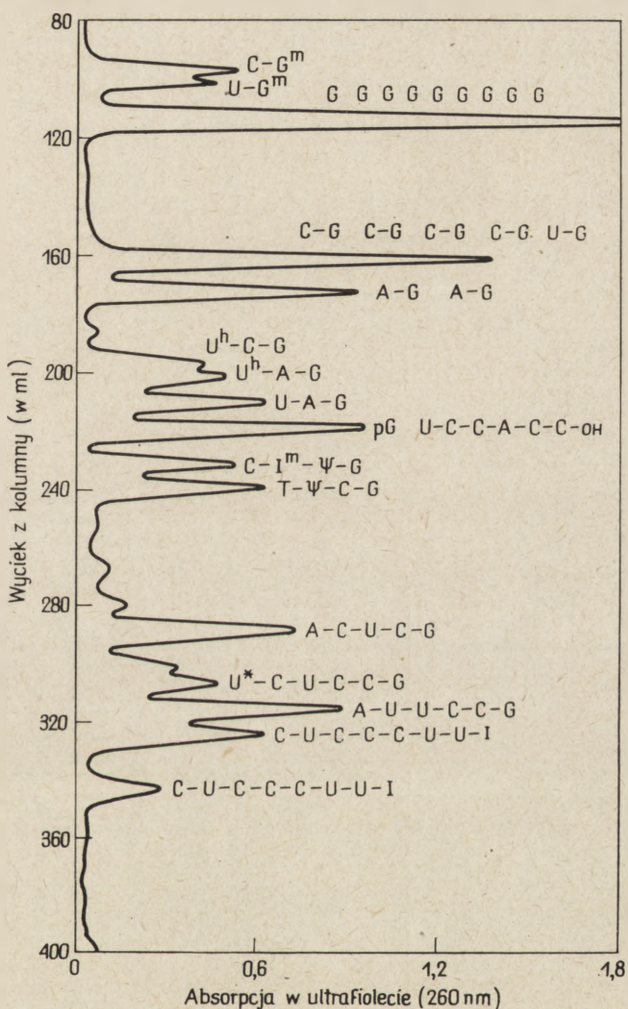
Pierwszy dokładny obraz sekwencji łańcucha tRNA, związku o masie cząsteczkowej 26 600 (sól sodowa), uzyskano w roku 1965 w pracowni Holleya. Holley i współpracownicy do oznaczania 77 nukleotydowego łańcucha tRNA^{A1a}, stosowali najpierw rybonukleazę T₁ i rybonukleazę z trzustki. Rysunek 1 przedstawia rozdział hydrolizatu, otrzymanego działaniem rybonukleazy T₁, na kolumnie wypełnionej DEAE-celulozą (33). Niemal wszystkie spośród 17 oligonukleotydów zakończone są guanozyno-3'-fosforanem. Monofosfonukleotyd 3',5'-dwufosfoguanozyna (pG) stanowi lewy koniec łańcucha tRNA.

Jeden z sześciounukleotydów zakończony jest resztą cytozyny z wolną grupą -OH przy węglu 3' (U-C-C-A-C-C-OH). Jest to prawy koniec łańcucha tRNA^{A1a}.

Działaniem rybonukleazy trzustki uzyskano 40 fragmentów łańcucha (schemat 8). Jeden z czteronukleotydów zawiera pierwszorzędową resztę fosforanową przy węglu 5'. Stanowi on lewy kraniec łańcucha tRNA.

Metody pozwalające na ustalenie sekwencji dwu, trój i dłuższych oligonukleotydów omówiono wyżej. W badaniach oligonukleotydów o więk-

szej masie cząsteczkowej duże usługi oddała również, zastosowana przez Holleya (35) metoda skróconego czasu trawienia fosfodwuesterazą z jadu węża. Enzym ten w odpowiednich warunkach rozkłada np. ósmionukleotyd, po uprzednim usunięciu jego końcowej reszty fosforanowej, na szereg oligonukleotydów o kolejno zmniejszającej się liczbie reszt nu-



Rysunek 1. Rozdzielanie fragmentów tRNA^{Ala} po działaniu rybonukleazą T₁

G^m — kwas metyloguanylowy,
U^h — kwas dwuhydroksurydylowy, I — kwas inozynowy,
I^m — kwas 1-metyloinozynowy, ψ — kwas pseudourydylowy

Reprodukowane za zgodą.
Prawa autorskie (C) 1966
Scientific American, Inc.
Wszystkie prawa zastrzeżone

kleotydowych od siedmiu do dwu. Rozdział chromatograficzny i analiza otrzymanych produktów, po przeprowadzeniu ich alkalicznej hydrolizy (rysunek 2), pozwoliła na ustalenie sekwencji ósmionukleotydu, gdyż w każdym z hydrolizatów występował tylko jeden, końcowy nukleozyd.

W ustaleniu sekwencji cennym było również spostrzeżenie Holleya, że w temperaturze 0°C krótkie działanie rybonukleazą T₁ rozszczepia łańcuch tRNA na dwie mniej więcej równe części.

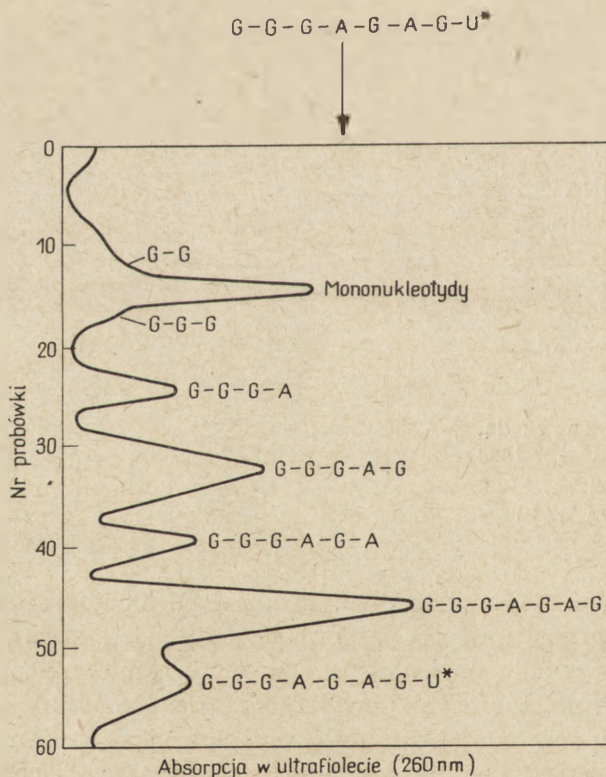
Pomocą w zestawieniu fragmentów było występowanie nielicznych

nietypowych zasad. Tak np. w łańcuchu tRNA^{A1a} występuje tylko jeden nukleotyd inozynowy. Po trawieniu rybonukleazą T₁ znalazł się on w ośmionukleotydzie C-U-C-C-C-U-U-I, natomiast w produkcie trawienia tRNA rybonukleazą trzustkową występuje on w trójnukleotydzie I-G-C.

pG-G-G-C	G ^m -C	I-G-C
C C	G-U	G-G-T
C C	G-U	G-G-A-C
C U	G-U	G-G-G-A-G-A-G-U*
C U	G-U	C OH
C U	I ^m -ψ	
C U	A-C	
C U	A-G-U ^h	
C U	G-G-U ^h	
C ψ	G ^m -G-C	
C G-C	A-G-C	
C G-C	G-A-U	

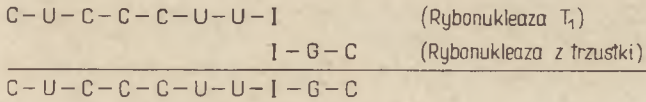
Schemat 8. Produkty rozkładu tRNA^{A1a} rybonukleazą z trzustki

G^m — kwas 1-metyloguanylowy, U^h — kwas dwuhydroksurydylowy, I — kwas inozynowy, I^m — kwas 1-metyloinozynowy, ψ — kwas pseudouridylowy



Rysunek 2. Trawienie oligonukleotydu fosfodwuesterazą z jadu węża (wg Holley'a i wsp.)

Podsumowanie pozwala na ustalenie sekwencji dziesięcionukleotydu (schemat 9).



Schemat 9. Zestawienie fragmentów zawierających nietypową zasadę

Podobne metody stosowano w pracowni Zachaua w ustalaniu sekwencji tRNA^{ser} czy też u Engelhardta w pracach nad budową łańcucha tRNA^{wal} i w innych pracowniach.

Trudno w krótkim referacie omówić szczegóły metod, które stosowano badając te zagadnienia. Prace nad ustaleniem sekwencji łańcucha alaninowego tRNA trwały około siedmiu lat. Obecnie tempo takich prac jest szybsze, niemniej prowadzenie tego rodzaju badań wymaga jeszcze benedyktyńskiej cierpliwości.

V. Uwagi końcowe

Podkreślić należy, że metody enzymatyczne są nadal niezastąpione w analizie kwasów nukleinowych, a nawet zyskują na znaczeniu. W miarę postępu badań i zwiększania technicznych możliwości uzyskiwania coraz bardziej jednorodnych frakcji białkowych otrzymuje się coraz więcej enzymów o bardziej specyficznym działaniu. Przykładem mogą być egzonukleazy otrzymane z *E.coli* (45) (tablica 6). Spośród nich egzonukleaza I katalizuje hydrolizę głównie jednoniciowego zdenaturowanego łańcucha DNA, poczynając od końca z 3' grupą -OH. Szybkość działania na zdenaturowany DNA jest 40 000 razy większa niż na rodzimy DNA. Produktami hydrolizy są mono- i dwunukleotydy z grupą 5'-fosfomonoestrową. Egzonukleaza II działa podobnie lecz na niezdenaturowany naturalny łańcuch DNA. Rozszczepia ona wszystkie wiązania międzynukleotydowe, a końcowymi produktami są nukleozydo-5'-fosforany. Egzonukleaza III działa podobnie jak egzonukleaza II z tym, że rozszczepia tylko część łańcucha związaną wiązaniem wodorowymi z komplementarnym łańcuchem. Produktami hydrolizy są mononukleozydo-5'-fosforany i jednoniciowy polinukleotyd. Niedawno (1966) w pracowni Koernerera (36) wyizolowano z *E.coli* czwartą egzonukleazę, która 20-krotnie szybciej działa na oligonukleotydy niż na wielkocząsteczkowy DNA.

Tablica 6

Egzonukleazy *E. coli*

Egzonukleaza	I	Działa b. silnie na jednopasmowy zdenaturowany DNA Nie działa na dwupasmowy łańcuch DNA
Egzonukleaza	II	Nieznaczna preferencja hydrolizy naturalnego dwupasmowego DNA
Egzonukleaza	III	Silne działanie na naturalny DNA, lecz nie działa na jednopasmowy DNA i oligonukleotydy
Egzonukleaza Fosfomonoesteraza (DNA-fosfataza)	IV	Działa 20-krotnie silniej na oligonukleotydy niż na DNA Odszczepia 3' resztę fosforanową od prawego końca łańcucha DNA

U *E. coli* stwierdzono również występowanie fosfomonoesterazy (DNA-fosfataza), odszczepiającej 3' resztę fosforanową z końca łańcucha DNA (53). Enzym ten umożliwia działanie omówionych wyżej egzonukleaz, których hydrolityczne działanie rozpoczyna się od wolnej 3' grupy -OH łańcucha DNA.

Podobnie działające nukleazy występują również w materiale zwierzęcym. Z mózgu jagniąt i z nerek owiec otrzymano (29) endonukleazę, która znacznie silniej katalizuje hydrolizę zdenaturowanego łańcucha DNA niż naturalnego związku. Ostatnio z nerek owcy wyodrębniono (37) nukleazę, która nie wykazuje specyficzności ani względem zasad, ani składnika cukrowego, hydrolizuje natomiast zdenaturowane kwasy nukleinowe, a także poliA i poliU do 5'P-oligonukleotydów. Hydrolizuje również, lecz bardzo wolno, tRNA do cztero lub pięcionukleotydów. Prawdopodobnie atakowane są tylko niepowiązane pętle łańcucha tRNA.

Jak z tego wynika, nukleazy mogą być pomocne nie tylko w badaniach sekwencji łańcucha polinukleotydowego, lecz również w badaniach przestrzennej budowy tych związków i budowy ich hybrydów. Pozwalają one również na badanie ich stanu fizycznego, stopnia polimeryzacji itd. Podano zresztą tylko nieliczne przykłady tych możliwości jakie uzyskuje badacz w miarę otrzymywania coraz bardziej oczyszczonych, jednorodnych enzymów.

LITERATURA

1. Baddiley J., Buchanan J. G., Letters R., *J. Chem. Soc.* str. 1000 (1958).
2. Bardoń A., *Post. Biochem.* 13, 389 (1967).
3. Barker G. R., Lund G., *Biochim. Biophys. Acta* 55, 987 (1962).
4. Bernardi G., Bernardi A., Chersi A., *Biochim. Biophys. Acta* 129, 1 (1966).
5. Björk W., *Biochim. Biophys. Acta* 95, 652 (1965).

6. Bollum F. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 2599 (1965).
7. Brownlee G. G., Sanger F. J., *J. Mol. Biol.* **23**, 337 (1967).
8. Burton K., w *Essays in Biochemistry*, Academic Press 1, str. 66 (1965).
9. Butcher R. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **237**, 1244 (1962).
10. Chargaff E., Rust P., Temperli A., Morisawa S., Danon A., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 149 (1963).
11. Cunningham L., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2546 (1958).
12. Curtis P. J., Burdon M. G., Smellie R. M. S., *Biochem. J.* **98**, 813 (1966).
13. Dąbrowska W., Cooper B. J., Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **177**, 991 (1949).
14. Decker C. A., *Federation Proc.* **13**, 197 (1954).
15. Doskočil J., Sorm F., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 211 (1961).
16. Drummond G. I., Iyer N. T., Keith J., *J. Biol. Chem.* **237**, 3535 (1962).
17. Egami F., Takahashi K., Uchida T., *Progress in Nucleic Acid Research*, t. 3, 59 (1964).
18. *Enzyme Nomenclature Recommendations (1964) of the International Union of Biochemistry*, Brisbane, 1964.
19. *Enzymy. Nomenklatura i Klasyfikacja. Zalecenia Międzynarodowej Unii Biochemicznej z roku 1964 dotyczące nomenklatury i klasyfikacji enzymów wraz z ich jednostkami i symbolami kinetyki enzymatycznej. Tłumaczenie z angielskiego pod redakcją T. Korzybskiego*, PWN, Warszawa, 1967.
20. Forget B. G., Weissman S. M., *Science* **158**, 1965 (1967).
21. Fuller W., Hodyson A., *Nature* **215**, 817 (1967).
22. Gassen H. G., Witzel H., *Eur. J. Biochem.* **1**, 36 (1967).
23. Georgatsos J. G., Unterholzner W. C., Laskowski M., *J. Biol. Chem.* **237**, 2626 (1962).
24. Gołaszewski T., *Post. Biochem.* **10**, 369 (1964).
25. Gross M., Praca doktorska.
26. Gross M., Skoczyła B., Filipowicz B., *V Intern. Congress Biochem. Abstr. Com.*, 1961, str. 108.
27. Hall J. B., Sinsheimer R. W., *J. Mol. Biol.* **6**, 115 (1963).
28. Healy J. W., Stollar D., Levine L., *Procedures in Nucleic Acid Research*, red. G. L. Cantoni, D. P. Davies, Harper and Row, New York, 1966, str. 188.
29. Healy J. W., Stollar D., Simon M. J., Levine L., *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 461 (1963).
30. Heppel L. A., Hilmoer R. J., *J. Biol. Chem.* **188**, 665 (1951).
31. Heppel L. A., Rabinowitz J. C., *Ann. Rev. Biochem.* **27**, 613 (1958).
32. Hilmoer R. J., *J. Biol. Chem.* **235**, 2117 (1960).
33. Holley R. W., *Sci. Am.* **214/2**, 34 (1966).
34. Holley R. W., Apgar J., Everett G. A., Madison J. T., Marquisse M., Merrill S. H., Penswick J. R., Zamir A., *Science* **147**, 1462 (1965).
35. Holley R. W., Madison J. T., Zamir A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 389 (1964).
36. Jorgensen S. E., Koerner I. F., *J. Biol. Chem.* **241**, 3090 (1967).
37. Kasai K., Grünberg-Manago M., *Eur. J. Biochem.* **1**, 152 (1967).
38. Kessler B., Engelberg N., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 70 (1962).
39. Klein W., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **307**, 254 (1957).
40. Kunitz M., *J. Gen. Physiol.* **24**, 15 (1940).
41. Laskowski M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **81**, 776 (1959).
42. Laskowski M., *Procedures in Nucleic Acid Research*, red. G. L. Cantoni, D. P. Davies, Harper i Row, New York, 1966, str. 85.

43. Laskowski M., w *Procedures in Nucleic Acid Research*, red. G. L. Cantoni, D. P. Davies, Harper i Row. New York 1966, str. 154.
44. Ledoux L., Galand P., Huart R., *Biochim. Biophys. Acta* 55, 97 (1962).
45. Lehman I. R., *Progr. Nucleic Acid Res.* 2, 83 (1963).
46. Lehman I. R., *Ann. Rev. Biochem.* 36, 645 (1967).
47. Madison J. T., Everett J. A., Kung H., *Science* 145, 531 (1966).
48. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.* 52, 552 (1952).
49. Meuron-Landolt M., Privat de Gerilhe M., *Biochim. Biophys. Acta* 91, 433 (1964).
50. Ostrowski W., Walczak W., *Acta Biochim. Polon.* 8, 345 (1961).
51. Petersen G. B., Burton K., *Biochem. J.* 92, 666 (1963)
52. Raj Bhandry U. L., Chang S. H., Stuart A., Faulkner R. D., Hoskinson R. A., Khorana H. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 57, 751 (1967).
53. Richardson C. C., Kornberg A., Lehman I. R., *Progr. Nucl. Acid Res.* 2, 103 (1963).
54. Rushizky G. W., Knight C. A., Sober H. A., *J. Biol. Chem.* 236, 2732 (1963).
55. Rushizky G. W., Sober H. A., *J. Biol. Chem.* 238, 371 (1963).
56. Sanger F., Brownlee G. G., Barrell B. G., *J. Mol. Biol.* 13, 373 (1965).
57. Sato K., Egami F., *J. Biochem.* 44, 753 (1957).
58. Sato K., Egami F., *Biochim. Biophys. Acta* 29, 655 (1958).
59. Shuster L., Khorana H. G., Heppel L. A., *Biochim. Biophys. Acta* 33, 452 (1959).
60. Siebert G., Hoppe-Seyler Thierfelder Analyse, wydanie 10 Springer Verlag, red. K. Lange, E. Lehnartz, Berlin 1966 tom 6B, str. 721.
61. Siebert G., Hoppe-Seyler Thierfelder Analyse, wydanie 10 Springer Verlag, red. K. Lange, E. Lehnartz, Berlin 1966 tom 6B, str. 1049.
62. Siebert G., Hoppe-Seyler Thierfelder Analyse, wydanie 10 Springer Verlag, red. K. Lange, E. Lehnartz, Berlin 1966 tom 6B, str. 1057.
63. Siebert G., Kesselring K., Hoppe-Seyler Thierfelder Analyse, wydanie 10 springer Verlag, red. K. Lange, E. Lehnartz, Berlin 1966, tom 6B str. 1011.
64. Sinsheimer R. L., Koerner J. F., *J. Biol. Chem.* 198, 293 (1952).
65. Smith J. D., Markham R., *Nature* 170, 120 (1952).
66. Stevens A., Hilmoie R. J., *J. Biol. Chem.* 235, 3016 (1960).
67. Stevens A., Hilmoie R. J., *J. Biol. Chem.* 235, 3023 (1960).
68. Sułkowski E., Björk W., Laskowski M., *J. Biol. Chem.* 238, 2477 (1963).
69. Tamm C., Chargaff E., *J. Biol. Chem.* 203, 689 (1953).
70. Tamm C., Hodes M. E., Chargaff E., *J. Biol. Chem.* 195, 49 (1952).
71. Tuve T. W., Anfinsen C. B., *J. Biol. Chem.* 235, 3437 (1960).
72. Uchida T., Egami F., w *Procedure in Nucleic Acid Research*. red. G. L. Cantoni, D. P. Davies. Harper and Row, New York 1966, str. 3 i 43.
73. Vanecke S., Laskowski M., *Biochim. Biophys. Acta* 61, 547 (1962).
74. Wheat R. W., *Proc. Soc. Exptl. Biol.* 105, 336 (1960).
75. Whitefeld P. R., Heppel L. A., Markham R., *Biochem. J.* 60, 15 (1955).
76. Wilson C. M., *Biochim. Biophys. Acta* 68, 177 (1963).
77. Yasminch W. G., Gray E. D., Wannamaker L. W., *Federation Proc.* 22, 348 (1963).
78. Zachau H. G., Dutting D., Feldman H., *Angew. Chem.* 78, 393 (1966).
79. Zachau H. D., Dutting D., Melchers F., Feldman H., Thiebe R., *Ribonucleic Acid Structure and Function*, red. H. Tuppy, Pergamon Press, 1966, str. 25.

HALINA SIERAKOWSKA *

Rozmieszczenie specyficznych nukleaz i ich rola w metabolizmie kwasów nukleinowych**

Localization of Specific Nucleases and Their Role in Nucleic Acid Metabolism

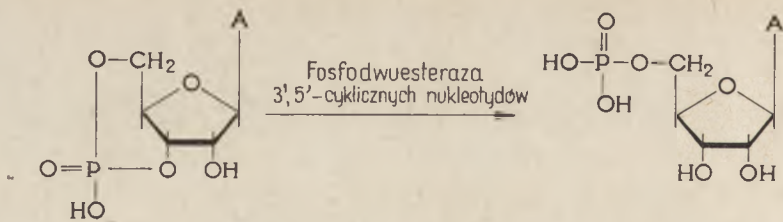
The specificity of nucleases is discussed in respect to their assay in biological material. Histochemical substrates specific for phosphodiesterase I and various ribonucleases are presented and the localization of these enzymes in the rat is given. The role of nucleolytic enzymes as well as future trends in nuclease cytochemistry are discussed.

Enzymy katalizujące depolimeryzację kwasów nukleinowych odznaczają się swoistością względem różnych elementów budowy cząsteczki substratu. Swoistość ta może dotyczyć rodzaju cukru, wielkości cząsteczki, jej struktury drugorzędowej, rodzaju zasady poprzedzającej hydrolizowane wiązanie między nukleotydami a także pozycji końcowych reszt fosforanowych. Zagadnienie to stanowi przedmiot licznych artykułów przeglądowych (26, 45, 47, 68, 84).

Liczba poznanych nukleaz zwiększa się z każdym rokiem. Największą różnorodnością odznaczają się one u mikroorganizmów, ale tkanki ssaków również zawierają liczne enzymy nukleolityczne (7, 68, 69, 84). Znaczna swoistość substratowa niektórych nukleaz nasuwa pytanie, czy dla każdego rodzaju nukleotydu istnieje, poza działającymi na niego enzymami mało swoistymi, nukleaza dla niego specyficzna. Na przykład znane są już fosfodwuesterazy 2':3'-cyklicznych fosforanów rybonukleozydów (19) oraz 3':5'-cyklicznych fosforanów nukleozydów (16) (schemat 1); te ostatnie charakteryzują się ponadto swoistością wobec zasady (32). W *Anacystis nidulans* znaleziono depolimerazę hydrolizującą międzynukleotydydowe wiązania rybonukleotydydów zawierających grupę 2'-O-metylową (schemat 2) (61). Ponieważ w wielu rodzajach RNA występują rybonukleotydy z grupą 2'-O-metylową swoistość tego enzymu czyni go obiecującym

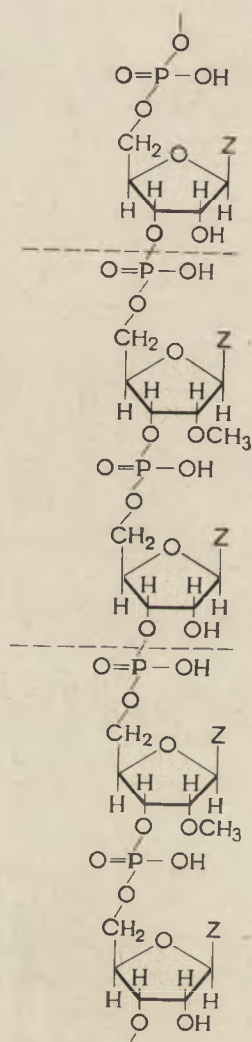
* Dr, Zakład Fizykochemii Biologicznej, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

** Treść tego artykułu była przedmiotem referatu na V Sympozjum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Krakowie, 1967 r.



Schemat 1. Działanie fosfodwuesterazy 3', 5'-cykliczných nukleotydw

A = adenina



Schemat 2. Hydroliza RNA pod wpływem fosfodwuesterazy specyficznej wobec wiązań międzynukleotydwých rybonukleotydw z grupą 2'-O-metylową

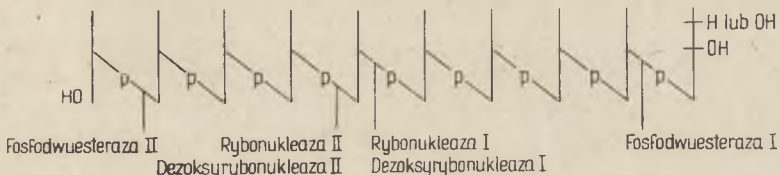
Z = zasada purynowa lub pirymidynowa

narzędziem w badaniach strukturalnych. Z *Aspergillus oryzae* wyodrębniono dezoksyrybonukleazę tworzącą fragmenty łańcucha zakończone 3'-fosforanem guanozyny (36), a zatem swoistą wobec zasady poprzedzającej hydrolizowane wiązanie międzynukleotydo-Enzym ten może być bardzo przydatny w badaniach struktury pierwszorzędowej DNA.

Swoistość substratowa nukleaz wykorzystywana jest od dawna do badania struktury kwasów nukleinowych. Już w roku 1953 użyto rybonukleazę trzustkową do ustalenia budowy wiązania międzynukleotydo-ego w RNA (15). Zastosowanie szeregu nukleaz o różnej swoistości pozwoliło ustalić pierwszorzędową strukturę kilku rozpuszczalnych RNA (5, 104).

Nasuwa się pytanie w jakiej mierze ta swoistość, tak przydatna w badaniach strukturalnych, jest uwzględniana w badaniach nad wewnątrzkomórkową lokalizacją i związaną z nią funkcją biologiczną enzymów nukleolitycznych. Rozmieszczenie nukleaz w tkankach bada się bądź frakcjonując komórki bądź też w preparatach mikroskopowych. W obu wypadkach oznaczenia aktywności enzymów przeważnie opierają się na stosowaniu RNA bądź DNA jako substratu, przy czym dobranie pH środowiska inkubacyjnego oraz aktywujących jonów umożliwi rozróżnienie poszczególnych enzymów.

W badaniach aktywności nukleaz w wyciągach tkankowych nie używa się metod spektrofotometrycznych, dylatometrycznych czy wiskozymetrycznych, ponieważ można je stosować jedynie w przypadku oczyszczonych preparatów enzymatycznych. Aktywność homogenatów bada się zazwyczaj oznaczając kwasorozpuszczalne produkty degradacji RNA lub DNA. Tego rodzaju oznaczenia dają sumaryczny wynik działania endo- i egzonukleaz: rybonukleaz bądź dezoksyrybonukleaz oraz fosfodwuesteraz (schemat 3). R a z e l l (67) twierdzi, że wykrycie niemal we wszystkich tkankach zwierzęcych fosfodwuesteraz I i II, odszczepiających mononukleotydy od końców łańcucha o wolnej grupie 3'- lub 5'-wodorotlenowej, rzuca cień wątpliwości na większość dotychczasowych ilościowych oznaczeń endonukleaz tkankowych. Obecnie próbuje się wprowadzać substraty bardziej swoiste, co może ułatwić interpretację oznaczeń nukleaz tkankowych (41, 43, 58).



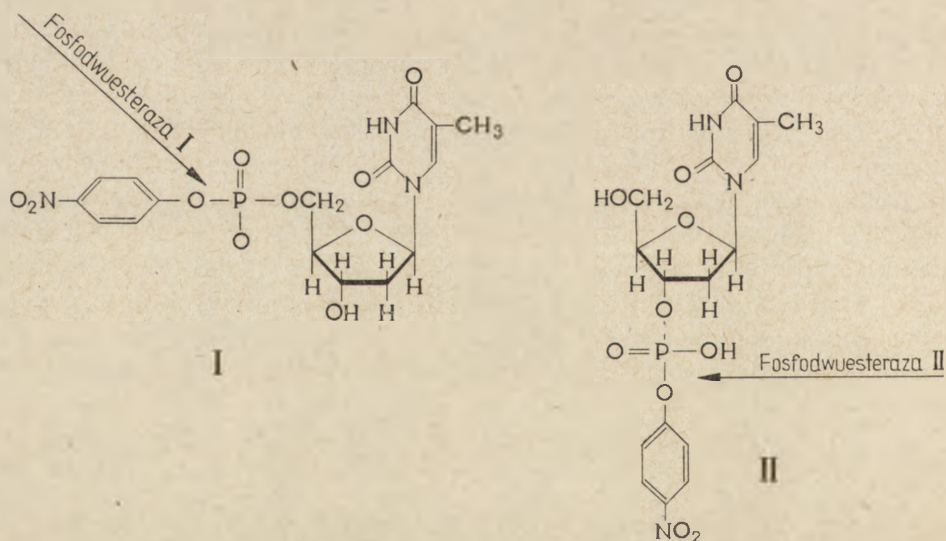
Schemat 3. Hydroliza polinukleotydu pod wpływem endo- i egzonukleaz występujących w tkankach ssaków

I — enzymy tworzące elementy zakończone 5'-fosforanem, II — enzymy tworzące elementy zakończone 3'-fosforanem (69)

Znaczenie doboru odpowiedniego substratu w badaniach enzymów nukleolitycznych ilustruje następujący przykład. Fosfodwuesterazy I i II oznaczano dawniej, a często i dziś, za pomocą bis-*p*-nitrofenylofosforanu, z którego enzym uwalnia *p*-nitrofenol. Substrat ten hydrolyzowany jest z szybkością około stukrotnie mniejszą niż naturalne oligonukleotydy (70), a ponadto hamuje on karboksyoesterazę fosforylując jej cząsteczki z jednoczesnym uwolnieniem dwu reszt *p*-nitrofenolu (34). Pojawienie się zatem *p*-nitrofenolu w czasie inkubacji tego substratu z wyciągiem tkankowym może w pewnych przypadkach być wynikiem obecności karboksyoesterazy, a nie działania fosfodwuesteraz.

I. Nienaturalne, specyficzne substraty nukleaz

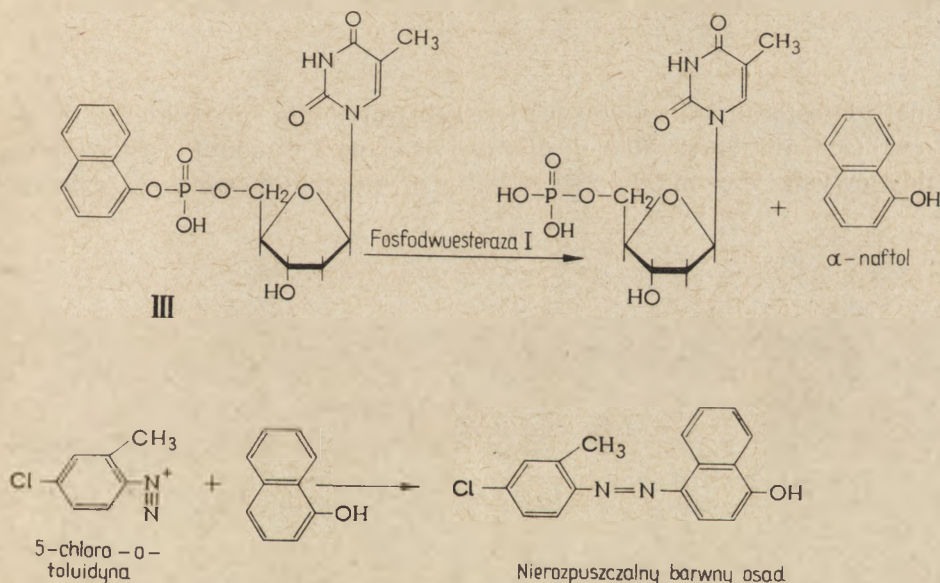
Poszukiwanie nienaturalnych substratów nadających się do specyficznych oznaczeń nukleaz w wyciągach tkankowych i w preparatach histologicznych rozpoczęliśmy w oparciu o prace zespołu K h o r a n y (55, 96). Zsyntetyzowali oni estry *p*-nitrofenylowe: 5'-fosforanu tymidyny (I) — nienaturalny substrat fosfodwuesterazy I i 3'-fosforanu tymidyny (II) — substrat fosfodwuesterazy II. Aby tego typu związki były



przydatne w badaniach cytochemicznych, powinny one zamiast reszty *p*-nitrofenylowej zawierać rodnik, który natychmiast po odszczepieniu przez enzym wytrącałby się w formie nierozpuszczalnego w wodzie barwnego produktu. Wymogi te spełnia rodnik naftyłowy, gdyż po odszczepieniu można go sprzęgać z solami dwuazoniowymi na nierozpuszczalne

w wodzie barwne związki. Tej właściwości naftolu jego pochodne zawdzięczają swoje zastosowanie w histochemii, na przykład naftylofosforan służy do lokalizacji fosfataz, a naftylooctan — esteraz (64). Pochodne naftyłowe nadają się również do ilościowych oznaczeń aktywności enzymów w wyciągach tkankowych, gdyż produkty sprzężenia naftolu z solami dwuazoniowymi rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych i mogą być oznaczane kolorymetrycznie. Ze względu na te właściwości naftolu zajęliśmy się wprowadzeniem go do rybo- i dezoksyrybonukleotydów, uzyskując szereg substratów o różnych właściwościach.

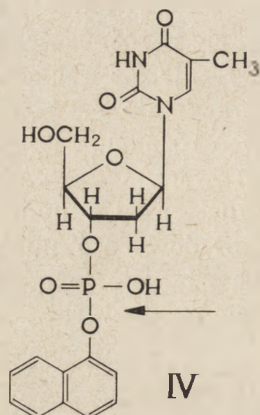
Okazało się, że zsyntetyzowany α -naftylofosforan 5'-tymidyny (III) jest substratem dla fosfodwuesterazy I i hydrolizującej oligonukleotydy i nienaturalne estry 5'-nukleotydów do 5'-nukleotydów (86, 87) (schemat 4). Związek ten jest odporny na działanie fosfodwuesterazy II, dezoksyrybonukleazy I oraz II i oczywiście rybonukleaz.



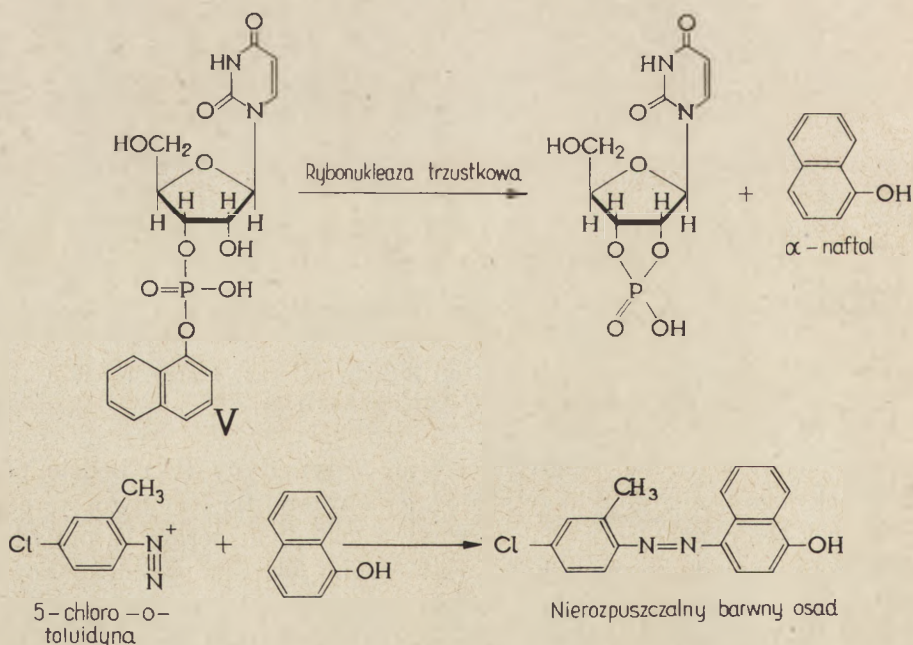
Schemat 4. Cytochemiczna metoda lokalizacji fosfodwuesterazy I przy użyciu α -naftylofosforanu 5'-tymidyny (87)

Przewidywaliśmy, że α -naftylofosforan 3'-tymidyny (IV) będzie podobnie jak jego *p*-nitrofenylowy analog, substratem dla fosfodwuesterazy II. Związek ten okazał się jednak odporny na fosfodwuesterazę II, prawdopodobnie ze względu na przeszkodę przestrzenną jaką stanowi stosunkowo duża reszta naftyłowa (87). Wprowadziło to uniemożliwiło to zbadanie rozmieszczenia tego enzymu, ale i nasunęło przypuszczenie, że estry naftyłowe 3'-rybonukleotydów, potencjalne substraty rybonukleaz, również okazały się odporne na działanie fosfodwuesterazy II. Właściwość taka była-

by cenna, ponieważ używane dotychczas estry 3'-rybonukleotydów jak ester metylowy czy benzylowy są hydrolizowane zarówno przez rybonukleazy jak i fosfodwuesterazę II (14, 15, 97, 98). Istotnie okazało się, że



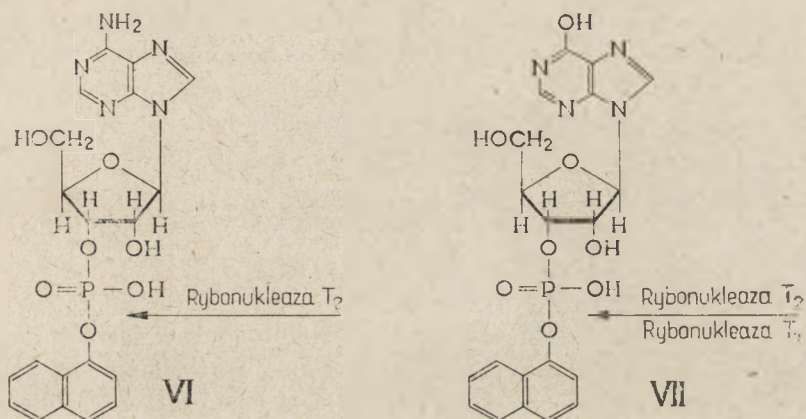
α -naftylofosforan 3'-urydyny (V) jest substratem dla rybonukleazy trzuskowej (schemat 5) (88, 105), działającej na estry 3'-rybonukleotydów pirymidynowych i enzymu T₂ z *Aspergillus oryzae* mniej swoistego, działają-



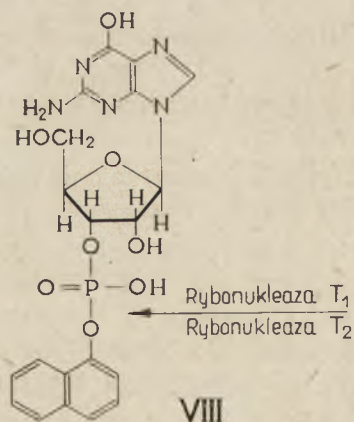
Schemat 5. Cytochemiczna metoda lokalizacji rybonukleazy trzuskowej przy użyciu α -naftylofosforanu 3'-urydyny (105)

cego na estry 3'-rybonukleotydów pirymidynowych i purynowych (98). Jednocześnie jest on odporny na działanie fosfodwuesterazy I i II oraz rybonukleazy T_1 , specyficznej wobec estrów 3'-fosforanów guanozyny (97).

Skoro jednak α -naftylofosforan 3'-urydyny jest substratem dla obu rybonukleaz trzustkowej i T_2 , to jego hydroliza pod wpływem danego preparatu tkankowego może być wynikiem działania dwóch enzymów. Zsyntetyzowany przez nas α -naftylofosforan 3'-adenozyny (VI), stanowiący substrat dla rybonukleazy T_2 , a nie ulegający hydrolizie pod wpływem rybonukleaz trzustkowej i T_1 (106), pozwala na zlokalizowanie enzymów o specyficzności rybonukleazy T_2 i oznaczenie ich aktywności. Porównanie wyników uzyskanych za pomocą estrów naftyłowych fosforanów 3'-urydyny i 3'-adenozyny pozwala zaś na swoiste oznaczenie aktywności rybonukleazy trzustkowej.



Synteza α -naftylofosforanu 3'-adenozyny jest dość kłopotliwa, ale w rutynowych oznaczeniach można go zastąpić prostszym w przygoto-



waniu α -naftylofosforanem 3'-inozyny (VII) hydrolizowanym przez rybonukleazę T_2 a opornym na działanie enzymu trzustkowego. Związek ten w przeciwieństwie do pochodnej adenozyzny, z niewielką szybkością ulega także hydrolizie pod wpływem rybonukleazy T_1 , wobec czego może służyć do oznaczania aktywności zarówno rybonukleazy T_2 jak i T_1 .

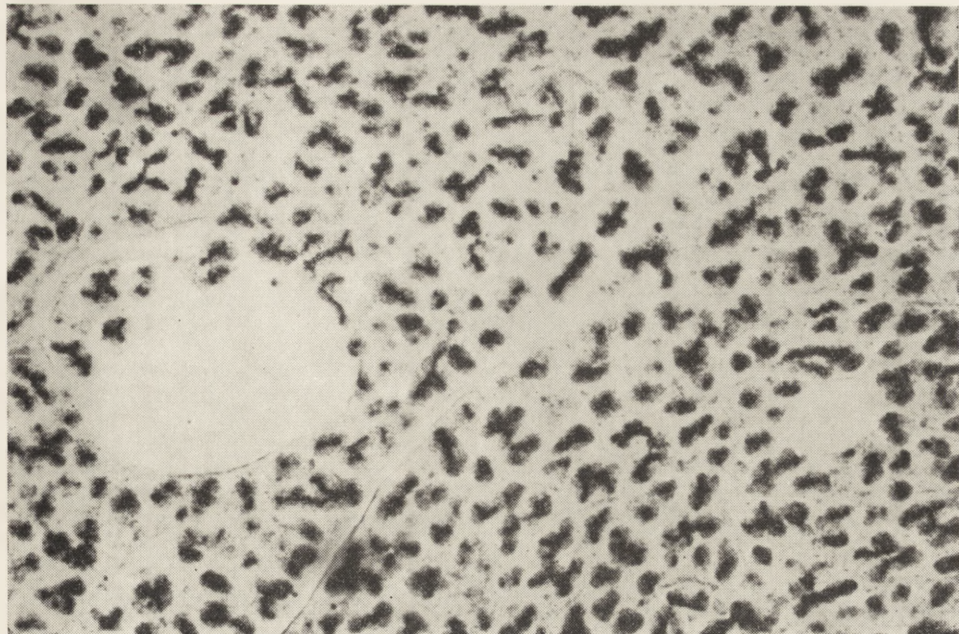
Swoiste oznaczenie aktywności rybonukleazy T_1 można byłoby przeprowadzić stosując α -naftylofosforan 3'-guanozyny (VIII) i odejmując od wyniku uzyskanego z tym substratem wynik z α -naftylofosforanem 3'-adenozyzny.

II. Rozmieszczenie fosfodwuesterazy I

Fosfodwuesteraza I hydrolizuje α -naftylofosforan 5'-tymidyny z szybkością pięciokrotnie przekraczającą szybkość hydrolizy najdogodniejszych substratów naturalnych (87). Umożliwia to dobrą lokalizację enzymu, gdyż krótka inkubacja preparatu histologicznego nie powoduje inaktywacji enzymu, spontanicznego rozkładu soli dwuazoniowej i innych ujemnych zjawisk. Fosfodwuesteraza I nie wykazuje tendencji do dyfuzji do środowiska inkubacyjnego z tkanki nieutrwalonej. Rozmieszczenie enzymu w tkance nieutrwalonej jest identyczne jak w utrwalonej formaliną lub alkoholem. Utrwalenie w formalinie powoduje jednak zniszczenie 80 procent aktywności enzymu.

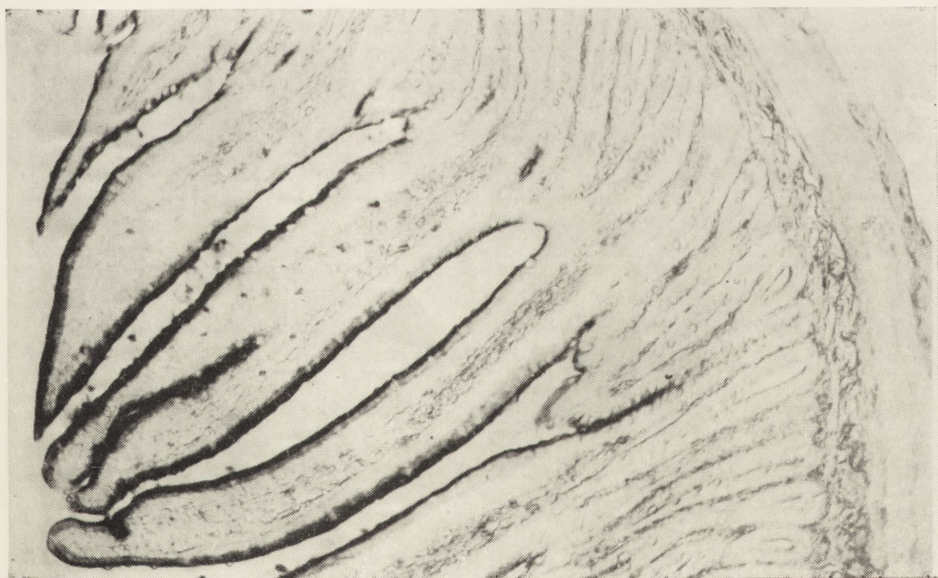
Rozmieszczenie fosfodwuesterazy I w utrwalonych w formalinie tkankach szczura przedstawiają rysunki 1, 2, 3 (87). Duże ilości enzymu występują w cytoplazmie surowiczych komórek gruczołów trawiennych: w trzustce (rysunek 1) i w śliniankach. W równie dużych ilościach gromadzi on się na granicy błon o rozwiniętej powierzchni, uczestniczących w procesach absorpcji, jak na przykład rąbek prążkowany nabłonka dwunastnicy czy kanalików krętych nerki (rysunek 2). Fosfodwuesteraza I występuje również powszechnie w śródłonku naczyń krwionośnych. W komórkach mięszzowych wątroby enzym gromadzi się w cytoplazmie, głównie na krawędzi kanalików żółciowych (rysunek 3). Godny uwagi jest fakt, że we wszystkich tych tkankach enzym nie występuje w jądrach komórkowych.

Ogólne rozmieszczenie fosfodwuesterazy wskazuje na jej wyspecjalizowaną funkcję. Enzym jest czynny w komórkach gruczołów trawiennych. Ponadto bierze zapewne udział w procesach wchłaniania zachodzących w komórkach o rozwiniętych powierzchniach absorpcyjnych. Jego rozmieszczenie jest odmienne od tego, jakiego można byłoby się spodziewać na podstawie badania poszczególnych frakcji komórkowych. R a z z e l l (67) stwierdził bowiem występowanie tego enzymu głównie w mikrosomach wątroby i nerki a de L a m i r a n d e (43) — w błonach mikroso-



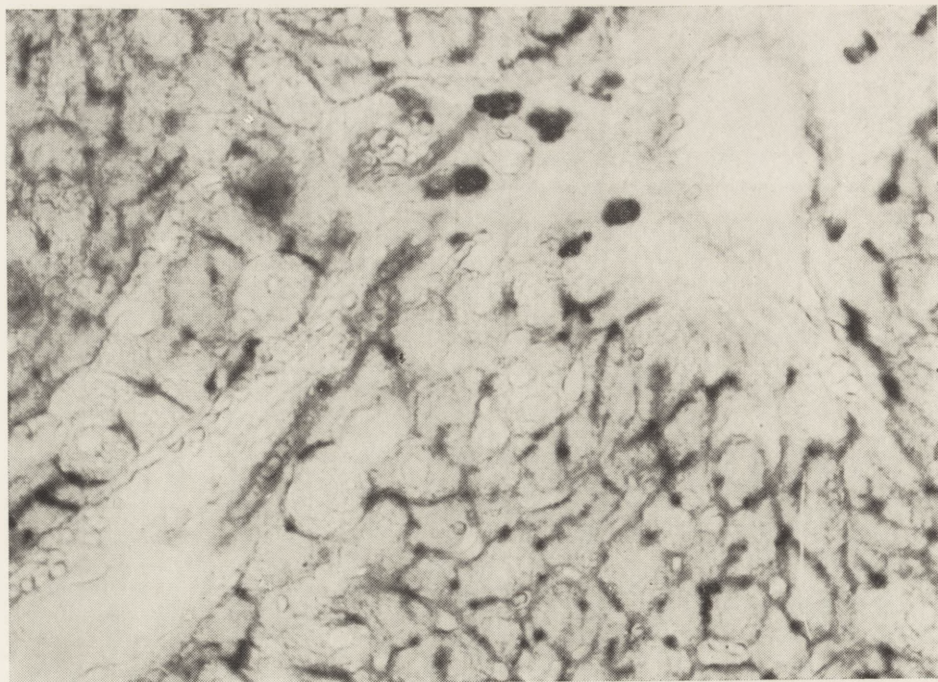
Rys. 1. Fosfodwuesteraza I w trzustce szczura

Dodatni odczyn w wierzchołkowej części komórek surowiczych. Brak zabarwienia jąder oraz komórek wysepek Landgerhansa; 3 min. inkubacji ($\times 150$) (87)



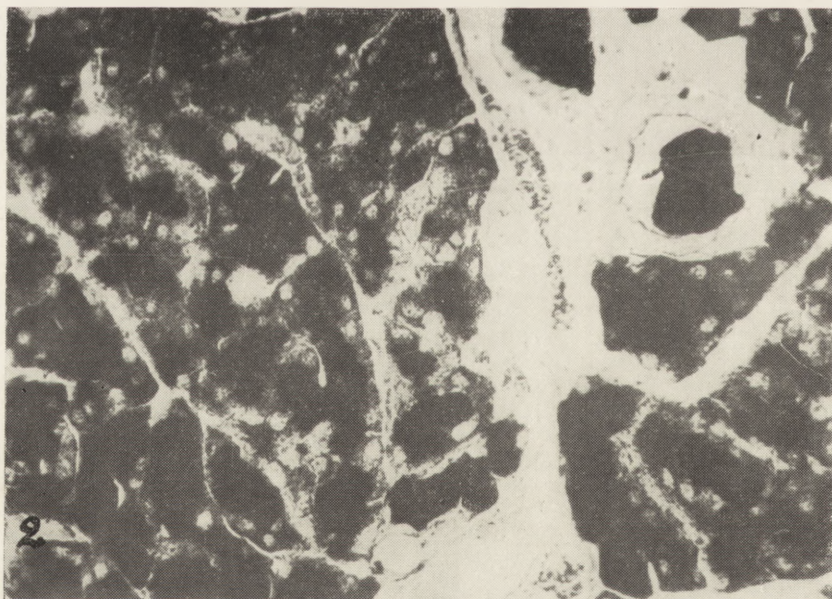
Rys. 2. Fosfodwuesteraza I w dwunastnicy szczura

Dodatni odczyn w rąbku prążkowanym komórek nabłonka oraz w naczyniach krwionośnych; 5 min. inkubacji ($\times 150$) (87)



Rys. 3. Fosfodwuesteraza I w wątrobie szczura

Dodatni odczyn w ścianie kanalików żółciowych oraz w błonie komórkowej, na granicy sąsiadujących ze sobą komórek i na powierzchni zatokowej. Słabszy odczyn w cytoplazmie komórek mięsżsowych; brak zabarwienia jąder; 30 min. inkubacji ($\times 150$) (87)



Rys. 4. Rybonukleaza alkaliczna w trzustce szczura

Dodatni odczyn w cytoplazmie komórek surowicznych oraz w świetle przewodów wyprowadzających. Brak odczynu w jądrach; 5 min. inkubacji ($\times 400$) (105)

malnych oraz w jądrach komórek wątroby. Występowanie enzymu w mikrosomach sugeruje według de Lamirande udział tego enzymu w wewnątrzkomórkowym metabolizmie kwasów nukleinowych. Zaobserwowane przez nas rozmieszczenie nie wyklucza takiej funkcji fosfodwuesterazy w wątrobie, ale nie jest ona chyba podstawowa we wszystkich tkankach.

III. Rozmieszczenie rybonukleazy trzustkowej

α -Naftylofosforan 3'-urydyny jest hydrolizowany przez rybonukleazę trzustkową 80-krotnie szybciej niż inne estry nukleotydów pirymidynowych (103). W tkankach bogatych w rybonukleazę umożliwia to lokalizację enzymu już po kilkunastu sekundach inkubacji. Ponieważ substrat ten może ulegać hydrolizie również pod wpływem enzymu nie specyficznego względem zasady, na przykład rybonukleazy T₂, preparaty kontrolne inkubowano z α -naftylofosforanem 3'-inozyny, substratem niespecyficznej rybonukleazy, nie ulegającym działaniu enzymu z trzustki. Okazało się, że α -naftylofosforan 3'-inozyny nie ulega hydrolizie pod wpływem tkanek szczura, a zatem uzyskana lokalizacja odpowiada rybonukleazie specyficznej wobec estrów nukleotydów pirymidynowych.

Rybonukleaza trzustkowa jest słabo związana ze strukturą tkanki (39, 88, 105). Enzym ten dyfunduje do środowiska zarówno z tkanki nieutrwalonej jak i z tkanki traktowanej acetonem bądź utrwalaczami zawierającymi alkohol. Utrwalenie trzustki w formalinie z dodatkiem chlorku wapnia zapobiega jednak dyfuzji rybonukleazy, nie powodując strat jej aktywności.

Rozmieszczenie rybonukleazy alkalicznej w utrwalonej formaliną trzustce szczura ilustruje rysunek 4 (105). Enzym występuje głównie w wierzchołkowej części cytoplazmy komórek surowiczych trzustki oraz w świetle przewodów wyprowadzających. W mniejszych ilościach znajduje się w pozostałej części cytoplazmy komórek surowiczych, natomiast nie występuje w jądrze komórkowym.

W porównaniu z trzustką inne tkanki szczura wykazują bardzo ograniczoną zdolność do hydrolizy α -naftylofosforanu 3'-urydyny. Wiadomo jednak, że wiele z nich zawiera rybonukleazy kwaśne i alkaliczne (40, 71, 77). Násuwa się więc wniosek, że te enzymy różnią się swoistością substratową od enzymu z trzustki. Ta różna swoistość znajduje potwierdzenie w różnicach immunologicznych między rybonukleazami z trzustki i z innych tkanek (28, 76). Mało prawdopodobne wydaje się, by brak hydrolizy α -naftylofosforanu 3'-urydyny pod wpływem licznych tkanek mógł być wynikiem zahamowania aktywności ich rybonukleaz naturalnymi inhibitorami (75, 76, 85). Białkowy inhibitor rybonukleazy występuje wprawdzie w większości tkanek ssaków (75), ale zwykle w ilościach

zbyt małych aby mógł zahamować w pełni enzym. Inhibitor ten występuje zresztą głównie w supernatancie komórkowym, a wyodrębnione mitochondria i lizosomy komórek wątroby również prawie nie hydrolizują α -naftylofosforanu urydyny. Wreszcie mimo, że inhibitor białkowy rybonukleaz alkalicznych nie hamuje rybonukleaz kwaśnych z wątroby, α -naftylofosforan urydyny nie jest hydrolizowany przez preparaty wątroby również i w środowisku o odczynie kwaśnym.

Wydaje się przeto, że rybonukleaza trzustkowa ma odmienną swoistość substratową od pozostałych rybonukleaz występujących w tkankach zwierzęcych. Swoistość ta, podobnie jak występowanie enzymu wyłącznie w surowiczych komórkach pęcherzyków wydzielniczych trzustki, wiąże się prawdopodobnie z jego funkcją w trawieniu pozakomórkowym.

Interesujące jest również, że tkanki szczura nie hydrolizują z dostrzegalną szybkością α -naftylofosforanu 3'-inozyny, a zatem nie wykazują aktywności rybonukleaz T_2 i T_1 . Dotychczas uzyskane dane nie dają jasnego obrazu występowania tego typu enzymów w tkankach ssaków. Donoszono (40, 53, 71, 76) o istnieniu w wątrobie i śledzionie rybonukleaz kwaśnych powodujących w odróżnieniu od alkalicznych całkowity rozkład RNA na mononukleotydy. Wśród produktów hydrolizy RNA wykryto ślady cyklicznych fosforanów nukleozydów purynowych, które mogły powstawać tylko w wyniku działania tego typu enzymów (52). Zdaniem Bernardi i Bernardi (10) oczyszczona rybonukleaza kwaśna śledziony wołu działa na rdzeń RNA pozostający po działaniu rybonukleazy trzustkowej na RNA, ale tylko w minimalnej mierze hydrolizuje poliA. Razzell (69) przypisuje działanie rybonukleaz kwaśnych na wiązania między nukleotydami purynowymi zanieczyszczeniu preparatów fosfodwuesterazą II. Jego zdaniem rybonukleazy kwaśne hydrolizują jedynie wiązania łączące 3'-fosforan rybonukleozydu pirymidynowego z następnym nukleotydem.

IV. Tkankowe inhibitory nukleaz

Hamowanie rybonukleaz alkalicznych inhibitorami tkankowymi nie jest zjawiskiem odosobnionym wśród enzymów nukleolitycznych. Znałe są również naturalne inhibitory dezoksyrybonukleaz oraz fosfodwuesterazy 2': 3'-cyklicznych nukleotydydów (9, 44, 50). Badania nad inhibitorem rybonukleazy, najobficiej występującym w supernatancie mózgu i wątroby szczura (75), ale obecnym w większości tkanek ssaków, dostarczyły licznych danych o jego swoistości i budowie (22, 78, 83). Inhibitor ten hamuje rybonukleazy ssaków o optimum działania w zakresie pH 7—8,5. Nie działa natomiast na rybonukleazy kwaśne ssaków, rybonukleazy roślinne i T_1 (76, 83). Jest on ciepłochwiejnym białkiem, inaktywowanym słabymi kwasami. Jego aktywność związana jest z obecnością

grup -SH, dlatego też zanika pod wpływem jonów metali ciężkich i kwasu p-chlorortęciobenzoowego. Ta wrażliwość inhibitora na jony metali ciężkich, którymi często zanieczyszczone są handlowe preparaty RNA stosowane jako substraty powoduje duże rozbieżności przy oznaczaniu aktywności rybonukleaz alkalicznych w wyciągach tkankowych (22).

Inhibitory dezoksyrybonukleaz alkalicznych wyodrębniono już w postaci krystalicznej ze śledziona cielejącej (48, 49). Jeden z nich, tzw. inhibitor II, jest labilnym białkiem o ciężarze cząsteczkowym rzędu 60 000. Hamuje on swoicie enzym trzustkowy, nie wykazując aktywności wobec dezoksyrybonukleazy kwaśnej, fosfodwuesterazy, rybonukleazy trzustkowej i endonukleazy z *E.coli* (50). Znacznie słabiej poznane są naturalne inhibitory dezoksyrybonukleaz kwaśnych (38, 44).

Wydaje się, że naturalne inhibitory mogą znaleźć zastosowanie przy oznaczaniu enzymów, przyczyniając się wespół z odpowiednimi substratami, do dalszego zwiększenia swoistości oznaczeń. W związku z uzyskiwaniem wysoko oczyszczonych preparatów inhibitorów i doskonaleniem techniki immunofluorescencji wydaje się to już kwestią najbliższej przyszłości. Badanie rozmieszczenia inhibitorów jest poza tym interesujące zarówno z punktu widzenia ich funkcji fizjologicznej, jak też funkcji enzymów przez nie hamowanych.

V. Rola enzymów nukleolitycznych

W związku z omówionymi próbami ustalenia zależności między rozmieszczeniem rybonukleazy i fosfodwuesterazy I a ich ewentualnym udziałem w wewnątrzkomórkowym metabolizmie kwasów nukleinowych, warto może przedstawić pokrótce rozwój poglądów o wewnątrzkomórkowej funkcji enzymów nukleolitycznych.

Fakt występowania rybonukleazy głównie w rybosomach komórek *E.coli* był podstawą poglądu o jej udziale w metabolizmie informacyjnego RNA (23, 24). Enzym w rybosomach jest nieaktywny, ulega on aktywacji dopiero po dysocjacji rybosomów na podjednostki. Wydawało się, że tego rodzaju mechanizm kontrolowanej aktywacji rybonukleazy może współuczestniczyć w usuwaniu mRNA z powierzchni rybosomu.

Wkrótce jednak Neu i Heppel (58, 59) stwierdzili, że ze sferoplastów komórek *E.coli* w określonych warunkach niemal cała rybonukleaza może przechodzić do środowiska bez naruszenia żywotności i struktury rybosomów. Uwolnieniu jej z komórki towarzyszy zniknięcie odpowiedniej ilości enzymu z rybosomów. Rybonukleaza wydalana z komórki ma prawie identyczne właściwości z enzymem utajonym, występującym w rybosomach. Jest to endorybonukleaza tworząca 3'-fosforany oligo- i mononukleotydów. Neu i Heppel wykazali ponadto, że rybosomy *E.coli* adsorbują i inaktywują rybonukleazę wyodrębnioną z *E.coli*, a także krystaliczny enzym trzustkowy. Po rozbiciu rybosomów następuje uwolnienie

nie enzymów i ich reaktywacja. Okazało się, że rybosomy *E.coli* mogą wiązać 26-krotnie większą ilość rybonukleazy od ilości normalnie w nich występującej (27).

Tworzeniu sferoplastów *E.coli* towarzyszy uwalnianie z komórek także innych enzymów degradujących jak fosfatazy lub fosfodwuesterazy 2' : 3'-cyklicznych nukleotydów (33). Badanie w mikroskopie elektronowym ich rozmieszczenia wykazało, że występują one w sąsiedztwie błony komórkowej (92). Zupełnie niezależnie stwierdzono, że enzym podobny do rybonukleazy rybosomów występuje w błonie komórkowej *E.coli* (4).

Obserwacje te nasunęły wątpliwości czy rzeczywiście utajona rybonukleaza *in vivo* występuje w rybosomach czy też, podobnie jak inne enzymy hydrolityczne, w pobliżu błony komórkowej, a dopiero po rozbiciu komórki jest adsorbowana przez rybosomy. Mechanizm wiązania i hamowania rybonukleaz przez rybosomy charakteryzuje się pewną specyficznością gatunkową (24a). W obecności soli w dużych stężeniach rybosomy adsorbują silnie tylko rybonukleazę homologiczną, a adsorpcja enzymów heterologicznych jest tym słabsza im dalsze jest pokrewieństwo taksonomiczne między gatunkami dawcy rybosomów i dawcy rybonukleazy. Nasuwa to przypuszczenie o pewnej biologicznej przydatności mechanizmu hamowania rybonukleaz przez rybosomy — wspólnie z naturalnymi inhibitorami rybonukleaz przyczynia się on, być może, do zachowania struktur polisomalnych w komórce (11, 46).

Równolegle prowadzone badania nad mechanizmem inaktywacji i degradacji mRNA wykazały, że hydrolizie mRNA przez enzymy związane z rybosomami towarzyszy uwalnianie 5'-mono i -pyrofosforanów nukleotydów, a nie 3'-fosforanów nukleotydów, jak należałoby się spodziewać w przypadku działania rybonukleazy (79, 91). Produkty te powstają w wyniku hydrolizy mRNA przez fosforylaze polinukleotydową i rybonukleazę aktywowaną jonami K^+ (79, 90, 100). Ten enzym aktywowany przez K^+ jest specyficzny dla polirybonukleotydów o nieuporządkowanej strukturze drugorzędowej, czyli polinukleotydów typu mRNA (89).

Dodatkowych argumentów przeciw udziałowi w degradacji mRNA rybonukleazy tworzącej 3'-fosforany oligonukleotydów dostarczyły organizmy pozbawione tego enzymu. Sferoplasty *E.coli* po niemal całkowitym wydaleniu utajonej rybonukleazy bez trudu degradują szybko znakowany RNA (6). U mutantów *E.coli* zawierających zaledwie 1% rybonukleazy szczepu dzikiego, szybko znakowany RNA ma ten sam okres półtrwania jak u szczepu dzikiego (27). Przypuszczano, że rybonukleaza jedynie wstępnie inaktywuje mRNA, a całkowitą degradację polimeru przeprowadzają inne enzymy. Dla ustalenia tego, mierzono biologiczną inaktywację mRNA objawiającą się zanikiem powstawania indukowanego enzymu (37). Okazało się, że mutanty *E.coli* nie zawierające rybonukleazy inaktywują mRNA dla indukowanej β -galaktozydy identycznie jak komórki szczepu dzikiego.

Przytoczone fakty przemawiają za tym, że *in vivo* inaktywacja i degradacja mRNA mikroorganizmów zachodzi raczej pod wpływem rybonukleazy tworzącej 5'-fosforany mononukleozydów i być może, fosforylasy polinukleotydowej, a nie rybonukleazy utajonej. Pewne wątpliwości o udziale fosforylasy polinukleotydowej nasuwa istnienie mutantów pozbawionych tego enzymu, a inaktywujących mRNA bez żadnych zakłóceń (27).

Badania rybonukleazy związanej z rybosomami prowadzono również na tkankach organizmów wyższych. *Utsunomiya* i *Roth* (99) stwierdzili, że alkaliczna rybonukleaza polisomów wątroby szczura związana jest z produktami degradacji rybosomów, a nie z nieuszkodzonymi rybosomami. *De Lamirande* i wsp. badali rozmieszczenie enzymów rybonukleolitycznych w mikrosomach komórek wątroby szczura (41) oraz komórek nowotworu Ehrlicha (42). Stwierdzili oni występowanie endorybonukleazy tworzącej 5'-fosforany oligonukleotydów oraz fosfodwuesterazy I w błonach siateczki endoplazmatycznej. Rybonukleaza tworząca 3'-fosforany oligonukleotydów związana była z rybosomami. Autorzy ci sugerują, że funkcją tego enzymu jest degradacja cząsteczek rybonukleoproteidów.

Wewnątrzkomórkowa funkcja rybonukleaz alkalicznych, tworzących elementy zakończone grupą 3'-fosforanową pozostaje nadal niewyjaśniona. Skoro enzym ten nie jest niezbędny dla życia komórki, można przypuszczać, że jego funkcja nie jest związana z wewnątrzkomórkowym metabolizmem RNA. Wiadomo, że uczestniczy on na przykład w procesach trawienia pozakomórkowego. Godne uwagi jest, że komórki nowotworu wąsiekowego myszy i chomika (8) oraz komórki nowotworowe szczepu HeLa (60) zawierają powierzchniowo czynną rybonukleazę inaktywującą i degradującą zakaźny RNA wirusów.

Rybonukleazom kwaśnym występującym wraz z kwaśną dezoksyrybonukleazą i innymi hydrolazami w lizosomach przypisuje się funkcję trawienia wewnątrzkomórkowego substancji zbędnych dla komórki. Wydaje się, że błona lizosomalna stanowi czynnik regulujący aktywność tych enzymów, czyniąc je nieszkodliwymi dla kwasów nukleinowych komórki. Stąd też może brak specyficznych inhibitorów kwaśnych rybonukleaz oraz niewrażliwość kwaśnych nukleaz na inhibitory rybo- i dezoksyrybonukleaz alkalicznych (50, 76, 83).

Istnieją pewne dane wskazujące na rolę dezoksyrybonukleaz w regulacji syntezy DNA. Endonukleazy tworzące fragmenty zakończone grupą 3'-wodorotlenową jak dezoksyrybonukleaza I (12) oraz endonukleaza I z *E.coli* (74) powodują zwiększenie wykorzystania DNA jako primera. Endonukleazy tworzące produkty zakończone grupą 3'-fosforanową zmniejszają wykorzystywanie DNA jako primera (73). *Buttin* i *Kornberg* (17) wykazali ostatnio, że endonukleaza z *E.coli* jest niezbędna dla przebiegającej w specjalnych warunkach *in vivo* syntezy

DNA. W mutantach *E.coli* nie zawierających endonukleazy w analogicznych warunkach synteza DNA nie zachodzi.

Dodatkowe źródło danych o regulacyjnej roli nukleaz stanowić będą prawdopodobnie badania nad specyficznością i mechanizmem działania nukleaz indukowanych zakażeniem wirusowym. Zakażeniu wirusami komórek HeLa (25, 54) oraz hodowli komórek nerki chomika (56) towarzyszy wzrost aktywności dezoksyrybonukleaz, spowodowany indukcją nowych enzymów. O indukowanym charakterze tych enzymów świadczy niezmienny ich poziom po dodaniu puromycyny czy fluorodezoksyurydyny lub po zakażeniu wirusem napromienionym ultrafioletem. Poza tym różnią się one od dezoksyrybonukleaz komórek niezakażonych swoistością substratową, mechanizmem działania, termostabilnością i wrażliwością na aktywujące działanie jonów (25, 54). Dokładne poznanie specyficzności i mechanizmu działania tych enzymów może wyjaśnić ich rolę w procesie zakażenia wirusowego.

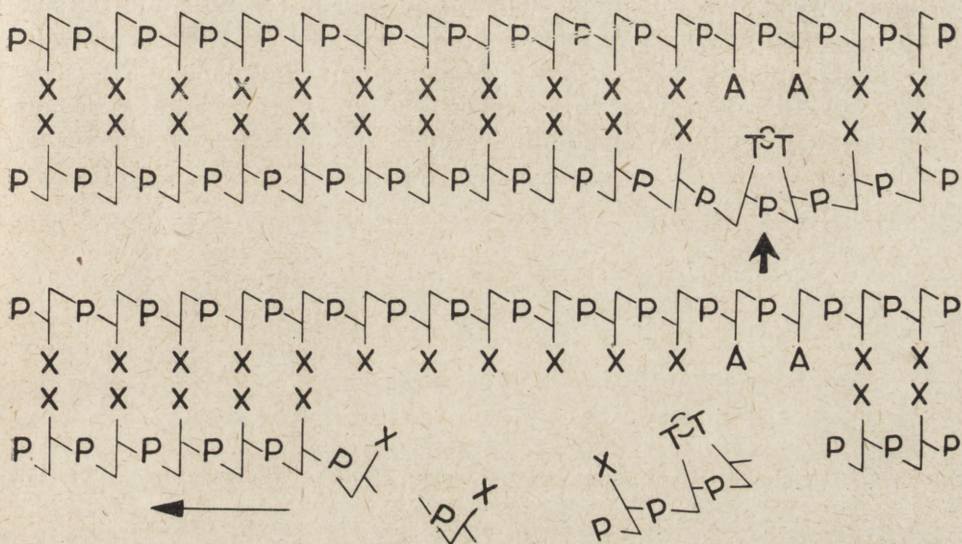
VI. Nukleazy w naprawie uszkodzeń

Badanie mechanizmu procesu naprawy uszkodzeń DNA powstałych w organizmach żywych wskutek napromieniania ultrafioletem lub działania czynników mutagennych jest dlatego istotne, że układy enzymatyczne uczestniczące w nim są prawdopodobnie zbliżone bądź identyczne z układami uczestniczącymi w procesach rekombinacji bakteryjnej. Proces naprawy składa się prawdopodobnie z szeregu etapów. Jednym z początkowych jest wycinanie uszkodzonych fragmentów łańcucha. Enzymy uczestniczące w tym etapie są interesującym przykładem specyficzności nukleaz w oczywisty sposób związanej z funkcją biologiczną.

Na enzymatyczny charakter wycinania uszkodzeń w DNA wskazały obserwacje, że po napromienieniu ultrafioletem hodowli szczepu *E.coli* odpornego na to promieniowanie w środowisku pojawiają się dimery tyminy. Zjawisko to nie występuje w szczepach wrażliwych, nie ulegających reaktywacji (13, 81). Wkrótce okazało się, że wyciąg z *M.lysodeikticus* powoduje *in vitro* endonukleolityczną degradację napromienionego DNA, a nie działa na normalne DNA i na DNA wyodrębnione po okresie reaktywacji z bakterii napromienionych (57, 93). Wycina on fragmenty zawierające dimery TT i CT (18). Wyciąg ten wykazuje również aktywność endonukleolityczną wobec DNA, na który działano mutagennym związkami — metylosulfonianem metylu (93). Ostatnio z wyciągu tego wyodrębniono endodezoksyrybonukleazę, która działa na napromienione natywne DNA powodując pęknięcia fosfodwuestrowych wiązań jednego łańcucha i tworząc fragmenty zakończone 5'-fosforanami (30) (schemat 6). Uwalnianie dimerów pirymidyn z napromienionego DNA następuje praw-

dopodobnie przy współdziałaniu towarzyszącej temu enzymowi egzonukleazy (82).

Przykład wycinającego uszkodzenia enzymu o jeszcze węższej specyficzności stanowi nukleaza z *B.subtilis* działająca na DNA uszkodzone mutagenym metylosulfonianem metylu, a nie działająca na DNA napromienione ultrafioletem (93). Enzym ten nie wykazuje aktywności wobec DNA wyodrębnionego z komórek, które usunęły już skutki działania czynnika mutagennego (72).



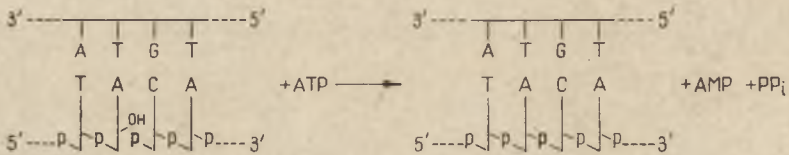
Schemat 6. Działanie enzymu wycinającego uszkodzenia w DNA wywołane napromienieniem ultrafioletem (35)

Powstające w wyniku działania wycinających enzymów luki w dwuniciowej strukturze uszkodzonego DNA prawdopodobnie ulegają uzupełnieniu pod wpływem polimeraz.

Końcowy etap procesu naprawy — łączenie za pomocą kowalencyjnych wiązań pęknięć w pierwszorzędowej strukturze jednego z łańcuchów dwupasmowego DNA — może być dziełem enzymów o zbliżonym mechanizmie działania do enzymu występującego w komórkach *E.coli* (62) bądź indukowanego w nich fagiem T-parzystym (102). Są to pierwsze poznane enzymy, które mogą łączyć kowalencyjnymi wiązaniami 3',5'-fosfodwuestowymi odcinki łańcucha polinukleotydu, wielokrotnie zwiększając jego długość. Te ligazy polinukleotydowe różnią się więc zasadniczo od polimeraz przedłużających łańcuch przez przyłączanie pojedynczych nukleotydów. Uważa się, że uczestniczą one nie tylko w usuwaniu uszkodzeń wywołanych napromienianiem, ale także w rekombinacjach genetycznych i przekształcaniu liniowych form DNA fagowego w formy koliste (102).

Ligaza z *E.coli* łączy ze sobą krótkie odcinki 5'-fosforanów polinukleotydów, o ile związane są one wiązaniami wodorowymi z komplementarnym łańcuchem wysokocząsteczkowego polinukleotydu. Katalizuje ona również powstawanie kowalencyjnie związanych kolistych postaci DNA faga z kolistej formy DNA utworzonej za pomocą wiązań wodorowych, w obecności jonów Mg^{2+} i NAD. Podczas reakcji NAD ulega hydrolizie do AMP i NMN, przy czym tworzy się kompleks enzym-AMP (63, 101).

Podobny enzym z komórek *E.coli* zakażonych fagiem T4 katalizuje powstanie wiązania dwuścrowego w miejscach pęknięć jednego łańcucha dwupasmowego DNA. Jednołańcuchowe odcinki DNA nie stanowią substratu dla tego enzymu. W reakcji bierze udział ATP tworząc prawdopodobnie kompleksy enzym-AMP z jednoczesnym uwolnieniem PP_i (schemat 7) (101, 102). Powstawanie kompleksu enzym-AMP również w reakcji katalizowanej przez ligazę polinukleotydową z niezakażonych komórek *E.coli* sugeruje, że jest to ogólny mechanizm działania tego typu enzymu (101).



Schemat 7. Działanie ligazy polinukleotydowej z *E.coli* zakażonych fagiem T4 (101)

VII. Kierunki rozwojowe cytochemii nukleaz

Wyjaśnienie wewnątrzkomórkowej funkcji nukleaz uzależnione jest od dalszego rozwoju metod umożliwiających badanie rozmieszczenia nukleaz na przykład za pomocą specyficznych substratów oraz immunofluorescencji, a także od doskonalenia techniki frakcjonowania komórek oraz opracowania cytochemicznych metod oznaczania nukleaz w mikroskopie elektronowym.

Rozdział komórek na frakcje znacznie polepszyła metoda wirowania w gradiencie gęstości, która przyczyniła się, między innymi, do stwierdzenia odrębności lizosomów jako organelli komórkowych (20). Nowy etap rozwoju w ostatnich latach jest wynikiem poszukiwania metod, które umożliwiłyby frakcjonowanie dużych ilości materiału ze zdolnością rozdzielczą właściwą ultrawirówkom analitycznym. Poszukiwania te doprowadziły do powstania udoskonalonej techniki wirowania strefowego (ang. *zonal centrifugation*) (1, 2). Głowice umożliwiające rozdział warstwowy mają pojemność ponad 1 litr i mogą osiągać szybkość przekraczającą 40 000 obrotów na minutę. Zasadniczą ich cechą jest możliwość kolejnego

nawarstwiania gradientu, wprowadzania próbki i wreszcie wyodrębniania poszczególnych warstw rozfrakcjonowanego materiału w trakcie wirowania. Dzięki ciągłemu działaniu siły odśrodkowej warstwy rozfrakcjonowanego materiału wyodrębnia się wtedy, gdy znajdują się one w pozycji pionowej. Ogranicza to do minimum zaburzenia, które powstawałyby wskutek zmiany położenia warstw podczas wyodrębniania ich po zakończeniu wirowania, a tym samym zapewnia ostrość rozdziału.

Wirowanie strefowe może być dwojakiego rodzaju. Jeden z nich tj. rozdział uwarunkowany różną szybkością sedymentacji cząsteczek polega na nawarstwianiu cząsteczek na uprzednio sporządzonym gradiencie gęstości i poddaniu ich stosunkowo krótkotrwałemu wirowaniu przy odpowiednio dużej szybkości obrotów. Gradient gęstości zapobiega tu jedynie zaburzeniom wynikającym z ruchów konwekcyjnych i umożliwia uzyskanie wyraźnych warstw zawierających cząsteczki o jednakowej szybkości sedymentacji. Drugi rodzaj rozdziału oparty jest na różnej gęstości flotacyjnej cząsteczek w danym środowisku, zależnej od stopnia ich solwatacji przez cząsteczki składników środowiska. Cząsteczki zawieszają się w roztworze tworząc gradient gęstości, względnie nawarstwiają się na gradient uprzednio uformowany, a następnie wiruje tak długo, aż cząsteczki przesuną się do tej warstwy roztworu, której gęstość jest równa ich gęstości flotacyjnej. Dalsze wirowanie nie zmienia już położenia cząsteczek, gdyż ustala się stan równowagi między procesem ich sedymentacji a dyfuzji.

Ponieważ szybkość sedymentacji uzależniona jest zarówno od wymiarów jak i od gęstości cząsteczek, najlepszy rozdział uzyskuje się przez wstępne frakcjonowanie materiału oparte na różnej szybkości sedymentacji, a następnie dalsze frakcjonowanie każdego pasma na warstwy o różnej gęstości flotacyjnej.

Wirowanie strefowe umożliwia preparatywny rozdział elementów podkomórkowych dotychczas rozróżnianych tylko za pomocą mikroskopu elektronowego. Za pomocą wirowania strefowego można wyodrębniać cząsteczki wirusów z homogenatów zakażonych tkanek czy rozdzielać wirusy T2 i T3. Wirowanie strefowe jest już stosowane do rozdziału komórek na poszczególne elementy podkomórkowe (3). Połączenie wirowania z testem enzymologicznym umożliwiło stwierdzenie heterogenności mitochondriów (94) i lizosomów wątroby szczura (66). Wirowanie strefowe zastosowano także do badań rozmieszczenia rybonukleaz alkalicznych w komórkach wątroby szczura (65).

Innym kierunkiem rozwojowym cytochemii nukleaz jest badanie ich rozmieszczenia za pomocą mikroskopu elektronowego. Już od lat czynione są próby wprowadzenia do soli dwuazonowych metali ciężkich, aby produkty ich sprzęgania stały się dostrzegalne w mikroskopie elektronowym (95). Wprowadza się też do substratów i do czynników sprzęgających rodniki osmofilne, które po potraktowaniu osmem dają elektronowo gęste

osady (31, 80). Istnieją też możliwości wprowadzenia elektronowo gęstych reszt do wytrącającego się komponentu substratu. Komponent ten może również stanowić związek znakowany, którego rozmieszczenie można badać na preparatach elektronomikroskopowych jakościowo i ilościowo metodami autoradiografii. Część tych technik powinna okazać się przydatna w odniesieniu do lokalizacji za pomocą naftylowych pochodnych nukleotydów.

Obiecująca na przyszłość, nie z powodu zdolności rozdzielczej, ale daleko posuniętej swoistości, wydaje się również immunofluorescencyjna metoda lokalizacji nukleaz. Metoda ta polega na wykorzystaniu antygenowych właściwości enzymów. Sprzężenie swoistych dla enzymu przeciwciał z fluoresceiną, umożliwia po przeprowadzeniu reakcji immunochemicznej lokalizację enzymu na preparacie histologicznym za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Enzymy z różnych narządów jednego gatunku oraz enzymy z analogicznych narządów różnych gatunków mają odrębne właściwości antygenowe. Gordon (26) stwierdził, że przeciwciała rybonukleazy trzustki szczura całkowicie hamują enzym z trzustki i śledziony szczura, tylko częściowo enzym nerki i surowicy, a nie działają zupełnie na enzym z wątroby. Odwrotnie, surowica zawierająca przeciwciała rybonukleazy z wątroby szczura nie działa na enzym trzustki szczura natomiast hamuje enzym z nerek i wątroby. Żadna z tych surowic nie hamuje rybonukleaz kwaśnych. Ta daleko posunięta swoistość antygenowa nukleaz stanowi gwarancję wysokiej swoistości oznaczania lokalizacji. Metoda ta wymaga jednak bardzo czystych enzymów-antygenów, co narazie stanowi poważne ograniczenie i wyjaśnia jej niewielkie dotychczas zastosowanie (21, 29, 51). Ciągły postęp w dziedzinie oczyszczania enzymów nukleolitycznych pozwala przypuszczać, że dzięki swej swoistości metoda immunofluorescencyjna będzie w przyszłości stanowić precyzyjne i szeroko stosowane narzędzie badawcze.

Praca niniejsza została wykonana przy częściowym poparciu *Wellcome Trust*, Światowej Organizacji Zdrowia oraz *Agricultural Research Service (US Dept. of Agriculture, Project UR-E21-/30/-32)*.

LITERATURA

1. Anderson N. G. w *The Development of Zonal Centrifuges and Ancillary Systems for Tissue Fractionation and Analysis*, red. N. G. Anderson, National Cancer Institute, Monograph 21, U.S. Government Printing Office, Washington, 1966, str. 9.
2. Anderson N. G., *Science* 154, 103 (1966).
3. Anderson N. G., Harris W. W., Barber A. A., Rankin C. T. Jr., Candler E. L., w *The Development of Zonal Centrifuges and Ancillary Systems for Tissue Fractionation and Analysis*, red. N. G. Anderson, National Cancer Institute, Monograph 21, U.S. Government Printing Office, Washington, 1966, str. 253.

4. Anraku Y., Mizuno D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 462 (1965).
5. Apgar J., Everett G. A., Holley R. W., *J. Biol. Chem.* **241**, 1206 (1966).
6. Artman M., Engelberg H., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 687 (1965).
7. Bardoń A., *Post. Biochem.* **13**, 389 (1967).
8. Bases R. E., Huppert J., *Virology* **29**, 596 (1966).
9. Beard J. R., Razzell W. E., *J. Biol. Chem.* **239**, 4186 (1964).
10. Bernardi A., Bernardi G., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 23 (1966).
11. Blobel G., Potter V. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1283 (1966).
12. Bollum F. J., w *Progress in Nucleic Acid Research*, red. J. N. Davidson i W. E. Cohn, Academic Press, New York, 1963, tom 1, str. 1.
13. Boyce R. P., Hoard-Flanders P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 293 (1964).
14. Brown D. M., Heppel L. A., Hilmoe R. J., *J. Chem. Soc. str.* 40 (1954).
15. Brown D. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc. str.* 2040 (1953).
16. Butcher R. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **237**, 1244 (1962).
17. Buttin G., Kornberg A., *J. Biol. Chem.* **241**, 5419 (1966).
18. Carrier W. L., Setlow R. B., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 318 (1966).
19. Drummond G. I. Iyer N. T., Keith J., *J. Biol. Chem.* **237**, 3535 (1962).
20. de Duve C., w *The Lysosomes, Ciba Foundation Symposium* red. A. V. S. de Reuck, M. P. Cameron, Churchill, Londyn, 1963, str. 1.
21. Ehlinger B., *Histochemia* **5**, 145 (1965).
22. Eichel H. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **109**, 804 (1962).
23. Elson D., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 216 (1958).
24. Elson D., *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 372 (1959).
- 24a. Elson D., Kivity-Vogel T., w *Regulation Nucleic Acid Protein Biosn.*, red. V. V. Koningsberger L., Bosch, Elsevier, Amsterdam, 1967, str. 196.
25. Eron L. J., Mc Auslan B. R., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 633 (1966).
26. de Gariilhe M. P., *Les Nucleases*, Hermann, Paris, 1964.
27. Gesteland R. F., *J. Mol. Biol.* **16**, 67 (1966).
28. Gordon J., *Arch. Biochem. Biophys.* **112**, 421, 429 (1965).
29. Gordon J., Myers J., *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 187 (1966).
30. Grossman L., Miller D. S., Dolbeare F. A. 'VII Internatl. Congress of Biochem. Abstracts IV, B-102, Tokyo, 1967 str. 642.
31. Hanker J. S., Seaman A. R., Weiss L. P., Ueno H., Bergman R. A., Seligman A. M., *Science* **146**, 1039 (1964).
32. Hardman J. G., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.* **240**, PC 3704 (1965).
33. Heppel L. A., *Science* **156**, 1451 (1967).
34. Heymann E., Krisch K., *Z. Physiol. Chem.* **348**, 609 (1967).
35. Howard-Flanders P., Boyce R. P., *Radiation Res. (Supplement)* **6**, 156 (1966).
36. Kato M., Ando T., Ikeda Y., VIIth Internatl. Congr. Biochem., Abstracts IV, B-18, Tokyo, 1967 str. 621.
37. Kivity-Vogel T., Elson D., *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 66 (1967).
38. Kowlessar O. D., Okada S., Potter J. L., Altman K. I., *Arch. Biochem. Biophys.* **68**, 231 (1957).
39. Lagerstedt S., *Experientia* **12**, 425 (1956).
40. de Lamirande G., Allard C., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **81**, 570 (1959).
41. de Lamirande G., Boileau S., Morais R., *Can. J. Biochem.* **44**, 273 (1966).
42. de Lamirande G., Morais R., *Union Med. Canada* **94**, 86 (1965).
43. de Lamirande G., Morais R., Blackstein M., *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 347 (1967).

44. Laskowski M., Sr., w *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, wyd. II, Academic Press, New York, 1961, tom V, str. 123.
45. Laskowski M., Sr., *Advan. Enzymol.* **29**, 165 (1967).
46. Lawford G. R., Langford P., Schachter H., *J. Biol. Chem.* **241**, 1835 (1966).
47. Lehman I. R., Linn S., Richardson Ch. C., *Federation Proc.* **24**, 1466 (1965).
48. Lindberg M. U., *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 237 (1964).
49. Lindberg M. U., *J. Biol. Chem.* **241**, 1246 (1966).
50. Lindberg M. U., *Biochemistry* **6**, 323 (1967).
51. Marshall J. M., *Exptl. Cell. Res.* **6**, 240 (1954).
52. Maver M. E., Greco A. E., *J. Biol. Chem.* **237**, 736 (1962).
53. Maver M. E., Peterson E. A., Sober H. A., Greco A. E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **81**, 599 (1959).
54. McAuslan B. R., Kates J. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1581 (1966).
55. Moffat J. G., *Biochem. Prepn.* **8**, 100 (1961).
56. Morrison J. M., Keir H. M., *Biochem. J.* **98**, 37C (1966).
57. Nakayama H., Okubo S., Sekiguchi M., Takagi Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **27**, 217 (1967).
58. Neu H. C., Heppel L. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 1267 (1964).
59. Neu H. C., Heppel L. A., *J. Biol. Chem.* **239**, 3893 (1964).
60. Norman A., Veomett R. C., *Virology* **14**, 497 (1961).
61. Norton J., Roth J. S., *J. Biol. Chem.* **242**, 2099 (1967).
62. Olivera B. M., Lehman I. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1426 (1967).
63. Olivera B. M., Lehman I. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1700 (1967).
64. Pearse A. G. E., *Histochemistry, Theoretical and Applied*, Churchill, London, 1960.
65. Rahman Y. E., *Biochim. Biophys. Acta* **146**, 477 (1967).
66. Rahman Y. E., Howe J. F., Nance S. L., Thomson J. F., *Biochim. Biophys. Acta* **146**, 484 (1967).
67. Razzell W. E., *J. Biol. Chem.* **236**, 3028 (1961).
68. Razzell W. E., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1963, tom VI, str. 236.
69. Razzell W. E., *Experientia* **23**, 321 (1967).
70. Razzell W. E., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.* **234**, 2105 (1959).
71. Reid E., Nodes J. T., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **81**, 618 (1959).
72. Reiter H., Strauss B., Robbins M., Marone R., *J. Bacteriol.* **93**, 1056 (1967).
73. Richardson C. C., Schildkraut C. L., Aposhian H. V., Kornberg A., Bodmer W., Lederberg J., w *Informational Macromolecules*, red. H. J. Vogel, V. Bryson, J. O. Lampen, Academic Press, New York, 1963 str. 13.
74. Richardson C. C., Schildkraut C. L., Kornberg A., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 9 (1963).
75. Roth J. S., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 34 (1956).
76. Roth J. S., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **81**, 611 (1959).
77. Roth J. S., *J. Biol. Chem.* **227**, 591 (1967).
78. Roth J. S., w *Methods in Cancer Research*, red. H. Busch, tom III, Academic Press, New York 1967.
79. Sekiguchi M., Cohen S. S., *J. Biol. Chem.* **238**, 349 (1963).
80. Seligman A. M., Hanker J. S., Katzoff L., Deb C., Wasserkrug H., *J. Histochem. Cytochem.* **13**, 705 (1965).

81. Setlow R. B., Carrier W. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 226 (1964).
82. Shimada K., Nakayama H., Okubo S., Sekiguchi M., Takagi Y., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **27**, 539 (1967).
83. Shortman K., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 88 (1962).
84. Shugar D., Sierakowska H., w *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, red. Davidson J. N., Cohn W. E., Academic Press, New York, 1967, tom 7, str. 369.
85. Siebert G., Villalobos J., Ro T. S., Steele W. J., Lindenmayer G., Adams H., Busch H., *J. Biol. Chem.* **241**, 71 (1966).
86. Sierakowska H., Shugar D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **11**, 70 (1963).
87. Sierakowska H., Szemplińska H., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **10**, 399 (1963).
88. Sierakowska H., Zan-Kowalczevska M., Shugar D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 138 (1965).
89. Singer M. F., Tolbert G., *Biochemistry* **4**, 1319 (1965).
90. Spahr P. F., *J. Biol. Chem.* **239**, 3716 (1964).
91. Spahr P. F., Schlessinger D., *J. Biol. Chem.* **328**, PC 2251 (1963).
92. Spicer S. S., Wetzel B. K., Heppel L. A., *Federation Proc.* **25**, 539 (1966).
93. Strauss B., Searashi T., Robbins M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 932 (1966).
94. Swick R. W., Stange J. L., Nance S. L., Thomson J. F., *Biochemistry* **6**, 737 (1967).
95. Tice L. W., Barnett R. J., *J. Cell. Biol.* **25**, 23 (1965).
96. Turner A. F., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 4651 (1959).
97. Uchida T., Egami F., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1967, tom XII, str. 228.
98. Uchida T., Egami F., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1967, tom XII, str. 239.
99. Utsonomiya T., Roth J. S., *J. Cell. Biol.* **29**, 395 (1966).
100. Wade H. E., Lowett S., *Biochem. J.* **81**, 319 (1961).
101. Weiss B., Richardson Ch. C., *J. Biol. Chem.* **242**, 4270 (1967).
102. Weiss B., Richardson Ch. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1021 (1967).
103. Witzel H. — dane nieopublikowane.
104. Zachau H. G., Dutting D., Feldman H., *Angew. Chem.* **78**, 392 (1966).
105. Zan-Kowalczevska M., Sierakowska H., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **13**, 237 (1966).
106. Zan-Kowalczevska M., Sierakowska H., Shugar D., w przygotowaniu.
107. Zimmerman S. B., Little J. W., Oshinsky C. K., Gellert M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 1841 (1967).

Komunikat

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zawiadamia, że nagrody za najlepsze prace referowane na krajowych i zagranicznych zjazdach biochemicznych przyznano:

- I nagroda — L. Kornackiej i J. Malec za pracę pt. „*Metabolic activities of nuclear proteins of normal and leukaemic human white cells*”.
- II nagroda — Annie Wojtczak za pracę pt. „*Control of acetoacetate and beta-hydroxybutyrate production in rat liver mitochondria*”.
- III nagroda — A. Budzyńskiemu i M. Stahl za pracę pt. „*Partial reduction of bovine fibrynogen by some sulphhydryl compounds*”.

JANINA MALEC *

Rola jąderka komórkowego w metabolizmie kwasów nukleinowych i białka

The Role of Cell Nucleolus in Nucleic Acids and Protein Metabolism

Actual views on the role of nucleolus in nucleic acids and protein metabolism are presented.

Hipotezy o roli jąderka jako struktury pośredniczącej między zmagazynowaną w jądrze substancją genetyczną a cytoplazmą sięgają końca XIX wieku (40, 77). Odkrycie w 1939 roku przez Bracheta a także przez Casperssona kwasu rybonukleinowego w jąderku wzbudziło nowe zainteresowanie tymi hipotezami. W 1940 roku Caspersson i Schultz (14) sformułowali teorię o istnieniu zależności funkcjonalnej między genami, RNA jąderkowym i syntezą białka w cytoplazmie. Wraz z rozwojem metod cytologicznych i histochemicznych nagromadzano coraz więcej informacji zarówno o strukturze jak i o funkcji jąderka. Wśród nich uwagę zwracają głównie te, które świadczą o związku jąderka z komórkową biosyntezą białka. W komórkach aktywnie syntetyzujących białko, na przykład intensywnie wzrastających, lub wydzielających białko, jąderka są wyraźniej zaznaczone niż w komórkach, w których synteza białka jest stosunkowo powolna, na przykład w komórkach mięśni lub leukocytach, gdzie jąderka są nawet niewidoczne (69). Różnorodne bodźce zwiększające syntezę białka w komórce powodują zazwyczaj szybko powiększenie jąderka. Zjawisko to zaobserwowano na przykład w czasie pobudzenia produkcji enzymów lub hormonów, a także w następstwie nieswoistego pobudzenia produkcji białek komórkowych. Komórki znajdujące się w stadium podziału i spermatozoa, w których nie ma syntezy białka lub zachodzi ona tylko w nieznacznym stopniu, nie mają jąderka. Jąderka nie ma również w komórkach embrjonalnych do czasu rozpoczęcia syntezy swoistych białek w stadium gastrulacji (69). Równie interesujące obserwacje, które zwróciły na jąderko uwagę szczególnie onkologów, dotyczyły zmienności

* Dr med., Zakład Biochemii, Instytut Hematologii, Warszawa

zarówno ilości jak kształtu i wielkości jąderek w komórkach nowotworowych w porównaniu z komórkami o wzroście prawidłowym (10, 31).

Dzięki rozwojowi metod wyodrębniania poszczególnych struktur subjądrowych w tym również i jąderek, oraz zastosowaniu nowoczesnych metod ich badania uzyskano znacznie dokładniejsze wiadomości, niż te, które uzyskano stosując metody cyto- i histochemiczne. Do wyodrębniania jąderek z jąder *Monty* i wsp. (41) zastosowali ultradźwięki, a *Maggio* i wsp. (36, 37) homogenizację wyjściowej tkanki w roztworach sacharozy z dodatkiem jonów Ca^{2+} . Za pomocą różnicowego wirowania homogenatów otrzymanych jąder w roztworach sacharozy o różnej gęstości otrzymuje się preparaty jąderek o zadowalającej czystości morfologicznej, w stanie zachowanej integralności strukturalnej i zdolne do utrzymywania wielu procesów metabolicznych w układach bezkomórkowych. Dalszym postępowaniem było wyodrębnienie jąderek z guza nowotworowego (*Carcinoma Walkera*) przez *Muramatsu* i wsp. (48) oraz opracowanie przez *Desjardina* i wsp. metody utrzymywania jąderek na dużą skalę zarówno z tkanek prawidłowych (17) jak i z guzów nowotworowych (18).

Liczba jąderek w komórce waha się w różnych rodzajach komórek od 1 do tysięcy jak na przykład w oocytach (69) i jest zależna od ilości tak zwanych obszarów jąderkotwórczych na specjalnych chromosomach. Liczba takich obszarów jąderkotwórczych jest stała i charakterystyczna dla każdego rodzaju komórek. Jąderka uważa się ogólnie za część większej komórkowej struktury opisywanej jako siateczka rybonukleoproteinowa (13), składającej się z licznych kanałków zawierających zarówno włóknienka jak i ziarnistości, które pełnią rolę w procesach syntezy w jądrze i w przenoszeniu powstających produktów do cytoplazmy. Nie opracowano dotychczas metody wyodrębniania rybonukleoproteidowej siateczki jądrowej jako całości morfologicznej. Wydaje się, że poszczególne jej składniki wyodrębnia się zależnie od ich wielkości, bądź jako frakcję jąderkową bądź jako frakcję rybosomów jądrowych.

Od przeszło 30 lat wiadomo na podstawie badań histochemicznych, że jąderko stanowi największe pojedyncze skupienia RNA zarówno w jądrze jak i w całej komórce. Wyodrębnienie jąderek umożliwiło dokładniejsze określenie ilości zawartych w nim niektórych składników, między innymi kwasów nukleinowych i białek. Okazało się, że w zależności od rodzaju komórek w jądrku skupione jest od około 1/5 do prawie całkowitej ilości RNA jądra (69). Stężenie RNA w jądrku jest 1—3 razy wyższe od stężenia RNA w całej komórce, a 2—8 razy od stężenia RNA w całym jądrze. Około 5—14% suchej masy jąderka stanowi RNA (11), zaś około 80% — białko, przy czym wiadomo, że wiele enzymów jądrowych mieści się w jądrku (66).

Badania histochemiczne wykazały, że białka jąderek są znacznie bogatsze w grupy -SH od pozostałych białek jądra i że grupy te są skupione

na powierzchni jąderek (11, 69). Uzyskane metodami histochemicznymi dane o obecności histonów w jąderku są sprzeczne (11, 69). Frakcjonowanie białek jąderkowych, otrzymanych zarówno z komórek pochodzenia roślinnego (2) jak zwierzęcego (26, 27) wykazało, że są one bardzo niejednorodne i podobnie jak białka całych jąder składają się z frakcji kwasorozpuszczalnych białek zasadowych i frakcji białek kwaśnych, nierozpuszczalnych w kwasie. Charakterystyczne jest jednak, że stosunkowo bardzo duża w porównaniu z białkami całego jądra część białek jąderka ulega rozpuszczeniu w kwasie. Tylko część z nich została zidentyfikowana jako histony, część zaś — jako białka zasadowe odmiennego typu. Wydaje się, że histony z jąderek nie różnią się od histonów z pozostałych, pozająderkowych części jądra (11). Duża część białek jąderka ma skład aminokwasowy bardzo podobny do białka rybosomów (3, 6).

Najtrudniej jest oznaczyć w jąderkach trzeci podstawowy składnik jądra komórkowego i jego aparatu genetycznego a mianowicie DNA. Wprawdzie za kryterium czystości preparatów jąderek niektórzy autorzy uważają wysoki stosunek RNA/DNA (48), jednak rzeczywista zawartość DNA w jąderkach nie została jeszcze z pewnością ustalona. Na podstawie badań histochemicznych przypuszczano początkowo, że jąderka w ogóle nie zawierają DNA (69). Jednakże we wszystkich preparatach jąderek wyodrębnionych zarówno z komórek zwierzęcych jak roślinnych znajdowano stosunkowo duże ilości DNA (7, 11, 16, 27, 32, 35): od kilku do kilkunastu procent całkowitej ilości DNA jądrowego. Obecność tego składnika mogła być oczywiście wynikiem niedoskonałości stosowanych metod otrzymywania jąderek, a co za tym idzie — niedostatecznego usuwania zanieczyszczającej preparat chromatyny pochodzenia pozająderkowego. Z drugiej strony jednak wydaje się już obecnie nie ulegać wątpliwości, że DNA jest integralną częścią struktury jąderka i pochodzi z mas chromatynowych określanых jako związana z jąderkiem chromatyna, tworząca wraz z właściwym jąderkiem tak zwany „aparat jąderkowy” (11, 69). Działanie na jąderka roztworem 2M NaCl, który ekstrahuje chromatynę, powoduje wyraźne zmiany ich struktury (48), co pozwala przypuszczać, że przynajmniej część dezoksyrybonukleoproteidu tworzy rodzaj warstewki wokół jąderka utrzymując jego kształt i morfologiczną integralność. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o słabym co prawda, ale niewątpliwym barwieniu się wnętrza jąderka metodą Feulgena (11, 69). Stwierdzono również, że po trawieniu jąderek rybonukleazą (11) można w nich wyróżnić barwiące się metodą Feulgena włókna. Wydaje się więc bardzo prawdopodobne, że opisywane dawniej, negatywne wyniki barwienia jąderek metodą Feulgena były spowodowane dużym rozcieńczeniem DNA przez inne składniki jąderka (RNA i białko) lub też tym, że DNA w jąderku jest związany w strukturach zbyt drobnych dla odróżnienia ich w zwykłym mikroskopie świetlnym. Na podstawie wyników badań zarówno cytologicznych jak i chemicznych przyjmuje się obecnie,

że związana z jądrem chromatyna składa się z dwójakiego rodzaju struktur (12): z masy chromatynowej, która otacza jąderko (zwanej przez niektórych autorów chromatyną perijądrową) oraz z wewnątrzjądrowych włókien chromatynowych. Te ostatnie mają prawdopodobnie mniejszą średnicę niż włókna otaczające jąderko i nie zawierają histonów i innych białek, na co wskazują wyniki badań w mikroskopie elektronowym (73). Chromatyna otaczająca jąderko jest natomiast poprzecinana przez przenikające ją struktury jądrowej siateczki rybonukleoproteidowej (74). Nasuwa się wobec tego pytanie czy DNA związany strukturalnie z aparatem jądrowym nie stanowi jakiegoś wysoce swoistego fragmentu DNA jądrowego. Dotychczasowe doniesienia na ten temat nie są jednoznaczne. Stosując metodę hybrydyzacji pomiędzy RNA rybosomów a DNA, Chipchase i Birnstiel (15) nie znaleźli żadnych znaczących różnic między DNA z jąderka a DNA z całych jąder. Natomiast Conkey i Hopkins (34) stwierdzili, że RNA o wysokiej aktywności właściwej otrzymane z rybosomów tworzył pięciokrotnie więcej hybrydów z DNA jądrowym niż z równoważną ilością DNA z całych jąder. Autorzy przypuszczają zatem, że w związanym z jądrem DNA skupione są wybiórczo geny warunkujące syntezę rybosomów. Zaobserwowano również metaboliczną heterogenność DNA w zależności od zlokalizowania na terenie jądra. W pewnych fazach życia komórki chromatyna związana z jądrem wykazuje najwyższy obrót z całego DNA jądrowego (28, 42, 61) co nasunęło przypuszczenie, że w tym rejonie jądra może rozpoczynać się proces reduplikacji DNA. Jednakże zagadnienie to wymaga jeszcze dalszych badań. Na razie rola jąderka w metabolizmie DNA nie jest wyjaśniona. Znacznie więcej danych zgromadzono o jego roli w metabolizmie RNA i białka.

I. Rola jąderka w metabolizmie RNA

Większość uzyskanych dotychczas danych świadczących, że jąderko pełni główną rolę lub przynajmniej jedną z głównych ról w syntezie komórkowego RNA, pochodzi z badań autoradiograficznych. W RNA jąderka znakowane prekursorzy RNA wbudowują się wcześniej niż w inne struktury subkomórkowe (11, 12). Gdy znakowane prekursorem RNA komórki syntetyzują dalej RNA w nieobecności znakowanego prekursora, piętno znika z jąderka a pojawia się w cytoplazmie (56). Hipoteza o jądrowym pochodzeniu RNA cytoplazmatycznego znalazła silne poparcie w wynikach mikroanalizy składu nukleotydowego RNA. Okazało się, że skład zasad RNA cytoplazmatycznego był niemal identyczny ze składem RNA jądrowego, a różny od RNA z pozajądrowego obszaru jądra (19, 20). Ostatecznego dowodu dostarczyli Perry i wsp. (57, 58), którzy zaobserwowali, że wybiórcze naświetlanie jąderka mikrowiązką światła

ultrafioletowego silnie hamuje pojawianie się znakowanego RNA w cytoplazmie. Doświadczenia te oraz badania nad kinetyką wbudowywania prekursorów RNA do różnych obszarów komórkowych stały się podstawą hipotezy (53) o istnieniu dwóch układów komórkowej syntezy RNA: syntezy w jąderkach, warunkującej powstawanie około 2/3 RNA cytoplazmatycznego i tzw. chromatynowej syntezy w obszarze pozająderekowym, warunkującej wytwarzanie reszty RNA obecnego w komórce.

Przypuszczano, że wszystkie trzy typy komórkowego RNA biorące udział w procesie biosyntezy białka: RNA informacyjny (mRNA), RNA przenoszący (tRNA) i RNA rybosomów są wytwarzane w jąderku, jednak dowody doświadczalne nie są jednakowo przekonujące dla każdego z nich. Obok doniesień o wytwarzaniu w jąderkach RNA podobnego do tRNA (39, 70) istnieją doniesienia (56), w których sugeruje się, że tRNA jest syntetyzowany w chromatynie pozająderekowej. Również kontrowersyjne jest miejsce biosyntezy mRNA. Obecność DNA-podobnego RNA o bardzo szybkim obrocie wykryto w preparatach jąderek wątroby (24, 25) i grasicy (65). Z jąderek otrzymano też RNA o właściwościach biologicznych mRNA, to znaczy pobudzający wbudowywanie znakowanych aminokwasów do białka w bezkomórkowym układzie rybosomów (8, 9). Przypuszcza się jednak, że miejscem biosyntezy mRNA może być także pozająderekowa chromatyna (56, 62), wytworzony w niej mRNA mógłby przechodzić do jąderka i tam ulegać akumulacji (60, 71).

Najlepiej udokumentowany i chyba już obecnie nie ulegający wątpliwości jest fakt syntezy RNA rybosomów w jąderku. Ten RNA stanowi około 80% całkowitej ilości RNA w komórce (52), jest najbardziej stałym jego składnikiem i przypuszczalnie nie zawiera informacji o sekwencji aminokwasów w syntetyzowanym białku. Jego główną funkcją jest najprawdopodobniej utrzymywanie struktury rybosomu. Spektrofotometrycznie zachowuje się on jako struktura wysoce uporządkowana (52) co jest wynikiem dużej zawartości reszt guaniny. Magglio i wsp. (37) stwierdzili, że w RNA jąderkowym wątroby świnki morskiej aż 50% całkowitej ilości zasad stanowią reszty guaniny. Jak wykazali zaś Singer i wsp. (67) charakterystyczną cechą RNA informacyjnego jest duża zawartość reszt urydylowych a niska guaninowych, natomiast kwasy rybonukleinowe o dużej zawartości guaniny wykazują słabą aktywność jako matryce dla biosyntezy białka. Jedna z frakcji RNA jąderkowego jest identyczna z RNA rybosomów zarówno pod względem składu zasad (15) jak i wielkości cząsteczki (3, 5): Zawiera ona dwa rodzaje cząsteczek: o stałych sedymentacji 28S i 18S, odpowiadające podjednostkom, na które rozpada się RNA rybosomów w pewnych warunkach. Składnikiem jąderka są także szybko sedymentujące komponenty RNA — 45S, 55S i 35S (46, 47, 63, 64). Wszystkie one mają bardzo podobny skład zasad zbliżony również do składu komponentu 28S, charakteryzujący się wysokim stężeniem reszt guaniny i cytozyny (46, 63, 64). Wielkocząsteczkowe składniki jąderko-

wego RNA, przede wszystkim zaś 45S, mogą stanowić początkowy produkt biosyntezy RNA w jąderku, z którego w wielostopniowym procesie powstają składniki 28S i 18S RNA rybosomów (46, 47, 52, 63, 64). Udało się odtworzyć kolejność przemian, jakim ulega RNA 45S w tym procesie. Wykorzystując fakt, że synteza jąderkowego RNA jest znacznie silniej hamowana przez aktynomycynę D niż synteza RNA chromatyny (55), Perry (56) śledził osobno te dwa procesy w komórkach. Przy stężeniu aktynomycyny, w którym całkowita synteza RNA zmniejszała się dwukrotnie, synteza RNA jąderkowego była obniżona więcej niż pięciokrotnie (54) i jąderka wykazywały wyraźnie mniejszą ilość znakowanych komponentów 45S i 35S. Gdy następnie komórki inkubowano nadal w obecności aktynomycyny D ale w środowisku z odpowiednim, nieznakowanym prekursorem RNA, w rybosomach cytoplazmy nie pojawiały się znakowane komponenty 28S i 18S, które powstają w nieobecności aktynomycyny D. Badanie kinetyki znakowania poszczególnych komponentów jąderkowego RNA (64) potwierdziło przypuszczenie, że najwcześniej jest syntetyzowany RNA 45S, który następnie ulega przekształceniu na RNA 35S, ten zaś z kolei na RNA rybosomów. Najprawdopodobniej jeszcze w obrębie jąderka obydwa składniki RNA rybosomalnego ulegają połączeniu z białkiem, przy czym z RNA 18S powstaje rybonukleoproteid o stałej sedymentacji 40S, a z RNA 28S — rybonukleoproteid 60S. Te rybonukleoproteidy są transportowane do cytoplazmy, gdzie łączą się ze sobą tworząc cząsteczki 76S rybosomów. Rybonukleoproteidowe cząsteczki 40S prawdopodobnie są transportowane do cytoplazmy zaraz po ich utworzeniu, ponieważ występują w jąderkach w stosunkowo małej ilości i pojawiają się w cytoplazmie wcześniej niż komponenty 60S. Znaczna część masy jąderka jest zbudowana z cząsteczek 60S, nagromadzających się w nim przez pewien okres (56). Doniesienia o przekształcaniu RNA 45S w cytoplazmatyczne komponenty rybosomów 18S i 28S w warunkach całkowitego zahamowania syntezy białka (56) sugerują, że istnieje jakiś zapas preformowanego białka gotowego do związania wytworzonego w jąderku prekursora RNA rybosomów.

Procesowi metylacji prawdopodobnie ulega już pierwszy prekursor RNA rybosomów — RNA 45S (52). Świadczą o tym: szczególnie duże stężenie metylaz RNA w jąderku w porównaniu z innymi obszarami jądra zawierającymi dużo RNA jak chromatyna jądrowa (1/6 aktywności enzymatycznej jąderek) i frakcja rybosomów jądrowych (brak aktywności (5)) oraz bardzo aktywne wbudowywanie grup metylowych metioniny do jąderek gruczołów ślinowych muchówki *Smittia (Diptera)* (72).

Danych o syntezie rybosomalnego RNA w jąderkach i o mechanizmie regulacji tego procesu dostarczyły także doświadczenia na układach zawierających jąderka wyodrębnione z różnych tkanek zwierzęcych (29, 33) i trójfosforany rybonukleozydów — adeniny, guaniny, cytozyny i uracylu. Wbudowywanie rybonukleotydów w RNA w takich układach jest hamo-

wane przez dezoksyrybonukleazę, rybonukleazę oraz aktynomycynę D. Dodanie do układu preparatu histonów z grasicy zwalnia syntezę RNA i zwiększa w nim ilość reszt guaniny i cytozyny. Odtrawienie histonów trypsyną zmniejsza zawartość G+C. Wskazywałoby to, że w kontroli syntezy RNA w jąderkach biorą udział histony, hamując wybiórczo aktywność tych matryc, które nie są czynne podczas syntezy RNA rybosomów.

II. Rola jąderka w metabolizmie białka

Znaczna część białka jąderek ma, jak wspomniano wyżej skład aminokwasowy bardzo podobny do białka rybosomów cytoplazmatycznych. W jąderkach stwierdzono metodami chemicznymi i za pomocą mikroskopu elektronowego obecność dużej puli cząsteczek rybonukleoproteidowych, bardzo przypominających rybosomy cytoplazmatyczne zarówno pod względem chemicznym jak morfologicznym (3). Obecność tych cząsteczek w jąderku wskazuje na jego ważną rolę jako miejsca łączenia się rybosomalnych komponentów rybonukleinowego z białkowym w ich drodze z jądra do cytoplazmy. Nie znaczy to jednak, że w jąderku odbywa się również sam proces syntezy białkowego składnika rybosomów czy też jakiegos innego białka. Za pomocą autoradiografii stwierdzono, że wbudowywanie aminokwasów do białek jąderka zachodzi w stopniu znaczącym tylko w komórkach wzrastających, natomiast jąderka dojrzałych komórek nie syntetyzują białka (68, 69). W komórkach HeLa w fazie intensywnego wzrostu wbudowywanie aminokwasów zachodzi z podobną szybkością w jąderkach, w obszarze pozająderkowym jądra i w cytoplazmie (21). Jeżeli naświetli się jąderko mikrowiązką UV, powodując w ten sposób prawie całkowite zahamowanie wbudowywania cytydyny do RNA, to dopiero po upływie 6 godzin wbudowywanie aminokwasów do cytoplazmy i do jąderka zmniejsza się o 30%, zaś w innych częściach jądra nadal nie ulega zmianie. Wskazuje to na pewien związek między syntezą białek w jąderkach i cytoplazmie. W ostatnich latach stwierdzono, że jąderko jest miejscem najbardziej aktywnej syntezy białka spośród wszystkich frakcji subjądrowych (1, 6, 22, 23, 32). Spośród zaś frakcji otrzymanych z jąderek najaktywniej wbudowują aminokwasy do białek rybosomo-podobne cząsteczki (32, 51), szczególnie aktywnie do białka o składzie aminokwasowym podobnym do białka rybosomów cytoplazmatycznych (6). Pewna ilość aminokwasów zostaje również włączona do rozpuszczalnych w kwasie białek jąderka (4, 23), z których część zidentyfikowano jako histony. Na podstawie tych wyników przypuszcza się, że jąderko jest również miejscem biosyntezy jądrowych białek zasadowych. Koncepcja ta może stanowić wyjaśnienie zaobserwowanego powiększania się jąderek w okresach wzmożonej syntezy histonów (13). Chociaż R e e s i wsp. (59)

uwzględniają również obszar jąderka za główne miejsce syntezy białka w jądrze, to przypuszczają na podstawie swoich badań, że miejscem tym nie jest samo jąderko lecz związana z nim chromatyna.

III. Jąderka komórki nowotworowej

Jedną z cech morfologicznych komórki nowotworowej jest charakterystyczne powiększenie i zmiana kształtu jąderek, któremu towarzyszy niejednokrotnie zwiększenie ilości jąderek, w komórce. Chociaż cecha ta nie jest patognomoniczna dla wzrostu nowotworowego, jak to początkowo przypuszczano i nie może stanowić kryterium diagnostycznego, to jednak jest rzeczą niewątpliwą, że komórki odznaczające się wzrostem intensywnym mają zawsze duże jąderka. Nasuwało się więc pytanie czy jąderka komórek nowotworowych i prawidłowych intensywnie wzrastających są podobne do siebie pod względem strukturalnym i funkcjonalnym. Powiększenie jąderka mogłoby być bądź wyłącznie wynikiem różnic ilościowych, bądź też zmian jakościowych zachodzących wraz ze zmianą komórki prawidłowej na nowotworową. Okazało się, że jąderka z guza Walkera zawierają kilkakrotnie więcej RNA, DNA i białka niż jąderka z komórek wątroby. RNA stanowi około 3,5% suchej masy jąderek wątroby i około 5,3% jąderek guza Walkera (12). Z porównawczych badań frakcji białkowych otrzymanych z jąderek (27) wynika, że histony stanowią około 1/3 całkowitej ilości białka w jąderkach wątroby, zaś 1/5 w jąderkach guza Walkera, natomiast kwaśne białka stanowią w jąderkach wątroby około 40%, a w jąderkach guza Walkera 60% wszystkich białek. Podobnie jak w przypadku całkowitych histonów jądra (38) obraz elektroforetyczny histonów z jąderek nie różni się w komórkach normalnych i nowotworowych. Znalezione natomiast pewne różnice ilościowe w składzie aminokwasowym białek rozpuszczalnych w 0,14M NaCl, co może być wynikiem albo obecności odmiennych typów białek albo też różnych ilości względnych tych samych rodzajów białek. Badania te wymagają jednak udoskonalenia metod rozdziału tak skomplikowanej mieszaniny białek, jaką stanowią jądra czy jąderka.

Najbardziej zasadnicze, dotychczas zaobserwowane różnice między jąderkami komórki normalnej i nowotworowej dotyczą podstawowej, jak się wydaje, funkcji jąderka a mianowicie syntezy RNA. W jąderkach komórek nowotworowych względna szybkość biosyntezy RNA przewyższa wielokrotnie szybkość tego procesu w komórkach w stanie spoczynku (30, 43). Jest ona jednakże tylko dwukrotnie wyższa niż w wątrobie regenerującej (44). Drogą porównywania intensywności wytwarzania RNA całkowitego czy nawet poszczególnych jego typów nie można zatem rozwiązać zagadnienia czy wzmożona synteza RNA jąderkowego stanowi cechę charakterystyczną komórek nowotworowych czy też towarzyszy zawsze wzmożonemu wzrostowi komórki. Porównywanie różnic między intensywnie

wzrastającą i znajdującą się w fazie spoczynkowej komórką prawidłową szczególnie dogodnie jest przeprowadzić na wątrobie regenerującej i wątrobie normalnej. Po częściowej hepatektomii niemal natychmiast zwiększa się synteza RNA i histonów w jądrach komórek wątroby, przy czym szczególne zwiększenie syntezy RNA zachodzi w jąderku. Ponadto zwiększa się wielkość jąderek i ilość RNA w nich. Okazało się, że w wątrobie regenerującej synteza RNA przebiega głównie w jąderku, a nie poza jąderkiem jak w wątrobie normalnej, lecz skład zasad w poszczególnych typach RNA jest podobny w obu typach tkanki wątrobowej. Z badań przeprowadzonych na jąderkach z guza Walkera oraz z innych przeszczepialnych guzów zwierzęcych (45, 49, 50, 76) wynika, że głównymi komponentami RNA jąderek tych tkanek są, podobnie jak w jąderkach wątroby, komponenty 55S, 45S, 35S, 28S i 6S. Po 15 minutach inkubacji jąderek z guzów z radioaktywnym prekursorem RNA radioaktywne są przede wszystkim frakcje 45S i 55S podobnie jak w przypadku jąderek z wątroby. Jednakże RNA 45S z jąderek badanych guzów ma inny skład zasad niż RNA 45S z jąderek wątroby zarówno w stanie spoczynku jak i regenerującej. Odnacza się on wyższą zawartością kwasu cytydylowego a niższą adenyłowego. Również inny jest skład zasad RNA 6S, którego funkcja jest jak dotychczas zupełnie nieznaną. Trudno jest znaleźć zadowalające wyjaśnienie tych istotnych różnic w składzie zasad RNA 45S między tkankami prawidłowymi a nowotworowymi, jeżeli założy się, że jedynym końcowym produktem tego szlaku syntezy RNA jest RNA rybosomów. Rybosomy pochodzące z różnych organizmów wykazują bowiem bardzo duże podobieństwo struktury i składu chemicznego. N a k a m u r a i wsp. (50) sądzą, że tylko część wytwarzanego w jąderkach RNA 45S jest zużywana na produkcję RNA rybosomów, natomiast pozostała, znaczna część tego RNA jest dalej przekształcana w inne typy RNA. Co więcej sugerują oni, że prawdopodobnie nawet sama ta frakcja 45S zawiera RNA różnych dotychczas niezidentyfikowanych typów pełniących różne nieznanne dotychczas funkcje. Przemawia za tym rozdzielenie za pomocą chromatografii RNA 45S z jąderek guza hepatoma Novikoffa na 10 frakcji różniących się między sobą składem zasad (75). Zagadnienie to wymaga dalszych szczegółowych badań na różnorodnym materiale komórkowym. Z dotychczas uzyskanych danych można zaś wyciągnąć przede wszystkim jeden wniosek — że jąderko jest narządem komórkowym o znacznie bardziej skomplikowanej strukturze i funkcji niż to sobie jeszcze nie tak dawno wyobrażano.

LITERATURA

1. Birnstiel M. L., Chipchase M. I. H., Bonner J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 6, 161 (1961).
2. Birnstiel F. L., Chipchase M. I. H., Flamm W. G., *Biochim. Biophys. Acta* 87, 111 (1964).

3. Birnstiel M. L., Chipchase M. I. H., Hyde B. B., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 454 (1963).
4. Birnstiel M. L., Flamm W. G., *Science* **145**, 1435 (1964).
5. Birnstiel M. L., Fleissner E., Borek E., *Science* **142**, 1577 (1963).
6. Birnstiel M. L., Hyde B. B., *J. Cell. Biol.* **18**, 41 (1963).
7. Birnstiel M. L., Rho J. H., Chipchase M. J. H., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 734 (1962).
8. Brentani R., Brentani M., Raw I., *Nature* **201**, 1130 (1964).
9. Brentani R., Brentani M., Raw I., *Nature* **214**, 1122 (1967).
10. Busch H., *An Introduction to the Biochemistry of the Cancer Cell*, New York, 1962.
11. Busch H., Byvoet P., Smetana K., *Cancer Res.* **23**, 313 (1963).
12. Busch H., Starbuck W. C., *Ann. Rev. Biochem.* **33**, 519 (1964).
13. Busch H., Steele W. J., *Advan. Cancer Res.* **8**, 135 (1964).
14. Caspersson T., Schultz J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **26**, 507 (1940).
15. Chipchase M. I. H., Birnstiel M. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **50**, 1101 (1963).
16. Davis J. M. G., *The Cell Nucleus*, New York, 1960.
17. Desjardins R., Smetana K., Busch H., *Exptl. Cell. Res.* **40**, 127 (1965).
18. Desjardins R., Smetana K., Grogan D., Higashi K., Busch H., *Cancer Res.* **26**, 97 (1966).
19. Edström J. E., *J. Biochem. Biophys. Cytol.* **8**, 47 (1960).
20. Edström J. E., Grampp W., Schorn N., *J. Biochem. Biophys. Cytol.* **11**, 549 (1961).
21. Errera M., Hell A., Perry R. P., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 47 (1961).
22. Flamm W. G., Birnstiel M. L., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 101 (1964).
23. Flamm W. C., Birnstiel M. L., *The Nucleohistones*, red. J. Bonner, P. Ts'o, Holden Day, 1964.
24. Georgiev G. P., Mantieva V. L., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 153 (1962).
25. Georgiev G. P., Samarina O. P., Lerman M. J., *Nature* **200**, 1291 (1963).
26. Grogan D. E., Busch H., *Biochemistry* **6**, 573 (1967).
27. Grogan D. E., Desjardins R., Busch H., *Cancer Res.* **26**, 775 (1966).
28. Harris H., *Biochem. J.* **72**, 54 (1959).
29. Hulbert R. B., Liau M. C., Miller E. C., *Intern. Symp. on the Cell Nucleus*, 1966.
30. Jacob S. T., Steele W. J., Busch H., *Cancer Res.* **27**, 52 (1967).
31. Koller P. C., *Exptl. Cell Res. (Suppl.)* **9** (1963).
32. Kornacka L., Malec J., (w przygotowaniu).
33. Liau M. C., Hnilica L. S., Hulbert R. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 626 (1965).
34. McConkey E. H., Hopkins J. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 1197 (1964).
35. McLeish J., *Nature* **204**, 36 (1964).
36. Maggio R., Siekevitz P., Palade G. E., *J. Cell Biol.* **18**, 267 (1963).
37. Maggio R., Siekevitz P., Palade C. E., *J. Cell Biol.* **18**, 293 (1963).
38. Malec J., *Post. Biochem.* **14**, 523 (1968).
39. Moldave K., *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 419 (1965).
40. Montgomery T. H., *J. Morph.* **15**, 265 (1898), cyt. wg Vincent W. S., Baltus E., *The Cell Nucleus*, red. J. S. Mitchell, Londyn 1960.
41. Monty K. J., Litt M., Kay E. R. M., Dounce A. L., *J. Biochem. Biophys. Cytol.* **2**, 127 (1956).
42. Morin G. A., Zajdela F., Costerouse O., *Exptl. Cell Res.* **13**, 204 (1957).
43. Muramatsu M., Busch H., *Cancer Res.* **24**, 1028 (1964).

44. Muramatsu M., Busch H., *J. Biol. Chem.* **240**, 3960 (1965).
45. Muramatsu M., Hodnett J. L., Busch H., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 592 (1964).
46. Muramatsu M., Hodnett J. L., Busch H., *J. Biol. Chem.* **241**, 1544 (1966).
47. Muramatsu M., Hodnett J. L., Steele W. J., Busch H., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 116 (1966).
48. Muramatsu M., Smetana K., Busch H., *Cancer Res.* **23**, 510 (1963).
49. Nakamura T., Rapp F., Busch H., *Cancer Res.* **27**, 1084 (1967).
50. Okamura N., Busch H., *Cancer Res.* **25**, 693 (1965).
51. Patel G., Wang T. Y., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 314 (1965).
52. Penman A. J., *New Engl. J. Med.* **276**, 502 (1967).
53. Perry R. P., *Exptl. Cell Res.* **20**, 216 (1960).
54. Perry R. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 2179 (1962).
55. Perry R. P., *Exptl. Cell Res.* **29**, 400 (1963).
56. Perry R. P., Intern. Symp. Genes and Chromosomes, structure and function, National Cancer Inst. Mon. 18, Bethesda, 1965.
57. Perry R. P., Errera M., The Cell Nucleus, red. J. S. Mitchell, Londyn, 1960.
58. Perry R. P., Hell A., Errera M., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 47 (1961).
59. Rees K. R., Rowland G. F., Varcoe J. S., *Biochem. J.* **86**, 130 (1963).
60. Rho I. H., Bonner J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 1611 (1961).
61. Ribas-Mundo M., *Blood* **28**, 891 (1966).
62. Ritossa F. M., Spiegelman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 737 (1965).
63. Scherrer K., Darnell J. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 486 (1962).
64. Scherrer K., Latham H., Darnell J. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **49**, 240 (1963).
65. Sibatani E., DeKloet S. R., Alfrey V. G., Mirsky A. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 471 (1962).
66. Siebert G., Villalobis J. G., Ro T. S., Steele W. J., Lindenmayer G. A., Adams H. R., Busch H., *J. Biol. Chem.* **241**, 71 (1966).
67. Singer M. F., Jones O. W., Nirenberg M. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **49**, 392 (1963).
68. Sirlin J. L., The Cell Nucleus, red. J. S. Mitchell, Londyn, 1960.
69. Sirlin J. R., *Progr. Biochem. Biophys. Chem.* **12**, 25 (1962).
70. Sirlin J. L., Jacob J., Birnstiel M. L., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 716 (1965).
71. Sirlin J. L., Jacob J., Kato K., *Exptl. Cell Res.* **27**, 355 (1962).
72. Sirlin J. L., Jacob J., Tandler C. J., *Biochem. J.* **89**, 447 (1963).
73. Smetana K., Busch H., *Cancer Res.* **23**, 1600 (1963).
74. Smetana K., Steele W. J., Busch H., *Exptl. Cell Res.* **31**, 198 (1963).
75. Smith S. J., Higashi H., Busch H., *Cancer Res.* **27**, 849 (1967).
76. Whitcutt J. M., Roth J. S., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 380 (1964).
77. Wilson E. B., The Cell, Mac-Millan, Nowy Jork, 1898, cyt. wg Vincent W. S., Baltus E., The Cell Nucleus, Mitchell J. S., Londyn, 1960.

K o m u n i k a t

Ósmy Międzynarodowy Kongres Biochemii odbędzie się w Rzymie w dniach od 3 do 9 września 1970 r. W programie Kongresu przewidziane są obrady na następujące tematy:

1. Struktura białka
2. Reaktywność białka
3. Mechanizm działania enzymów
4. Bioenergetyka i utlenianie biologiczne
5. Kwasy nukleinowe i synteza białka
6. Biochemiczne regulacje i systemy kontrolne
7. Biochemia struktur komórkowych i układów wieloenzymowych
8. Biochemia rozwoju i różnicowania
9. Immunochemia
10. Różne

JADWIGA PASSENT *

Działanie antybiotyków na biosyntezę białka

The Effect of Antibiotics on Protein Synthesis

The properties of antibiotics — inhibitors of the protein synthesis are reviewed.

Liczne antybiotyki znalazły zastosowanie w badaniach nad biosyntezą białka. Działając jako inhibitory w poszczególnych stadiach powstawania wiązania peptydowego ułatwiają one bliższe poznanie kolejnych etapów tego złożonego procesu. Aktynomycyny — grupa antybiotyków hamujących transkrypcję, tzn. powstawanie RNA na matrycy DNA, były przedmiotem artykułu W. Gałasińskiego w 12 tomie *Postępów Biochemii*. Niższy artykuł omawia działanie tych antybiotyków, które wpływają na syntezę łańcucha polipeptydowego na matrycy informacyjnego RNA (mRNA), czyli etap translacji informacji genetycznej.

I. Antybiotyki aminoglikozydowe

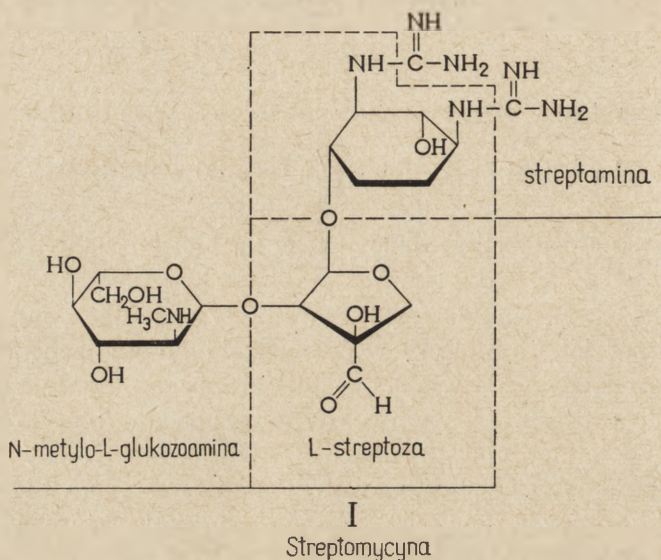
Antybiotyki tej grupy zawierają w cząsteczce streptaminę, dezoksy-streptaminę, ich stereozomery lub inozaminę. Są to: streptomycyna, kanamycyna, neomycyna, paromomycyna, hygromycyna, aktynospektyna i kasugamycyna — wyizolowane z hodowli promieniowców *Streptomyces*, oraz gentamycyna — z *Micromonospora purpurea* i *Micromonospora echinospora*.

Streptomycyna jest antybiotykiem aminoglikozydowym, którego wpływ na biosyntezę białka został najlepiej poznany. Jej działanie na syntezę białek *in vitro* opisali po raz pierwszy Erdős i Ullman (31, 32) w latach 1959—60. Badacze ci śledzili włączanie ¹⁴C-tyrozyny do białek

* Dr, Zakład Biosyntezy Białka, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: SM — streptomycyna, sRNA — rozpuszczalny kwas rybonukleinowy, poliU — kwas poliurydylowy, poliC — kwas policytydylowy, poliA — kwas poliadenylowy, mRNA — informacyjny kwas rybonukleinowy.

w układach bezkomórkowych z wrażliwego na streptomycynę szczepu *Mycobacterium friburgensis*. Wykazali oni, że streptomycyna (SM) nie wpływa na aktywację aminokwasów ani na tworzenie aminoacylo-sRNA, powoduje natomiast zahamowanie syntezy białka działając na późniejsze stadia tworzenia łańcucha polipeptydowego



Flaks i wsp. (34), a także Speyer i wsp. (106) wykazali w 1962 roku, że streptomycyna hamuje kierowane przez kwas poliurydylowy (poliU) włączanie fenyloalaniny do białek w układzie włączającym z *Escherichia coli*. Efekt ten odwracają poliaminy (16, 78), a także wysokie stężenia jonów magnezu (16, 69), z którymi streptomycyna współzawodniczy o miejsce na rybosomie (16). Dwa lata później Davies i wsp. (22) stwierdzili, że dodanie streptomycyny do układu syntetyzującego polifenyloalaninę pod wpływem poliU, zmienia własności kodujące układu w wyniku czego następuje stymulacja włączania leucyny i izoleucyny, z równoległym zahamowaniem włączania fenyloalaniny. Wpływ streptomycyny na układ syntetyzujący białko *in vitro* może być wzmożony przez dodanie zdenaturowanego DNA, którego rola ogranicza się tu zapewne do zmiany konformacji rybosomów (75).

Porównanie kodonów dla fenyloalaniny, leucyny i izoleucyny (tablica I) wskazuje, że streptomycyna zmienia w układzie bezkomórkowym sposób odczytania zarówno pierwszej jak i trzeciej litery tripletu, druga litera — U — jest zawsze identyczna.

Powyższe prace przeprowadzono na szczepach *E.coli* wrażliwych na działanie streptomycyny (SM-wrażliwych). Już w 1961 roku Spotts i Stanier (107) wysuwali koncepcję, że cecha oporności, wrażliwości

a także zależności streptomycynowej bakterii może być związana z rybosomami. Hipotezę tę potwierdziły badania C o x a i wsp. (16) jak również D a v i e s a (20), którzy stosując rekonstruowane rybosomy, zawierające

Tablica 1

Aminokwas	Kodon
Fenylalanina	UUU UUC
Leucyna	UUA UUG CUU CUC CUA CUG
Izoleucyna	AUU AUC AUA

jedną podjednostkę ze szczepu SM-opornego a drugą ze szczepu SM-wrażliwego wykazali, że wrażliwość na streptomycynę zlokalizowana jest w podjednostce 30S rybosomów szczepu *E.coli* SM-wrażliwego.

Badając mechanizm działania streptomycyny P e s t k a i wsp. (94) stwierdzili, że wpływa ona na tworzenie kompleksu kodon-rybosom-aminoacylo-sRNA w obecności matryc trój- i polinukleotydowych. Zmieniona przez streptomycynę przestrzenna konfiguracja tego kompleksu wywołuje zmianę własności kodujących danego mRNA, inaczej mówiąc streptomycyna zmienia specyfikę wiązania aminoacylo-sRNA do podjednostki 30S (65, 66, 111). Wystarczy przy tym jedna do dwóch cząsteczek antybiotyku związanych z jednym rybosomem aby wywołać efekt hamowania biosyntezy białka (93).

Streptomycyna wywołuje zmianę informacji genetycznej także w przypadku naturalnych mRNA. S c h w a r t z (101) stwierdził, że SM modyfikuje informację zawartą w RNA bakteriofaga f2 w czasie biosyntezy białka w układzie bezkomórkowym z *E.coli*. Antybiotyk ten wpływa również na biosyntezę przeciwciał. Hodowla komórek limfatycznych królika, immunizowanych bakteriofagiem MS2 syntetyzuje przeciwciała neutralizujące bakteriofaga. W obecności streptomycyny komórki te wytwarzają przeciwciała, które wykazują większe powinowactwo do innych fagów z tej samej grupy fagów f2, niż do bakteriofaga MS2 (71). Prawdopodobnie SM wiążąc się z podjednostką 40S rybosomu 76S powoduje błędy w odczy-

tywaniu informacyjnego RNA, którym w tym przypadku jest RNA faga MS2.

Błędne odczytywanie kodu genetycznego (ang. *miscoding* lub *misreading*) pod wpływem streptomycyny wywołuje niekiedy *in vivo* powstanie tzw. supresji streptomycynowej. Gorini i wsp. (49, 50) opisali szczep *E.coli* wrażliwy na streptomycynę, który wymaga do wzrostu argininy. Szczep ten nie wytwarza jednego z enzymów niezbędnych do syntezy argininy. Dodanie streptomycyny do hodowli powoduje endogenną syntezę argininy. Następuje więc zmiana w translacji, dzięki której odczytanie części informacji uprzednio nie odczytywanej lub odczytywanej inaczej, prowadzi do powstania czynnego białka enzymatycznego, a następnie argininy.

Niektóre bakterie są zależne od streptomycyny, tzn. wymagają do wzrostu i namnażania się niewielkich ilości tego antybiotyku w środowisku. Stwierdzono, że SM-zależność jest cechą genetyczną. Mutacja powodująca zależność streptomycynową zmapowana została w tym samym locus co i SM-oporność (6, 26). Rybosomy szczepów SM-zależnych mają budowę, która uniemożliwia odczytanie niektórych lub wszystkich kodonów. Dopiero dodanie streptomycyny zmienia konfigurację w ten sposób, że staje się możliwe właściwe przyłączenie mRNA do rybosomów, a więc i translacja (34, 51). Można powiedzieć, że jest to objaw niezbędnej do życia supresji streptomycynowej.

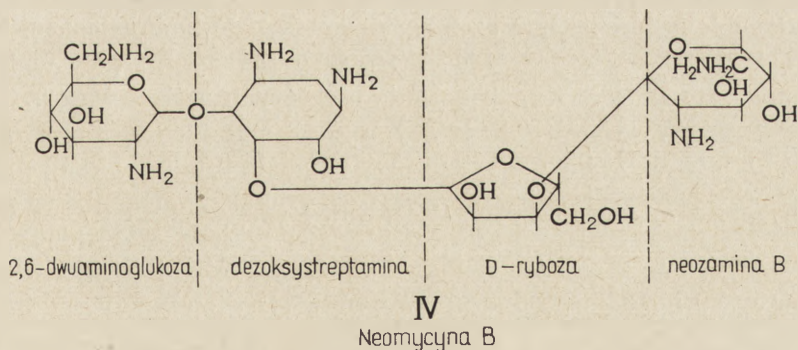
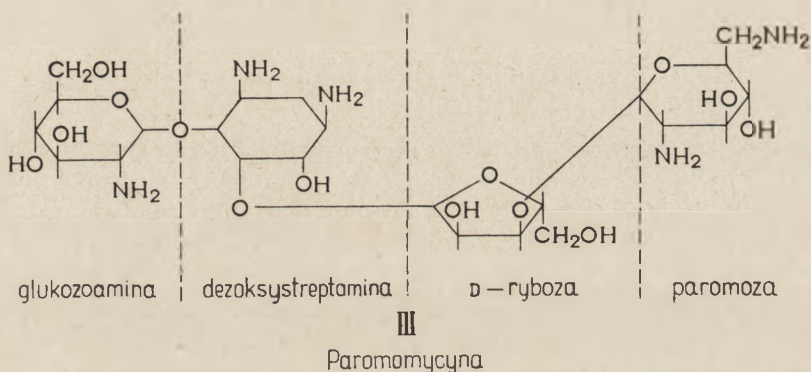
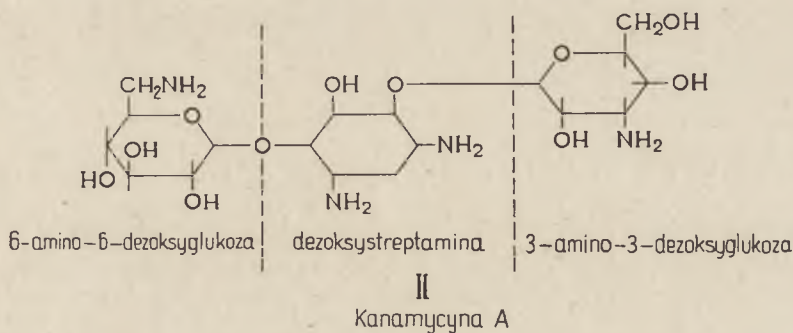
Obecnie znane są nie tylko różnice w działaniu między rybosomami wyodrębnionymi ze szczepów SM-wrażliwych i SM-opornych ale wykazano także różnice w ich budowie. Leboy i wsp. (73), a także Flaks i wsp. (34, 35, 36) opisali różnice w obrazie elektroforetycznym białek wyizolowanych z podjednostek 30S rybosomów *E.coli* form SM-opornej i SM-wrażliwej. Z drugiej jednak strony Sawada i Suzuki (98) nie wykazali żadnych różnic immunologicznych między rybosomami szczepów SM-wrażliwego i SM-opornego *Diplococcus pneumoniae*. Wiadomo jednak, że metodami immunologicznymi nie można uchwycić wszystkich różnic w budowie pierwszorzędowej porównywanych białek (64).

Pozostałe antybiotyki aminoglikozydowe nie zawsze mają taki sam wpływ jak streptomycyna na biosyntezę białka. Zmianę odczytywania informacji genetycznej powoduje kanamycyna (II), paromomycyna (III), neomycyna (IV), gentamycyna i hygromycyna, a więc te antybiotyki, które zawierają w cząsteczce streptaminę lub dezoksystreptaminę (116). Natomiast spektynomycyna (aktynospektyna), która zawiera stereoisomer streptaminy — N,N'-dwumetyloaktynaminę i kasugamycyna, która w odróżnieniu od innych posiada boczny łańcuch kwasu amidynokarboksylowego -NH-C-COOH (60), wywierają hamujący wpływ na biosyntezę białka.



Gentamycyna. Milanesi i Ciferri (81) wykazali, że antybiotyk ten dodany do hodowli *E.coli* w logarytmicznej fazie wzrostu obniża syn-

tezę białka nie wpływając na syntezę kwasów nukleinowych, natomiast dodany do bezkomórkowego układu z *E.coli* stymuluje włączanie niektórych aminokwasów, a także zmienia własności kodujące poliU, wywołując w jego obecności zwiększone włączanie izoleucyny. Ta ostatnia ob-



serwacja potwierdziła wyniki badań Daviesa i wsp. (23). Milanesi i Ciferri (81) wykazali dalej, że w układzie bezkomórkowym uzyskanym z mutanta *E.coli* opornego na gentamycynę, dodanie antybiotyku nie wpływa na włączanie aminokwasów do białka oraz, że oporność nie jest

cechą rybosomów, lecz frakcji supernatantowej po wirowaniu przy 105 000 g.

Kanamycyna i neomycyna stymulują włączanie aminokwasów do białka w układzie bezkomórkowym z *E. coli*, gdy matrycą jest zdenaturowany cieplnie DNA (80). Badając wpływ produktów kwaśnej hydrolizy kanamycyny na syntezę białka *in vitro* ustalono, że tylko dezoksystreptamina stymuluje włączanie aminokwasów, zarówno w obecności polirybonukleotydów jak i zdenaturowanego DNA, natomiast dwa pozostałe ugrupowania sacharydowe: 3-amino-3-dezoksyglukoza i 6-amino-6-dezoksyglukoza nie wpływają na włączanie aminokwasów (116).

O k a m o t o i S u z u k i (91) wyhodowali szczep *E. coli* K12 kanamycyno-oporny. Szczep ten, w odróżnieniu od wrażliwego, wytwarza enzym inaktywujący kanamycynę. W produkcji enzymatycznej inaktywacji kanamycyny grupa aminowa 6-amino-6-dezoksyglukozy jest zacetylowana (124). Enzym ten nie działa na kanamycynę C (która zawiera 2-amino-2-dezoksyglukozę), neomycynę i paromomycynę (92).

Opierając się na odkryciu H o l l a n d a i M c C a r t h y' e g o (58) oraz M a s u k a w y i T a n a k i (80), że zdenaturowany cieplnie DNA w obecności antybiotyków aminoglikozydowych może pełnić *in vitro* rolę matrycy, K h o r a n a i wsp. (68) wykazali, że także jednoniciowe dezoksyrybopolinukleotydy podwyższają włączanie niektórych aminokwasów do białek w obecności neomycyny. Z wielu badanych przez nich antybiotyków właściwość tę posiadała również gentamycyna.

Spektynomycyna hamuje syntezę białka, zarówno w obecności matrycy syntetycznych jak i naturalnych, np. RNA faga MS2, nie powoduje jednak zmiany własności kodujących tych matryc. Oporność bakterii na spektynomycynę jest związana ze strukturą podjednostki rybosomalnej 30S (21).

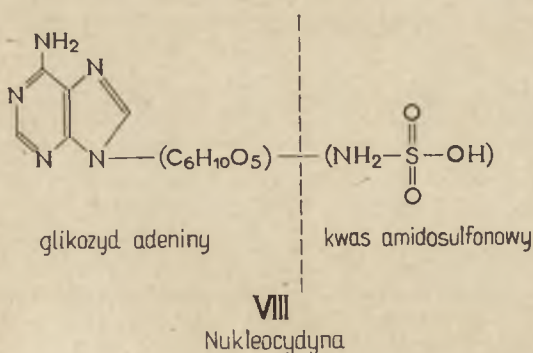
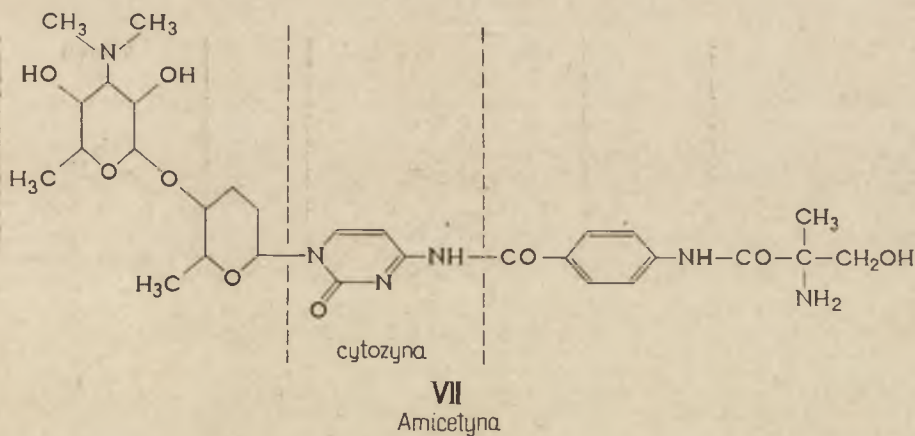
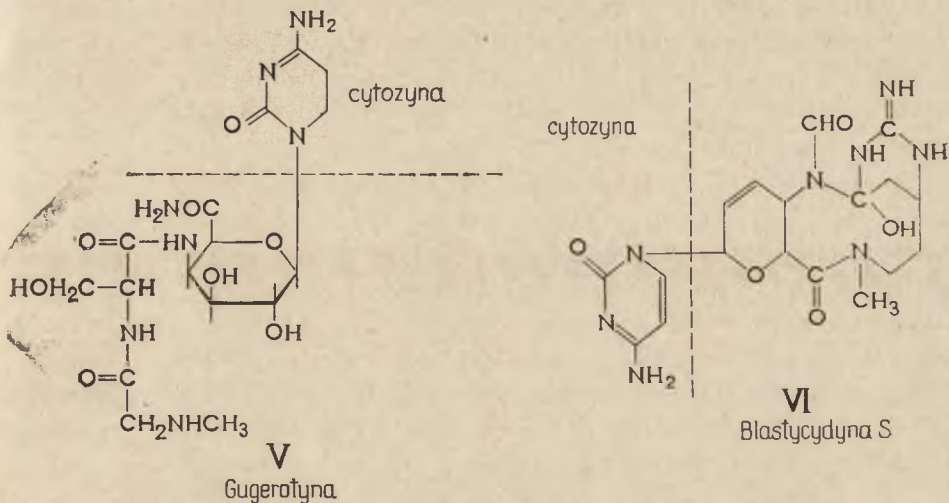
Kasugamycyna również hamuje włączanie aminokwasów do białek, obniżając zdolność wiązania aminoacylo-mRNA do kompleksu mRNA-rybosom (118). Co więcej, antybiotyk ten odwraca stymulujący wpływ neomycyny i kanamycyny na włączanie niektórych aminokwasów.

Efekt zmiany własności kodujących matrycy wywoływany przez antybiotyki aminoglikozydowe występuje w zasadzie tylko w układach bakteryjnych. Rybosomy organizmów wyższych wykazują stosunkowo znaczną wierność w procesie translacji. Na przykład układy włączające amino-kwasy otrzymane z glonów zielonych (100), jak również układ z retikulocytów królika (133), są odporne na wpływ streptomycyny.

II. Antybiotyki aminoacylonukleozydowe

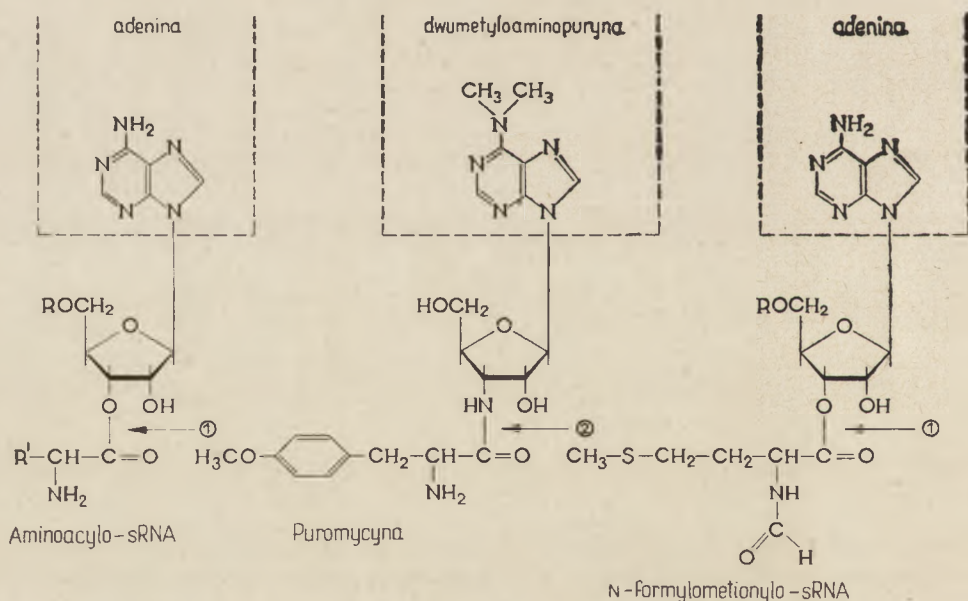
Wpływ tych antybiotyków na biosyntezę białka oparty jest na podobieństwie ich budowy do budowy aminoacylo-sRNA. Najbardziej znanym antybiotykiem tej grupy jest puromycyna (wzór patrz schemat 1), należą

do niej także gugerotyna (V), blastycydyna (IV) amicetyna (VII) i nukleocydyna (VIII). Niektórzy badacze zaliczają też do tej grupy chloramfenikol (wzór patrz schemat 2).



Puromycyna. W 1955 roku Creaser (17) wykazał, że puromycyna w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ w hodowli *Staphylococcus aureus* hamuje w 98% indukowaną syntezę β -galaktozydazy. Kilka lat później okazało się, że antybiotyk ten hamuje włączanie aminokwasów do białek także w układzie bezkomórkowym z wątroby szczura (141). Wpływ puromycyny na układ syntetyzujący białko jest odwracalny. Komórki HeLa a także bakterii *Pseudomonas fluorescens*, w których zahamowano biosyntezę białka działaniem puromycyny, po odmyciu antybiotyku odzyskują zdolności metaboliczne (85, 113).

Puromycyna obniża także syntezę DNA (95) i RNA (57) w komórkach, uważa się jednak, że są to efekty wtórne, wynikające z zakłócenia biosyntezy białka. Studziński i Jackson (108) wirując w gradiencie sacharozy kwasy nukleinowe wyizolowane z komórek HeLa poddanych działaniu antybiotyku wykazali, że puromycyna powoduje powstanie uszkodzonego RNA rybosomalnego lub prekursorowego RNA rybosomów. Potwierdzają to również wyniki badań Villa-Trevino i Nolla (129), którzy stwierdzili, że podana parenteralnie puromycyna wywołuje u szczura rozpad polisomów wątroby.



Schemat 1. Analogia budowy puromycyny, aminoacylo-sRNA i N-formylometionilo-sRNA

R — reszta sRNA, R' — boczny łańcuch aminokwasu, 1 — wiązanie estrowe, przy odszczepianiu sRNA powstaje wolna grupa karboksylowa, 2 — wiązanie amidowe nie ulegające transpeptydacji, wobec czego nie powstaje wolna grupa karboksylowa

Dzięki podobieństwu strukturalnemu puromycyny do kompleksu sRNA-aminokwas (schemat 1) wolna grupa aminowa antybiotyku, stanowiąca część reszty tyrozyny, może zostać zacylowana końcową grupą karboksylową rosnącego łańcucha polipeptydowego. W efekcie następuje przedwczesne odłączenie polipeptydu od rybosomu i zahamowanie syntezy (44, 51). Jest to tak zwana reakcja puromycynowa, w wyniku której powstaje związek oligopeptyd-puromycyna.

W reakcji puromycyny z formylometionylo-sRNA (p. schemat 1) zachodzącej w obecności rybosomów i AUG jako matrycy, powstaje formylometionylo-puromycyna (3). W czasie tej reakcji formylometionylo-sRNA znajduje się na miejscu peptydowym rybosomu (tzn. zajmowanym normalnie przez rosnący łańcuch polipeptydowy) i reaguje z puromycyną, ułożoną na miejscu aminokwasowym rybosomu (tzn. zajmowanym normalnie przez przychodzący aminoacylo-sRNA). Według Bretschera i Marckera (3), a także Zamira i wsp. (143), reakcja ta nie wymaga udziału GTP ani enzymów. Natomiast Hershey i Thach (55) utrzymują, że utworzenie formylometionylo-puromycyny wymaga zużycia GTP.

Nieco inne wyjaśnienie mechanizmu reakcji puromycynowej postuluje Coutsogeorgopoulos (14). Stwierdził on, że puromycynowe zahamowanie tworzenia polifenyloalaniny wobec poliU nie jest odwracane przez zwiększone stężenia fenyloalanylo-sRNA. Fakt ten wskazuje, że puromycyna nie współzawodniczy o miejsce akceptorowe, zajmowane normalnie przez fenyloalanylo-sRNA. W związku z tym autor ten zakłada istnienie pewnego miejsca S, na którym reaguje grupa aminowa aminoacylu z karboksylową grupą adenylowego końca peptydylo-sRNA, tworząc wiązanie peptydowe.

Nukleocydyna hamuje włączanie aminokwasów do białek wątroby szczura *in vivo* i *in vitro*. Mechanizm działania tego antybiotyku jest inny niż mechanizm działania puromycyny. Florini i wsp. (37) stwierdzili, że nukleocydyna hamuje przeniesienie aminokwasu z aminoacylo-sRNA na rosnący polipeptyd. Niezbędna jest przy tym frakcja białek pH 5.

Chloramfenikol jest jednym z ciekawszych antybiotyków — inhibitorów biosyntezy białka. Mimo intensywnych badań szczegółowy mechanizm jego działania nie został dotychczas wyjaśniony. Chloramfenikol (p-nitrofenylo-dwu-chloroacetamido-propandiol-1,3) zawiera w cząsteczce dwa asymetryczne atomy węgla. Struktura taka może istnieć w czterech formach izomerów optycznych. Przyjmuje się, że tylko jedna z nich — D(-)treo — jest aktywna biologicznie (70), jakkolwiek są doniesienia, z których wynika, że także forma L(+erytro może działać na drobnoustroje (54).

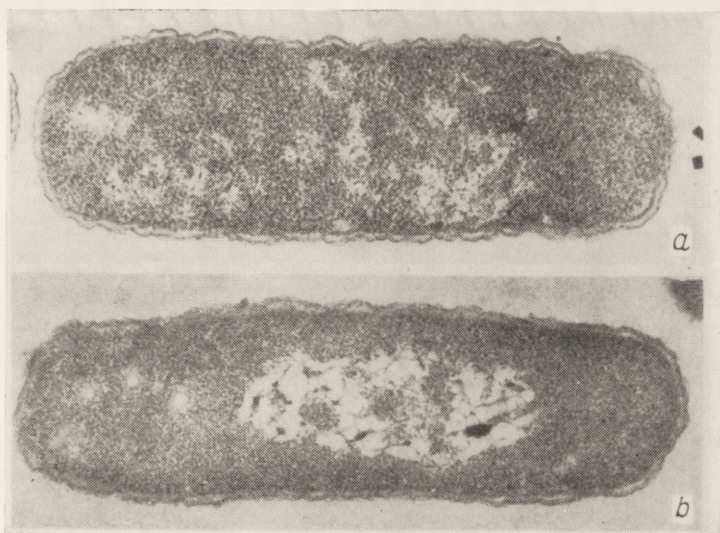
Wpływ chloramfenikolu na biosyntezę białka opisali po raz pierwszy Gale i Painé (42), którzy donieśli w 1950 roku, że w stężeniu 1µg/ml hamuje on w 76% syntezę białka w komórkach *Staphylococcus aureus*.

Wykazali oni jednocześnie, że działanie antybiotyku nie wynika z obniżonego transportu aminokwasów do komórki (40). Następnie Gale i wsp. (40, 41, 43) stwierdzili, że oddychanie a także synteza kwasów nukleinowych zachodzą dalej w obecności antybiotyku.

Wskutek nierównoważonej syntezy kwasów nukleinowych w obecności chloramfenikolu powstają nienormalne rybosomy, tzw. cząstki chloramfenikolowe. Nomura i Watson (90) stwierdzili, że hodowla *E.coli* poddana działaniu chloramfenikolu w stężeniu 200µg/ml wytwarza zamiast rybosomowych podjednostek 30S, cząstki nukleoproteidowe 15S, w których ilość białka w stosunku do kwasów nukleinowych jest obniżona w porównaniu z normalnymi podjednostkami. Podwyższając stężenie jonów magnezu autorzy uzyskali agregację cząstek 15S do cząstek 24S i 31S, które również zawierały zmniejszoną ilość białka. W 1963 roku Szakułow, Bogdanow i Spirin (112) zrekonstruowali *in vitro* w obecności jonów magnezu z cząstek chloramfenikolowych 19S i 25S oraz białka rybosomowego cząstki rybosomopochodne, które właściwościami fizykochemicznymi nie różniły się od naturalnych podjednostek 30S i 50S. Być może więc cząstki takie są częściami składowymi normalnych podjednostek i prawdopodobnie mogą uczestniczyć w metabolizmie (86). W komórkach *E.coli* traktowanych chloramfenikolem Morgan i wsp. (84) stwierdzili metodą mikroskopii elektronowej zanik rybosomów i gromadzenie się materiału jądrowego w środku komórki (rysunek 1).

Dotychczas przyjmowano, że miejscem działania chloramfenikolu na biosyntezę białka są rybosomy, stwierdzono bowiem, że antybiotyk wiąże się z podjednostką 50S (122, 125, 128, 131). Wysuwano nawet hipotezę, że antybiotyk wiążąc się z rybosomami zmienia ich strukturę (122, 126, 127). Wcześniejsze poglądy na mechanizm działania chloramfenikolu wyrażały myśl, że antybiotyk współzawodniczy z mRNA o miejsce na rybosomie (137), lub też wpływa na „pewne funkcje mRNA” (136), a także, że współzawodniczy z C-końcowym aminokwasem rosnącego polipeptydu o miejsce na rybosomie (19). Stwierdzono natomiast z całą pewnością, że chloramfenikol nie zapobiega aktywacji aminokwasów lub tworzeniu aminoacylo-sRNA (27). Ponieważ w roztworze chloramfenikol przybiera postać pierścieniową (schemat 2) (4, 61), przez co upodabnia się do antybiotyków acyloaminonukleozydowych, Coutsogeorgopoulos (13, 15) wysunął hipotezę, że antybiotyk ten działa na tej samej zasadzie jak promycyna, hamując biosyntezę białka przez przedwczesne odłączenie polipeptydu.

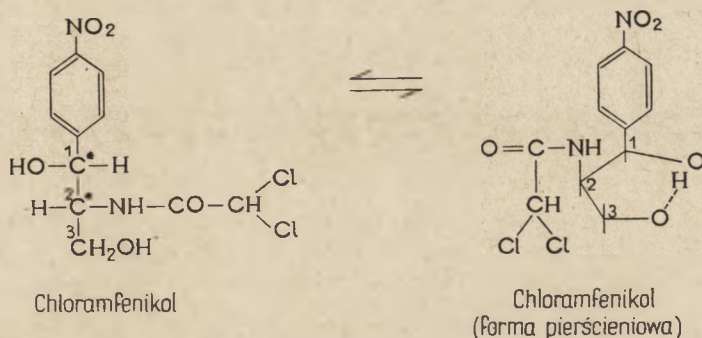
Chloramfenikol działa na fagi (79) a także na rośliny zielone uszkadzając syntezę białek chloroplastowych, natomiast nie obniża syntezy białek cytoplazmatycznych (40). Wykazano także, że otrzymany z chloroplastów układ syntetyzujący białko *in vitro*, jest wrażliwy na niskie stężenia chloramfenikolu (105), podczas gdy układ cytoplazmatyczny jest nieczuły



Rysunek 1. Wpływ chloramfenikolu na komórkę *E.coli* (wg 84)
a. komórka kontrolna, b. komórka traktowana chloramfenikolem przez 1 godzinę

(28). Potwierdzają to doświadczenia Andersona i Smillie'ego (1), którzy stwierdzili, że rybosomy chloroplastów pędów grochu wiążą chloramfenikol silniej niż rybosomy cytoplazmatyczne.

W pewnych warunkach chloramfenikol stymuluje syntezę enzymów prawdopodobnie przez zahamowanie syntezy białkowych represorów (77). W stężeniu 1000—3000 $\mu\text{g/ml}$ chloramfenikol wzmagą kiełkowanie niektórych roślin, np. sałaty (38), fasoli (130), rzodkwi (39).



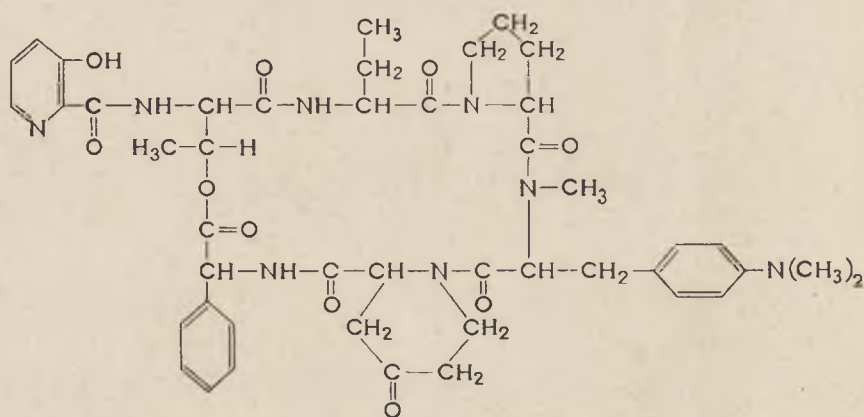
Schemat 2. Chloramfenikol i jego forma pierścieniowa

Niskie stężenia chloramfenikolu (10^{-6} — 10^{-4}), które hamują bakteryjną syntezę białka *in vivo* i *in vitro* (88), nie wpływają na syntezę białka w układach pochodzących z organizmów zwierząt wyższych, np. z wątroby szczura, retikulocytów królika (97, 132). Wyjątek stanowi synteza przeciwciał wrażliwa już na niskie stężenie antybiotyku (118). Z dwóch rodzajów rybosomów izolowanych z organu produkującego przeciwciała — śledziony — tylko rybosomy osadzone na endoplazmatycznym retikulum ulegają hamującemu działaniu (do 80%) chloramfenikolu, natomiast rybosomy wolne są stosunkowo odporne (114).

III. Antybiotyki peptydowe

Botromycyna A₂ jest antybiotykiem peptydowym o wzorze sumarycznym $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_7\text{N}_8\text{S}$ (87). Hamuje ona syntezę białka w układzie bezkomórkowym z *E.coli* wobec syntetycznych matryc (117). Działanie tego antybiotyku zależy od charakteru syntetycznego polinukleotydu; botromycyna hamuje włączanie aminokwasów kierowane przez poliC, nie wpływa natomiast na włączanie aminokwasów gdy matrycą jest poliU lub poliA. Mechanizm działania antybiotyku polega na zahamowaniu przeniesienia aminokwasu na rosnący polipeptyd znajdujący się na rybosomie. Ostatnio wykazano, że aktywność botromycyny jako inhibitora syntezy białek odwracana jest przez wysokie stężenia rybosomów (76).

Enomycyna wyizolowana przez grupę współpracowników Umezawy (110) z kultury *Streptomyces mauvecolor*, jest polipeptydem zasadowym o wysokim ciężarze cząsteczkowym — około 11 000. *Enomycyna* wykazuje aktywność przeciwrakową, nie posiada natomiast własności bakteriobójczych. Antybiotyk ten łączy się z rybosomami wyizolowanymi z komórek raka Ehrlicha, nie łączy się natomiast z rybosomami *E.coli* (83).



IX

Mikamycyna B

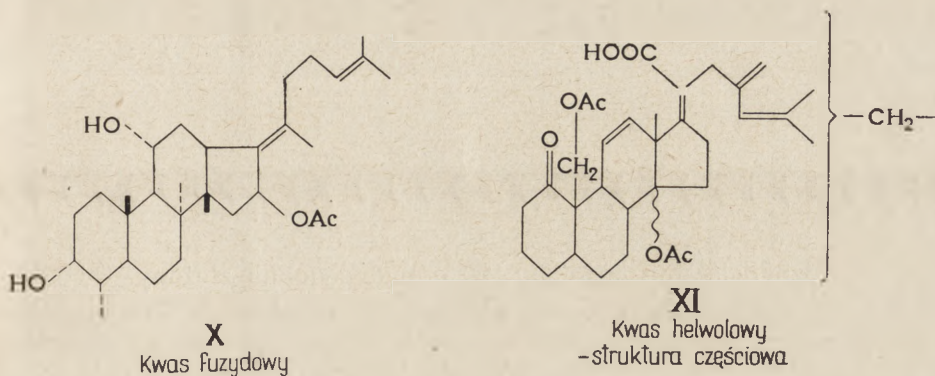
Dlatego też Mizuno i wsp. (82) badając wpływ *enomycyny* na syntezę białka *in vitro* zastosowali układy bezkomórkowe z komórek HeLa i z raka puchlinowego Ehrlicha. Stwierdzili oni, że *enomycyna* znacznie hamuje biosyntezę białka w tych układach, nie wpływa natomiast na działanie układu bezkomórkowego z *E.coli*. Ci sami autorzy wykazali, że mechanizm działania *enomycyny* polega na hamowaniu wiązania aminoacylo-sRNA do polisomów (83).

Mikamycyny można także zaliczyć do antybiotyków peptydowych. *Mikamycyna B* (IX) jest makrocyclicznym laktonem peptydowym. Antybiotyki tej grupy hamują bakteryjną syntezę białka zarówno *in vivo* jak i w układach bezkomórkowych z *E.coli* i programowanych przez poliU (138, 139). Stopień hamowania zależy przy tym od natury matrycy — *mikamycyny* wpływają bardzo nieznacznie na syntezę białka *in vitro* programowaną przez matryce naturalne. Także spokrewniona z *mikamycynami* *vernamicyna A* hamuje w obecności poliU syntezę białka w układzie bezkomórkowym z *E.coli* (72).

IV. Inne antybiotyki

Antybiotyki steroidowe. Yamaki (140) stwierdził w 1965 roku, że dwa antybiotyki zawierające szkielet protolanostanu — kwas fuzydowy (X) i kwas helwolowy (XI), hamują biosyntezę białka w układach bakte-

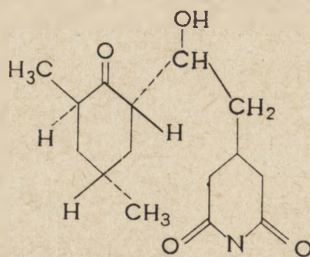
ryjnych *in vivo* i *in vitro*. T a n a k a i wsp. (115) wykazali, że mechanizm działania tych antybiotyków polega na zahamowaniu przeniesienia aminokwasu z aminoacylo-sRNA na rosnący polipeptyd na rybosomie. Stwierdzono także, że kwas fuzydowy nie jest inhibitorem reakcji puromycynowej, a więc nie powoduje przedwczesnego ukończenia łańcucha białkowego.



Sparsomycyna, związek o wzorze sumarycznym $C_{13}H_{21}N_3O_6S_2$ (46) jest antybiotykiem o nieznannej bliżej budowie, którego mechanizm działania jest jednak częściowo wyjaśniony. Dodana do hodowli tkankowej komórek nowotworowych w stężeniu 0,05—1 $\mu\text{g/ml}$ wywołuje 50—100% zahamowania wzrostu. Hamuje także wzrost bakterii, drożdży, grzybów, komórek ssaków (47). *Sparsomycyna* jest inhibitorem biosyntezy białka w ekstraktach z *E.coli* (46) oraz z retikulocytów królika (10), przy czym wiadomo, że działa na etapie tworzenia wiązania peptydowego (48). W stężeniu 10^{-6} M hamuje syntezę białka gdy matrycą są syntetyczne polirybonukleotydy, RNA faga MS2 lub naturalny mRNA bakteryjny (47). W reakcji puromycynowej działa jako kompetycyjny inhibitor puromycyny. W odróżnieniu jednak od puromycyny hamowanie syntezy białka w obecności syntetycznych polinukleotydów przez *sparsomycynę* zależy od rodzaju polinukleotydu (46). *Jayaraman* i *Golberg* (62) porównując mechanizmy działania kilku antybiotyków na syntezę łańcucha polipeptydowego stwierdzili, że *sparsomycyna* hamuje tworzenie pierwszego wiązania peptydowego, podczas gdy chloramfenikol i gugerotyna wpływają przede wszystkim na wydłużenie łańcucha polipeptydowego.

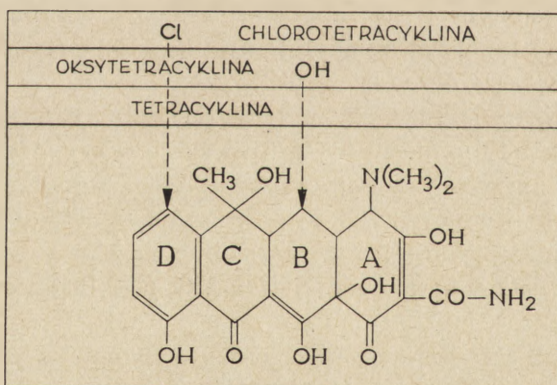
Cykloheksimid (XII) inaczej zwany aktidionem jest inhibitorem biosyntezy białka w komórkach drożdży, pierwotniaków, roślin i ssaków (29, 30, 67, 74, 142). Hamuje on syntezę białka także w układach bezkomórkowych otrzymanych z *Saccharomyces pastorianus* (102), wątroby szczura (134), retikulocytów królika (33). Nie wpływa natomiast na układy bezkomórkowe z *Escherichia coli* (29). Okazało się także, że syntezę białka zachodzącą w mitochondriach jest niewrażliwa na działanie aktidionu (9).

Cykloheksimid zawiera w cząsteczce resztę imidu kwasu glutarowego. Należy wspomnieć, że znane są również inne związki glutarimidowe działające na syntezę białka, na przykład alkaloid emetyna (53).



XII
Cykloheksimid

Mechanizm działania aktidionu jest prawdopodobnie złożony. Siegel i Sisler (103) wykazali, że antybiotyk ten zapobiega przeniesieniu aminokwasu z aminoacylo-sRNA na kompleks rybosom-polipeptyd. Wettstein i wsp. (134) stwierdzili, że aktidion wywiera stabilizujący wpływ na polisomy z wątroby szczura. Godchaux i Herbert (45) zauważyli, że w niewysokim stężeniu (10^{-6} M) aktidion przeciwdziała rozpadowi polisomów z retikulocytów królika, wywołanemu przez chloramfenikol lub fluorek sodu, natomiast wyższe stężenia antybiotyku (10^{-4} M) powodują rozpad polisomów.



XIII
Tetracykliny

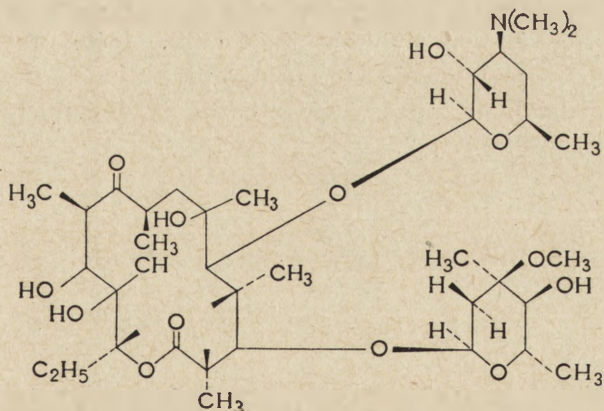
Wpływ aktidionu na drożdże zależy od gatunku drożdży. Układy bezkomórkowe z *Saccharomyces fragilis* są niewrażliwe na dodanie aktidionu (104), natomiast w układach bezkomórkowych z *S.cerevisiae*, *S.elipsoideus* i *S.pastorianus* antybiotyk ten hamuje biosyntezę białka (12, 103, 135). Odporność na działanie cykloheksimidu jest cechą podjednostki 60S rybosomów drożdży (96).

Tetracykliny. Tetracyklina (XIII) ma własności chelatujące, dzięki czemu wiążąc jony magnezu wywołuje dysocjację rybosomów *Escherichia coli* do cząstek 70S, zarówno *in vivo* jak i *in vitro* (24, 25). Nie powoduje jednak dalszej dysocjacji rybosomów do podjednostek. Antybiotyk ten hamuje biosyntezę białka w układach bezkomórkowych zarówno z bakterii jak i z tkanek ssaków (41, 52). Connamacher i Mandel (11) sugerowali, że tetracyklina hamuje biosyntezę białka przez łączenie się z mRNA. Z drugiej strony Hierowski (456) a także Suarez i Nathans (109) wykazali, że tetracyklina wiążąc się z rybosomami blokuje miejsce akceptorowe aminoacylo-sRNA, przez co zapobiega wiązaniu aminoacylo-sRNA do rybosomów w obecności poliU jako matrycy.

Nieco inaczej działa oksytetracyklina (XIII). W bezkomórkowych układach z *E.coli* antybiotyk ten stymuluje włączanie niektórych aminokwasów, np. cysteiny i tryptofanu, do białek (123). Zjawisko to wykazuje pewną analogię do efektu wywoływanego przez antybiotyki aminoglikozydowe.

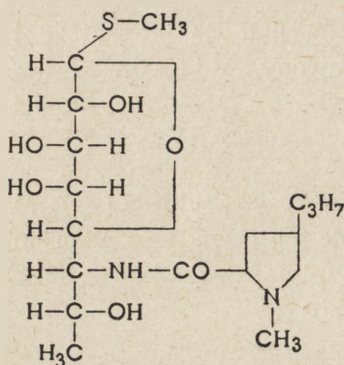
Antybiotyki tetracyklinowe wpływają pośrednio, poprzez zahamowanie biosyntezy, na powstanie w komórkach *E.coli* frakcji RNA sedymentującej wolniej niż kwas rybonukleinowy powstający w normalnych warunkach (59).

Erytromycyna (XIV) działa dużo silniej na mikroorganizmy gramodatnie niż na gramujemne. Zahamowanie biosyntezy białka i wzrostu w hodowli *E.coli* powoduje ona w stężeniu 1000 $\mu\text{g/ml}$, natomiast przerwanie wzrostu hodowli *Staphylococcus aureus* zachodzi już przy stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$ (5, 99). Stwierdzono przy tym, że hamując syntezę białka erytromycyna nie wpływa na syntezę kwasów nukleinowych (5). Prace przeprowadzone z bezkomórkowymi układami z *B.subtilis* i *E.coli* wykazały, że także *in vitro* erytromycyna jest inhibitorem biosyntezy białka (121, 136). Badając mechanizm działania antybiotyku stwierdzono, że erytro-



XIV
Erytromycyna

mycyna wiąże się z podjednostką 50S rybosomów szczepu wrażliwego *B. subtilis*; dużo słabiej wiąże się z rybosomami szczepu opornego (119). Taubman i wsp. (120) zdefiniowali działanie erytromycyny jako hamowanie zależnego od rybosomów przeniesienia zaktywowanego aminokwasu do miejsca tworzenia wiązania peptydowego na rybosomie.



XV
Linkomycyna

Linkomycyna (XV) hamuje syntezę białka oraz wzrost mikroorganizmów gramdodatnich (63). Gdy układ włączający zawiera rybosomy szczepu wrażliwego, 100—200 μg linkomycyny/ml drastycznie obniża włączanie fenyloalaniny do białka w obecności poliU (8). Wyniki doświadczeń z użyciem rybosomów rekonstruowanych wskazują, że miejscem działania antybiotyku jest podjednostka rybosomalna 50S (7). Stwierdzono przy tym kompetycję między erytromycyną i linkomycyną o miejsce na podjednostce 50S rybosomów *Bacillus stearothermophilus* (8).

Wyniki doświadczeń genetycznych Apiriona (2) sugerują istnienie na chromosomie *E. coli* wspólnego locus, kontrolującego białko rybosomalne wchodzące w skład tej części rybosomu, do której przyłączają się erytromycyna i linkomycyna. Mutacje w tym locus prowadzą do powstania mutantów wrażliwych na te antybiotyki.

Mechanizm działania i podstawowe cechy omówionych antybiotyków przedstawione są w tablicy 2.

LITERATURA

1. Anderson L. A., Smillie R. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 535 (1966).
2. Apirion D., *J. Mol. Biol.* **30**, 255 (1967).
3. Bretscher M. S., Marcker K. A., *Nature* **211**, 380 (1966).
4. Brock T. D., *Bacteriol. Rev.* **25**, 32 (1961).
5. Brock T. D., Brock M. L., *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 274 (1959).

Mechanizm działania na biosyntezę białka	Antybiotyk	Źródło	Ciężar cząsteczkowy lub wzór sumaryczny	Organizm na który działa	Najniższe stężenie hamujące wzrost <i>in vivo</i> $\mu\text{l/ml}$	Stężenie używane w badaniach <i>in vitro</i> $\mu\text{g/ml}$
Hamowanie przeniesienia zaktywowanego aminokwasu na rosnący polipeptyd	Botromycyna	<i>Streptomyces bottropensis</i>	743 ± 36	Mikroorganizmy		10—100
„	Cykloheksimid	<i>Streptomyces griseus</i> , <i>Streptomyces noursei</i> , <i>Streptomyces naraensis</i>	254 teoret. 281	Drożdże, Grzyby	0.17—10 0.08—> 1000	4—250
„	Enomycyna	<i>Streptomyces mauvecolor</i>	11 000	Nowotwory		1—100
„	Erytromycyna A	<i>Streptomyces erythreus</i>	744	Mikroorganizmy gramodatnie gramujemne Pierwotniaki	0.01—> 100 10—> 1000	0.1—10
„	Kwas fuzydowy	<i>Fusidium coccineum</i>	$\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_6$	Mikroorganizmy gramodatnie		10—1000
„	Kwas helwolowy	<i>Aspergillus fumigatus</i>	556—558	Mikroorganizmy	0.5—2000	200—1000
„	Kasugamycyna	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	453—460 (chlorowodorek)	Mikroorganizmy Grzyby	10—100 10—100	40—600
„	Linkomycyna	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	452	Mikroorganizmy gramodatnie	0.1—1.6	0.5—450
„	Nukleocydyna	<i>Streptomyces calvus</i>	$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{N}_6\text{S}$	Trypanosoma equiperdum		0.04—400
„	Tetracyklina	Uwodorowanie chlorotetracykliny	443	Mikroorganizmy	0.1—15	0.05—100
Hamowanie tworzenia pierwszego wiązania peptydowego	Sparsomycyna	<i>Streptomyces sparsogenes</i>	379	Mikroorganizmy Nowotwory Drożdże	10—50	0.05—5
Przedwczesne odłączenie polipeptydu	Amicetyna	<i>Streptomyces fasciculatus</i>	$\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_9\text{N}_6$	Grzyby Mikroorganizmy gramodatnie	0.4—6.2	25—200
„	Blastycydyna	<i>Streptomyces griseochromogenus</i>	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_6$	Mikroorganizmy Grzyby	5—> 100 5—> 100	do 10
„	Gugerotyna	<i>Streptomyces gougeroti</i>	589	Nowotwory Mikroorganizmy Drożdże Grzyby	200—800 500 500	25—200
„	Puromycyna	<i>Streptomyces albo-niger</i>	$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{N}_7$	Mikroorganizmy gramodatnie Nowotwory Pierwotniaki Rośliny Zwierzęta	10—100	0.05—400
Zmiana własności kodujących układu	Gentamycyna	<i>Micromonospora purpurea</i> <i>Micromonospora echinospora</i>		Mikroorganizmy		10—100
„	Hygromycyna	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	536 ± 25	Mikroorganizmy Promieniowce	0.5—> 200 6—> 100	
„	Kanamycyna A	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>		Mikroorganizmy	0.02—25	0.02—20
„	Neomycyna B	<i>Streptomyces fradiae</i>	$\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_{13}$	Mikroorganizmy Promieniowce Pierwotniaki	0.02—> 300 0.01—1000 2—3000	
„	Oksytetracyklina	<i>Streptomyces rimosus</i>	460	Mikroorganizmy	0.5—15	50
„	Paromomycyna	<i>Streptomyces rimosus forma paromomycinus</i>		Mikroorganizmy	1.2—3.7	
„	Streptomycyna	<i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces mashuensis</i>	691 (chlorowodorek)	Mikroorganizmy	0.1—4000	0.01—100
Hamowanie końcowych etapów biosyntezy białka	Chloramfenikol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cl}_2$	Mikroorganizmy Rośliny Synteza przeciwciał	0.2—5	30—500

6. Brownstein B., Lewandowski L. J., *J. Mol. Biol.* **25**, 99 (1967).
7. Chang F. N., Sih C. J., Weisblum B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 431 (1966).
8. Chang F. N., Weisblum B., *Biochemistry* **6**, 836 (1967).
9. Clark-Walker G. D., Linnane W. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 8 (1966).
10. Colombo B., Felicetti L., Baglioni C., *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 109 (1966).
11. Connamacher R. H., Mandel H. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 98 (1965).
12. Cooper D., Banthorpe D. V., Wilkie D., *J. Mol. Biol.* **26**, 347 (1967).
13. Coutsogeorgopoulos C., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 214 (1966).
14. Coutsogeorgopoulos C., *Biochemistry* **6**, 1704 (1967).
15. Coutsogeorgopoulos C., *Internatl. Congress of Chemotherapy, Wiedeń 1967, tom IV, str. 371.*
16. Cox E. C., White J. R., Flaks J. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 703 (1964).
17. Creaser E. H., *J. Gen. Microbiol.* **12**, 258 (1955).
18. Cruchoaud A., Coons A. H., *J. Exptl. Med.* **120**, 1061 (1964).
19. Das H. K., Goldstein A., Kanner L. C., *Mol. Pharmacol.* **2**, 158 (1966).
20. Davies J. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 659 (1964).
21. Davies J., Anderson P., Davies B. D., *Science* **149**, 1096 (1965).
22. Davies J., Gilbert W., Gorini L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **51**, 883 (1964).
23. Davies J., Gorini L., Davis B. D., *Mol. Pharmacol.* **1**, 93 (1965).
24. Day L. E., *J. Bacteriol.* **91**, 1917 (1966).
25. Day L. E., *J. Bacteriol.* **92**, 197 (1966).
26. Demerec M., *Carnegie Inst. Washington, Yearbook* **48**, 154 (1949).
27. DeMoss J. A., Novelli G. D., *Biochim. Biophys. Acta* **22**, 49 (1956).
28. Eisenstadt J. M., Brawerman G., *J. Mol. Biol.* **10**, 392 (1964).
29. Ennis H. L., Lubin M., *Federation Proc.* **23**, 169 (1964).
30. Ennis H. L., Lubin M., *Science* **146**, 1474 (1964).
31. Erdős T., Ullmann A., *Nature* **183**, 618 (1959).
32. Erdős T., Ullmann A., *Nature* **185**, 100 (1960).
33. Felicetti L., Colombo B., Baglioni C., *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 120 (1966).
34. Flaks J. G., Cox E. C., White J. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 385 (1962).
35. Flaks J. G., Cox E. C., Witting M. K., White J. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 390 (1962).
36. Flaks J. G., Leboy P. S., Birge E. A., Kurland C. G., *Cold Spring Harbor Symp.* **31**, 623 (1966).
37. Florini J. L., Bird H. H., Bell P. H., *J. Biol. Chem.* **241**, 109 (1966).
38. Frankland B., Smith H., *Planta* **77**, 354 (1967).
39. Fujisawa H., *Plant Cell Physiol.* **7**, 185 (1966).
40. Gale E. P., *Pharmacol. Rev.* **15**, 481 (1963).
41. Gale E. P., Folkes J. P., *Biochem. J.* **53**, 493 (1953).
42. Gale E. P., Paine T. F., *Biochem. J.*, **47**, 26 (1950).
43. Gale E. P., Paine T. F., *Biochem. J.* **53**, 298 (1953).
44. Gilbert W., *J. Mol. Biol.* **6**, 389 (1963).
45. Godchaux W., Herbert E., *J. Mol. Biol.* **21**, 537 (1966).
46. Goldberg J. H., Mitsugi K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 453 (1966).

47. Goldberg J. H., Mitsugi K., *Biochemistry* 6, 372 (1967).
48. Goldberg J. H., Mitsugi K., *Biochemistry* 6, 383 (1967).
49. Gorini L., Beckwith J. R., *Ann. Rev. Microbiol.* 20, 401 (1966).
50. Gorini L., Kataja E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 51, 487 (1964).
51. Gorini L., Rosset R., Zimmermann R. A., *Science* 157, 1314 (1967).
52. Greenberger N. J., *Nature* 214, 702 (1967).
53. Grollman A. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 56, 1867 (1966).
54. Hahn F. E., Wisseman C. L., Hopps H. E., *J. Bacteriol.* 67, 674 (1954).
55. Hershey J. W. B., Thach R. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 57, 759 (1967).
56. Hierowski M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 53, 594 (1965).
57. Holland J. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 50, 436 (1963).
58. Holland J. J., McCarthy B. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 54, 880 (1965).
59. Holmes J., Wild D. G., *Nature* 210, 1047 (1966).
60. Ikekawa T., Umezawa H., Iitaka Y., *J. Antibiotics (Tokyo)* 19A, 49 (1966).
61. Jardetzky O., *J. Biol. Chem.* 238, 2498 (1963).
62. Jayaraman J., Goldberg I. H., *Biochemistry* 7, 418 (1968).
63. Josten J. J., Allen P. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 14, 241 (1964).
64. Kabat M. A., Mayer M. M., *Experimental Immunochimistry*, C. C. Thomas Publ., 1964, New York, str. 22—24.
65. Kaji H., Kaji A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 54, 213 (1965).
66. Kaji H., Suzuka I., Kaji A., *J. Biol. Chem.* 241, 1251 (1966).
67. Kerridge J., *J. Gen. Microbiol.* 19, 497 (1958).
68. Khorana H. G., Büchi H., Ghosh H., Gupta N., Jacob T. M., Kössel H., Morgan R., Narang S. A., Ohtsuka E., Wells R. D., *Cold Spring Harbor Symp.* 31, 39 (1966).
69. van Knippenberg P. H., van Ravenswaay-Claasen J. C., Grijm-vos M., Veldstra H., Bosch L., *Biochim. Biophys. Acta* 95, 461 (1965).
70. Korzybski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kuryłowicz W., *Antibiotics*, Pergamon Press-PWN, 1967.
71. Krueger R. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 55, 1206 (1966).
72. Laskin A. J., Chan W. M., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, red. Sylvester J. C., Am. Soc. Microbiol. Ann. Arbor, 1965, str. 485.
73. Leboy P. S., Cox E. C., Flaks J. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 52, 1367 (1964).
74. Lee B. K., Wilkie D., *Genet. Res.* 6, 130 (1965).
75. Likover T. E., Kurland C. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 58, 2385 (1967).
76. Lin Y. C., Tanaka N., *J. Biochem. (Tokyo)* 63, 1 (1968).
77. Macdonald I. R., Bacon J. S. D., Vaughan D., Ellis R. J., *J. Exptl. Bot.* 17, 822 (1966).
78. Mager J., Benedict M., Artman M., *Biochim. Biophys. Acta* 62, 202 (1962).
79. Mahler H. R., Fraser D., *Advan. Virus Res.* 8, 63 (1961).
80. Masukawa H., Tanaka N., *J. Biochem. (Tokyo)* 62, 202 (1967).
81. Milanesi G., Ciferri O., *Biochemistry* 5, 3926 (1966).
82. Mizuno S., Nitta K., Umezawa H., *J. Biochem. (Tokyo)* 61, 373 (1967).
83. Mizuno S., Nitta K., Umezawa H., *J. Biochem. (Tokyo)* 61, 382 (1967).
84. Morgan C., Rosenkranz H. S., Carr H. S., Rose H. M., *J. Bacteriol.* 93, 1987 (1967).
85. Mueller G. C., Kajiwaru K., Stubblefield E., Rueckert R. R., *Cancer Res.* 22, 1084 (1962).
86. Nakada D., *J. Mol. Biol.* 12, 695 (1965).

87. Nakamura S., Tanaka N., Umezawa H., *J. Antibiotics (Tokyo)* **19A**, 10 (1966).
88. Nathans D., von Ehrenstein G., Monro R., Lipmann F., *Federation Proc.* **21**, 127 (1962).
89. Nathans D., Lipmann F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 497 (1961).
90. Nomura M., Watson J. D., *J. Mol. Biol.* **1**, 204 (1959).
91. Okamoto S., Suzuki Y., *Nature* **208**, 1301 (1965).
92. Okanishi M., Kondo S., Suzuki Y., Okamoto S., Umezawa H., *J. Antibiotics (Tokyo)* **20A**, 132 (1967).
93. Pestka S., *J. Biol. Chem.* **241**, 367 (1966).
94. Pestka S., Marshall R., Nirenberg M. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 639 (1965).
95. Rao S. S., Grollman A. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **29**, 696 (1967).
96. Powell W. F., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 969 (1962).
97. Rendi R., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **237**, 3711 (1962).
98. Sawada F., Suzuki K., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 160 (1964).
99. Sazykin Ju. O., Borisowa G. N., *Antibiotiki (Moskwa)* **7**, 975 (1962).
100. Scher S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 572 (1966).
101. Schwartz J. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 1133 (1965).
102. Siegel M. R., Sisler H. D., *Nature* **200**, 675 (1963).
103. Siegel M. R., Sisler H. D., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 83 (1964).
104. Siegel M. R., Sisler H. D., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 558 (1965).
105. Spencer D., *Arch. Biochem. Biophys.* **11**, 381 (1965).
106. Speyer J. F., Lengyel P., Basilio C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 684 (1962).
107. Spotts C. R., Stanier R. Y., *Nature* **192**, 633 (1961).
108. Studziński G. P., Jackson L. G., *Nature* **212**, 194 (1966).
109. Suarez G., Nathans D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 743 (1965).
110. Suhara Y., Ishizuka M., Naganawa H., Hosi M., Okami Y., Takeuchi T., Umezawa H., *J. Antibiotics (Tokyo)* **16A**, 107 (1963).
111. Suzuka I., Kaji H., Kaji A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 187 (1965).
112. Szakułow R. S., Bogdanow A. A., Spirin A. S., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **153**, 223 (1963).
113. Takeda Y., Hayashi S., Nakagawa H., Suzuki F., *J. Biochem. (Tokyo)* **48**, 169 (1960).
114. Talal N., Dubois Exum E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1288 (1966).
115. Tanaka N., Kinoshita T., Masukawa H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **30**, 278 (1968).
116. Tanaka N., Masukawa H., Umezawa H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 544 (1967).
117. Tanaka N., Sashikata K., Yamaguchi H., Umezawa H., *J. Biochem. (Tokyo)* **60**, 405 (1966).
118. Tanaka N., Yamaguchi H., Umezawa H., *J. Biochem. (Tokyo)* **60**, 429 (1966).
119. Taubman S. B., Jones N. R., Young F. E., Corcoran J. W., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 438 (1966).
120. Taubman S. B., So A. G., Young F. E., Davie E. W., Corcoran J. W., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Ann Arbor, Michigan, 1963, str. 395.
121. Taubman S. B., Young F. E., Corcoran J. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **50**, 955 (1963).

122. Traut R. R., Munro R. E., *J. Mol. Biol.* **10**, 63 (1964).
123. Turley R. H., Thomas P. E., Snell J. F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 460 (1967).
124. Umezawa H., Okanishi M., Utahara R., Maeda K., Kondo S., *J. Antibiotics (Tokyo)* **20A**, 136 (1967).
125. Vazquez D., *Nature* **203**, 257 (1964).
126. Vazquez D., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 277 (1966).
127. Vazquez D., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 289 (1966).
128. Vazquez D., *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **16**, 169 (1966).
129. Villa-Trevino S., Noll H., *J. Biol. Chem.* **239**, 3826 (1964).
130. Walton D. C., *Plant Physiol.* **41**, 298 (1966).
131. Weber M. J., DeMoss J. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1224 (1966).
132. Weisberger A. S., Wolfe S., Armentrout S., *J. Exptl. Med.* **120**, 161 (1964).
133. Weinstein J. B., Friedman S. M., Ochoa M. Jr., *Cold Spring Harbor Symp.* **31**, 671 (1966).
134. Wettstein F. O., Noll H., Penman S., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 525 (1964).
135. Widuczynski I., Stoppani A. O. M., *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 413 (1965).
136. Wolfe A. D., Hahn F. E., *Science* **143**, 1445 (1964).
137. Wolfe S. M., Weisberger A. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 991 (1965).
138. Yamaguchi H., Tanaka N., *Nature* **201**, 499 (1964).
139. Yamaguchi H., Yoshida Y., Tanaka N., *J. Biochem. (Tokyo)* **60**, 246 (1966).
140. Yamaki H., *J. Antibiotics (Tokyo)* **18**, 228 (1965).
141. Yarmolinsky M. B., de la Haba G. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **45**, 1721 (1959).
142. Young C. W., Robinson P. F., Sacktor B., *Biochem. Pharmacol.* **12**, 855 (1963).
143. Zamir A., Leder P., Elson D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **56**, 1794 (1966).

ALEKSANDRA PUTRAMENT*, ROMAN LORENC**

Mutanty oddechowe drożdży

Respiratory Yeast Mutants

Respiratory yeast mutants are reviewed. Variety of mutational blocks resulting in metabolic effects makes yeast a most useful tool in the studies of respiratory enzymes.

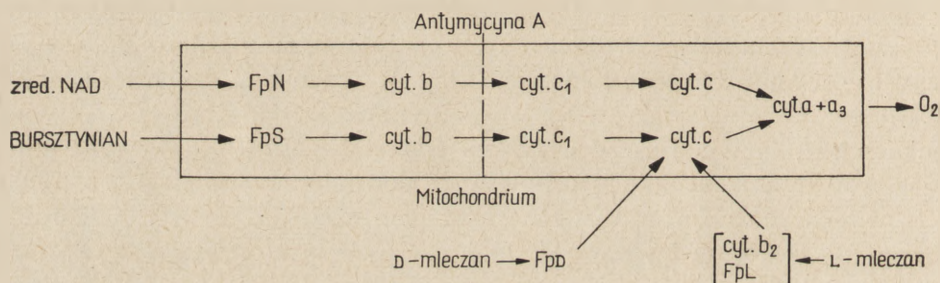
Komórki drożdży stanowią materiał szczególnie dogodny do badania biosyntezy enzymów łańcucha oddechowego. Wynika to z możliwości hodowania drożdży w warunkach zarówno tlenowych jak i beztlenowych, co wpływa na metabolizm drożdży i na układy enzymatyczne w nich występujące (10,65). Drożdże hodowane w warunkach tlenowych mają wykształcone mitochondria i pełny łańcuch enzymów oddechowych. W warunkach beztlenowych układ enzymów oddechowych drożdży zanika ulegając tzw. „rozmyciu” w ciągu kolejnych podziałów komórek (52, 65, 66). W fazie logarytmicznej wzrostu w warunkach ściśle beztlenowych drożdże zawierają cytochrom b_1 , w fazie stacjonarnej — tylko protoporfirynę (3). U takich drożdży indukcja tlenem, zwana „adaptacją tlenową” powoduje powstawanie struktur mitochondrialnych oraz brakujących enzymów łańcucha oddechowego (9, 10, 33, 34, 65, 77), czemu towarzyszy pojawienie się zdolności zużywania tlenu oraz metabolizowania nie podlegających fermentacji źródeł węgla jak mleczan, etanol, octan, glicerol. Występowanie mutantów oddechowych u drożdży stanowi dodatkowe udogodnienie przy badaniach biosyntezy enzymów oddechowych. Liczne dane (4, 21, 42, 43, 74) przemawiają za regulacją tej syntezy zarówno na szczeblu jądrowym jak i cytoplazmatycznym. Zastosowanie metod genetycznych umożliwia rozróżnienie mutantów obu klas. Pozwala to na selekcję i wybór mutantu nie tylko zawierającego poszczególne składniki łańcucha enzymów oddechowych w najdogodniejszych dla badań stosunkach ilościowych, lecz także odznaczającego się określonym sposobem regulacji biosyntezy tych składników.

* Doc. dr, Zakład Genetyki, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

** Dr, Zakład Biochemii, Studium Doskonalenia Lekarzy, Warszawa

I. Łańcuch oddechowy u drożdży

Łańcuch oddechowy u drożdży jest zlokalizowany w mitochondriach jak u organizmów wyższych i ma podobny skład enzymatyczny. Stosując sok trawienny z *Helix pomatia* do rozbijania ścian komórkowych drożdży otrzymano mitochondria o natywnej strukturze wykazujące znaczną fosforylację (26, 50, 51). U *Torulopsis* jedynymi stwierdzonymi różnicami w stosunku do mitochondriów organizmów wyżej uorganizowanych jest brak jednego z miejsc fosforylacji w łańcuchu oddechowym, co stanowi zresztą przedmiot dyskusji (55), oraz zdolność do utleniania zred. NAD, której nie mają nieuszkodzone mitochondria ssaków (51). Utlenianie zred. NAD przez mitochondria drożdży jest sprzęgnięte z fosforylacją i stymulowane przez związki rozprzegające fosforylację, jak 2,4-dwunitrofenol lub pentachlorofenol. Badania wyodrębnionych z komórek drożdży „cząstek oddechowych” (37, 39, 40, 53) wskazują na istnienie trzech niezależnych dróg przepływu elektronów w łańcuchu. Dwie z nich związane byłyby z dehydrogenazą bursztynianową i zred. NAD, trzecia zaś z utlenianiem D- i L-mleczanu (schemat 1).



Schemat 1. Łańcuch oddechowy u drożdży (wg 40)

FpN — oksydoreduktaza zred. NAD: akceptor; FpS — oksydoreduktaza bursztynian: akceptor; FpD — oksydoreduktaza D-mleczan: ferriocytochrom c; FpL — oksydoreduktaza L-mleczan: ferriocytochrom c

Mutanty oddechowe drożdży różnią się zawartością poszczególnych cytochromów, co uzależnione jest od typu mutacji, a w porównaniu ze szczepem dzikim zawierają mało flawin i koenzymu Q (38). Tak zwane „przyżyciowe” badanie widm charakterystycznych dla poszczególnych cytochromów w niskich temperaturach (19, 62) pozwala łatwo różnicować poszczególne mutanty. Yotsuyanagi (80, 81) porównywał w mikroskopie elektronowym struktury mitochondriów szczepu dzikiego drożdży hodowanego w warunkach tlenowych oraz mutantów: chromosomalnych, cytoplazmatycznych i podwójnych (ze zmutowanym zarówno genem chromosomalnym jak i czynnikiem cytoplazmatycznym). Okazało się, że w fazie logarytmicznej wzrostu szczepu dzikiego w warunkach tlenowych liczba mitochondriów była niewielka, a one same — słabo zorganizowane. Przejściu z fazy logarytmicznej do stacjonarnej towarzyszył

wzrost liczby mitochondriów oraz wystąpienie licznych dobrze zorganizowanych crist. U mutantów cytoplazmatycznych występowały zmienione morfologicznie mitochondria.

II. Adaptacja tlenowa drożdży

Proces adaptacji tlenowej podlega podwójnej regulacji — z jednej strony indukowany jest obecnością tlenu cząsteczkowego (69, 76), z drugiej podlega represji w zależności od stężenia glukozy (11, 16, 38, 52). Przebieg adaptacji zależy też od warunków hodowli i fazy wzrostowej zbieranych komórek drożdży oraz od składu środowiska adaptacyjnego (20, 76).

Mechanizm działania tlenu nie został dotychczas ustalony. Stwierdzono jednak wysoką specyficzność tlenu jako induktora (69).

Sułkowski, Słonimski i wsp. (17, 72) wykazali, że zarówno synteza białek w toku adaptacji, jak również sam proces adaptacji są hamowane przez światło widzialne. Hamowanie to jest najsilniej zaznaczone w ciągu dwóch pierwszych godzin po rozpoczęciu indukcji tlenem, przy czym drożdże zbierane w fazie stacjonarnej hodowli beztlenowej są mniej podatne na wpływ światła od zbieranych w fazie logarytmicznej. Przy przedłużonym naświetlaniu hamowanie jest nieodwracalne. Mechanizm ani miejsce działania światła nie są znane.

Nie rozstrzygnięto ostatecznie w jakim stopniu indukcja tlenowa enzymów oddechowych związana jest z ich syntezą *de novo* a w jakim z uczynieniem istniejących prekursorów. Za syntezą *de novo* przemawia hamujące działanie cykloheksimidu (12) i aktynomycyny D (35). Wśród indukowanych tlenem enzymów (tablica 1) szczególnie dokładnie przebadano oksydoreduktazę L-mleczan : cytochrom c i oksydoreduktazę D-mleczan : cytochrom c. Występująca u drożdży beztlenowych dehydrogenaza D (—) mleczanowa (47, 48, 68) nie redukuje cytochromu c, a jej aktywność ulega zanikowi w przebiegu adaptacji (48).

III. Podstawy genetyki drożdży

Materiał dziedziczny haploidalnych szczepów drożdży zawarty jest najprawdopodobniej w dwudziestu chromosomach (41). Każdy z chromosomów zawiera informację o innych cechach dziedzicznych, a więc u haploidów każdy gen reprezentowany jest w pojedynczej dawce.

Jeśli w odpowiednich warunkach zmieszać dwa szczepy haploidalne o przeciwstawnych typach koniugacyjnych a i α , następuje kopulacja (łącznie się parami a z α) komórek i wypączkowanie komórek diploidalnych. Nie wiadomo dokładnie, jaki jest udział cytoplazmy obu komórek haploidalnych w powstawaniu diploidu. Jądro diploidu zawiera komplety chromosomów obu komórek wyjściowych, ma więc 20 par chromosomów,

przy czym chromosomy homologiczne zawierają informację genetyczną dotyczącą tych samych białek. Na przykład szczep a ma w chromosomie III gen thr_3^* warunkujący sekwencję aminokwasów w aspartokinazie (5). Ponieważ szczep alfa ma w homologicznym chromosomie również ten sam gen, szczep diploidalny ma dwa geny warunkujące syntezę tego enzymu. Takie dwa geny nazywane są genami allelicznymi, lub allelami.

W diploidach można badać komplementację czyli uzupełnianie się poszczególnych mutantów. Założmy, że szczep a ma mutację ad_1 , w wyniku której jest niezdolny do syntetyzowania puryn i nagromadza różowy pigment (arylaminy). Szczep alfa ma mutację ad_2 o takich samych cechach. Gdyby mutacje ad_1 i ad_2 były alleliczne, wówczas w diploidzie komplementacja nie nastąpiłaby: nie byłby on zdolny do syntezy puryn i nagromadziłby arylaminy. Jeżeli jednak mutacje ad_1 i ad_2 nie są alleliczne, powstaje diploid syntetyzujący puryny a nie nagromadzający arylamin. Funkcję zablokowaną przez mutację ad_1 spełnia bowiem jego nie zmutowany allel (oznaczany symbolem AD_1 lub ad_1^+) ze szczepu alfa, funkcję zaś zablokowaną przez mutację ad_2 spełnia nie zmutowany gen alleliczny wprowadzony przez szczep a.

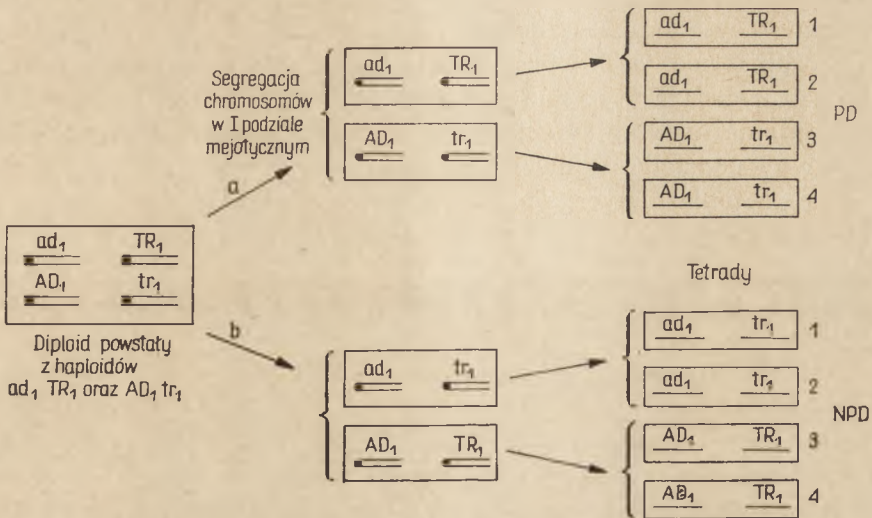
Nowe mutanty otrzymuje się ze szczepów haploidalnych. Dla określenia, czy mutacja jest dominująca w stosunku do allelu dzikiego typu otrzymuje się diploid, który w jednym z homologicznych chromosomów ma ową mutację, w drugim zaś — allel dzikiego typu. Jeśli diploid zachowuje się jak szczep dzikiego typu, określa się mutację jako recesywną, jeśli natomiast zachowuje się jak mutant, mutację uznaje się za dominującą. W praktyce bodaj wszystkie mutacje prowadzące do utraty aktywności jakiegoś enzymu są recesywne: zmutowany gen ma uszkodzony kod na dany polipeptyd, zaś jego allel nie uszkodzony przez mutację funkcjonuje normalnie. W niektórych jednak przypadkach geny zmutowane dominują nad swymi allelami dzikiego typu. Przykładem takiej mutacji u drożdży może być oporność na miedź — mutacja CU_1 (14). Chemiczny mechanizm tej oporności nie jest znany.

Komórki diploidalne drożdży umieszczone na specjalnej pożywce przechodzą mejozę (sporulacja). Każda wyjściowa komórka diploidalna wytwarza cztery haploidalne askospory (tetrady). Mejotyczną segregację genów znajdujących się w różnych chromosomach przedstawia schemat 2.

Dla dalszych rozważań istotne jest, że w przypadku, gdy dwa geny znajdują się w chromosomach homologicznych, segregacja typu rodzicielskiego (PD) i nierodzicielskiego (NPD) jest jednakowo częsta. Jeśli natomiast dwa geny znajdują się w tym samym chromosomie dostatecznie

* Mutanty jądrowe drożdży oznaczane są zazwyczaj skrótami nazw określających fenotyp danego mutantu i kolejnymi numerami: thr oznacza mutantu niezdolnego do syntezy treoniny, cyfra 3 zaś — trzeci zidentyfikowany gen warunkujący syntezę treoniny. Dla odróżnienia poszczególnych mutantów tego samego genu, a więc mutantów allelicznych dopisuje się kreskę i drugą cyfrę: thr_{3-1} , thr_{3-2} itd.

blisko siebie (czyli są sprzężone), wówczas segregacja typu PD będzie o wiele częstsza niż typu NPD. Na tej podstawie można już po przeanalizowaniu niewielu tetrad określić, czy dwa geny są sprzężone czy nie.



Schemat 2. Segregacja par alleli $ad_1 - AD_1$ i $tr_1 - TR_1$ w trakcie podziału mejotycznego

W pierwszym podziale mejotycznym rozdzielają się chromosomy homologiczne. Możliwe są dwie ewentualności: a) chromosom z genem ad_1 segreguje razem z chromosomem mającym allel TR_1 , AD_1 zaś — razem z tr_1 . W drugim podziale mejotycznym rozdzielają się chromatydy każdego z chromosomów. W wyniku jedna para spor w tetradzie ma genotypy takie jak rodzic $ad_1 TR_1$, druga zaś — jak rodzic $AD_1 tr_1$; spory odpowiadają dwu typom rodzicielskim (ang. *parental ditype*, PD). b) Chromosom z genem ad_1 segreguje razem z chromosomem mającym allel tr_1 , AD_1 zaś — razem z TR_1 . Prowadzi to — po drugim podziale mejotycznym — do powstania dwu par spor o nie rodzicielskim układzie alleli (ang. *non-parental ditype*, NPD)

IV. Mutanty oddechowe *Saccharomyces cerevisiae*

Pierwsze mutanty oddechowe wykryto w hodowlach drożdży na pożywkę zawierającej 0,1% glukozy i 2% glicerolu (7, 9, 61). Taka pożywka zapewnia normalny wzrost szczepu dzikiego. Natomiast mutanty o uszkodzonym układzie enzymów oddechowych nie mogą wykorzystywać węgla ze związków nie ulegających fermentacji, a niskie stężenie glukozy w podłożu powoduje, że tworzą one małe, wolno rosnące kolonie. Stąd pochodzi pierwotna nazwa tej grupy mutantów — małe (franc. *petite*). W latach późniejszych, stosując inne metody izolowania wykryto nowe typy mutantów oddechowych drożdży.

Obecnie można je sklasyfikować w następujący sposób:

1. Mutanty jądrowe.

a) Małe, oznaczane najczęściej symbolem p i kolejnymi numerami (także ly_6 i ly_8), oraz ich allele dzikiego typu P. Nie rosną, lub rosną bardzo słabo na nie ulegających fermentacji źródłach węgla. Nie pobierają lub pobierają mało tlenu.

b) Mutant op_1 .

- c) Mutanty cy mają bardzo obniżoną zawartość cytochromu c. Większość z nich pobiera tlen i słabo rośnie na nie ulegających fermentacji źródłach węgla.
- d) Mutant cyt.
2. Mutanty cytoplazmatyczne ro^- (typ standardowy — ro^+) są zdolne tylko do fermentacji. Nie pobierają tlenu. Jest to najczęściej występujący u drożdży typ mutantów oddechowych; często nazywa się je mutantami małymi cytoplazmatycznymi. Można je w sposób dość umowny podzielić na dwie podgrupy:
- a) ro^-_a cytoplazmatyczne mutanty neutralne, oraz
- b) ro^-_s cytoplazmatyczne mutanty supresyjne.

1a. Mutanty jądrowe typu p

Pierwsze mutanty tego typu opisali Sherman (59), Sherman i Słoniński (62) oraz Mounolou i wsp. (43). Mutanty p zachowują się jak recesywne: łącząc się ze szczepem standardowym P dają diploidy normalnie rosnące na glicerolu i oddychające. Po sporulacji otrzymuje się tetrady zawierające dwie spory z mutantem p i dwie spory P. Olbrzymia większość mutantów p okazała się niealleliczna: diploidy powstałe z połączenia dwóch różnych zmutowanych szczepów np. p_1 i p_7 zachowują się jak szczepy standardowe pod względem wzrostu na glicerolu i zdolności zużywania tlenu. Mutanty p_1 i p_7 wykazują zatem komplementację. Krzyżówki między różnymi mutantami p nie były, jak się wydaje, dokładniej badane, lecz nieliczne zebrane dotychczas dane wskazują na niezależną segregację par różnych mutantów (ilość tetrad PD = = NPD). Żadne dane nie wskazują na zgrupowanie tych genów w superjednostki typu operonów.

Wspólną cechą mutantów p jest brak cytochromów $a+a_3$, nieco podwyższony poziom cytochromu c, niepobieranie lub pobieranie tylko bardzo małych ilości tlenu oraz zdolność do wzrostu tylko na ulegających fermentacji źródłach węgla. Mutanty p_6 i p_7 nie mają również cytochromu b, który występuje w normalnej ilości u mutantu p_5 . Mutant p_4 w przeciwieństwie do pozostałych pobiera małe ilości tlenu, ma bardzo niski poziom cytochromów $a+a_3$ i b, nie rośnie na źródłach węgla ulegających fermentacji. Spektrum cytochromowego mutantów p_1 i p_3 nie udało się określić, ponieważ szczepy z tymi mutacjami zawierają bardzo duży procent komórek o zmienionym czynniku cytoplazmatycznym, które są zawsze pozbawione cytochromów $a+a_3$ oraz b.

Mutantów oznaczone symbolami ly_6 i ly_8 nie są zdolne do oddychania, a ponadto nie syntetyzują lizyny. Według O g u r a i wsp. (49) wymagają one do wzrostu także kwasu glutaminowego, o czym Sherman i Słoniński (62) nie wspominają. Oba te mutanty mają również zmutowany czynnik cytoplazmatyczny. Sherman i Słoniński (62) podkreśl-

lali, że mutanty p i ly nie mają cytochromów ściśle związanych ze strukturą mitochondrium, mają zaś w nadmiarze luźno z tą strukturą związany cytochrom c.

Dalszych informacji o mutantach typu p dostarczyli Lachowicz i wsp. (31, 32 oraz informacje ustne). Wyizolowali oni około 40 mutantów oddechowych, z których tylko nieliczne okazały się alleliczne w stosunku do już znanych. Spośród mutantów dokładniej zbadanych dwanaście nie zawiera cytochromów $a+a_3$ oraz b (jak p_6 i p_7), a sześć mutantów nie posiada cytochromów $a+a_3$ (jak p_5). Wszystkie wykazują podobny poziom cytochromu c. Poza tym jeden z mutantów nie ma tylko cytochromu b, jeden zaś mutant nie ma cytochromów $a+a_3$ oraz c, ma natomiast cytochrom b, jest więc zasadniczo odmienny od pozostałych.

Obecnie znamy już około trzydziestu genów jądrowych, związanych z procesem oddychania. Mutacja w jednym z nich wystarcza do całkowitego lub prawie całkowitego zablokowania procesu oddychania. Efekty fenotypowe każdej z tych mutacji są zbliżone do siebie, a czasem nieodróżnialne dostępnymi metodami badawczymi. Na podstawie bardzo małej ilości mutacji allelicznych można przypuszczać, że ogólna ilość genów, których funkcje związane są w jakiś sposób z łańcuchem oddechowym, jest bardzo duża.

Dotychczas nie udało się powiązać żadnej mutacji należącej do tej grupy z brakiem lub zmianą budowy jednego ściśle określonego polipeptydu. Bez dalszych badań byłoby ryzykowne zakładanie, że otrzymany przez zespół Lachowicza mutant pozbawiony jedynie cytochromu b ma zmutowany gen warunkujący strukturę części białkowej tego cytochromu.

W populacji mutantów p powstają samorzutnie rewertanty normalnie oddychające i rosnące na nie ulegających fermentacji źródłach węgla. Szybkie nagromadzenie się rewertantów często utrudnia analizę genetyczną mutantów p (Lachowicz i Kotylak, informacja ustna). Można przypuszczać, że szczepy normalnie oddychające mają przewagę selektywną nad tymi, które zdolne są jedynie do fermentacji.

1b. Mutant op_1

Podobnie jak dla innych mutantów oddechowych głównym źródłem energii dla tego mutantu jest fermentacja glukozy. Jednakże mutant op_1 zużywa tyle tlenu ile szczep dziki, choć nie wykorzystuje źródeł węgla nie ulegających fermentacji. Analiza genetyczna wykazała, że jest to pojedyncza mutacja typu jądrowego (28, 31). Wyodrębnione mitochondria mutantu (27) wykazują zmniejszoną zdolność do fosforylacji w porównaniu z mitochondriami szczepu dzikiego. Typowe związki rozprzegające fosforylację np. dwunitrofenol zwiększają zużycie tlenu. Można stąd wnosić, że dotknięte mutacją miejsce nie jest związane ze sprzężeniem fosforylacji z oddychaniem lecz z którymś z dalszych etapów fosforylacji. Ten tok rozumowania wydają się potwierdzać wyniki badań nad aktyw-

nością ATPazową mitochondriów szczepu dzikiego, mutantu op_1 i jednego z mutantów cytoplazmatycznych (26, 27, 28, 29). U szczepu dzikiego *S.cerevisiae* we frakcji mitochondrialnej występuje ATPaza o dwóch optimach działania: przy pH 6,2 oraz pH 9,5. Aktywność jej zwiększają jony Mg^{2+} . Azydek oraz oligomycyna silnie hamują aktywność przy pH 9,5 a nie wywierają wpływu na aktywność przy pH 6,2. Nie jest wykluczone, że są to dwa różne enzymy. Mutant op_1 wykazuje wyraźnie mniejszą aktywność ATPazy o optimum pH 9,5 w porównaniu ze szczepem dzikim, natomiast aktywność enzymu działającego przy pH 6,2 i wrażliwość na inhibitory jest taka sama. Ponadto u mutantu op_1 występuje mniejsza ilość cytochromu a. Fakt ten oraz niskie wartości stosunku P/O przy utlenianiu ketoglutaranu świadczą o złożonym charakterze mutacji. U jednego z mutantów cytoplazmatycznych *S.cerevisiae* ATPaza w mitochondriach wykazuje również dwa optima działania przy różnych pH . W tym przypadku jednak w przeciwieństwie do mitochondriów szczepu dzikiego działanie enzymu przy pH 9,5 nie było hamowane przez oligomycynę (29).

1c. Mutanty cy

W komórkach dzikiego szczepu *S.cerevisiae* stwierdzono obecność dwóch rodzajów cytochromu c, różniących się strukturą pierwszorzędową (15, 57). Cytochromy te nazwano izo-1 cytochrom c i izo-2 cytochrom c. Ilość izo-1 cytochromu c w hodowanych tlenowo drożdżach sięga 92% całkowitej ilości cytochromu c. Oba izocytochromy c można rozdzielić za pomocą chromatografii na wymienniczkach kationowych (56, 64) i elektroforezy. Struktura pierwszorzędowa izo-1 cytochromu c okazała się identyczna ze strukturą drożdżowego cytochromu c ustaloną przez N a r i t e i wsp. (46) (cytowane za 63). Natomiast struktura pierwszorzędowa izo-2 cytochromu c nie została dotychczas określona. Odrębność obu izocytochromów potwierdziła analiza składu aminokwasowego metodą elektrochromatografii (ang. *finger print*) i sekwencji aminokwasowej polipeptydu związanego z pierścieniem hemowym (71).

Mutanty cy wyselekcjonowano na podstawie badania widma absorpcji charakterystycznego dla poszczególnych cytochromów w temperaturze -190° (19, 62). Mutanty te wykazują mniej wyraźne pasma absorpcji charakterystyczne dla cytochromu c lub nie wykazują ich wcale. W niektórych przypadkach ilość cytochromu c jest proporcjonalnie mniejsza niż cytochromu b w porównaniu ze szczepem standardowym. S h e r m a n (60) wykazał, że wszystkie mutanty cy segregują w krzyżówkach w sposób charakterystyczny dla mutantów jądrowych. Zidentyfikował on sześć różnych, niesprzężonych genów cy. Mutacje w genach cy_1 , cy_2 , cy_3 , cy_4 prowadzą do utraty zdolności do wzrostu na mleczanach, jakkolwiek mutanty te mogą rosnąć na glicerolu jako źródle węgla. Mutant cy_5 rośnie bardzo słabo zarówno na mleczanie jak i na glicerolu. Mutant cy_6 ma

znacznie mniejszą ilość cytochromu c i rośnie zarówno na mleczanie jak i na glicerolu.

Najdokładniej zbadano alleliczne, tzn, niekomplementujące mutanty cy_{1-1} i cy_{1-2} (60, 63). Nie zawierają one wcale izo-1 cytochromu c, zaś ilość izo-2 cytochromu c jest taka jak w szczepie dzikim. Wysiewając mutanty cy_{1-2} na mleczanie jako na jedynym źródle węgla wyselekcjonowano rewertanty o normalnej ilości izo-1 cytochromu c. Różnica między jednym z tych rewertantów cy_{1-2A} a szczepem standardowym polega na zastąpieniu kwasu glutaminowego tyrozyną w peptydzie łączącym się z hemem (63). Pierwotna więc mutacja mogłaby dotyczyć zmiany trypletu $GAA \rightarrow UAA$ lub $GAG \rightarrow UAG$ (GAA i GAG kodują kwas glutaminowy, UAA i UAG zaś kodują przerwanie syntezy łańcucha polipeptydowego), a rewersja — zmiany któregoś z trypletów „nonsensownych” na tryplet UAU lub UAC (oba kodują tyrozynę). Zachowanie się rewertanta cy_{1-2A} w krzyżówkach potwierdza, że cy_1 jest genem jądrowym, a badana rewersja polega rzeczywiście na zmianie w tym genie. Pozwala to sądzić, że gen cy_1 jest genem strukturalnym izo-1 cytochromu c z lokalizacją w jądrowym DNA.

Zidentyfikowanie mutantów cy_1 pozwoliło wyjaśnić, dlaczego przy przeniesieniu kultury beztlenowej drożdży do warunków tlenowych synteza izo-2 cytochromu c rozpoczyna się wcześniej i początkowo nagromadza się go więcej niż izo-1 cytochromu c, a później dopiero zachodzi szybka synteza izo-1 cytochromu c. Ostatecznie w fazie stacjonarnej kultury drożdży w warunkach tlenowych jest 92% izo-1 cytochromu c i zaledwie 8% izo-2 cytochromu c. Słoniński i wsp. (67) przypuszczają, że izo-2 cytochrom c spełnia rolę regulatora biosyntezy izo-1 cytochromu c. W drożdżach hodowanych beztlenowo występowałby białkowy prekursor o funkcjach represorowych w stosunku do cytochromu c. W obecności tlenu po dołączeniu pierścienia hemowego do tego prekursora powstawałby izo-2 cytochrom c, co powodowałoby derepresję syntezy izo-1 cytochromu c. Hipotezę tę potwierdza fakt, że przy indukcji tlenem drożdży z hodowli beztlenowej stopień włączania znakowanych aminokwasów do izo-2 cytochromu c jest o 30—40% niższy niż do izo-1 cytochromu c (13, 15). Syntezę obu izocytochromów można zahamować dodając do środowiska adaptacyjnego 5-metylotryptofan, przy czym silniej zahamowana jest synteza izo-1 cytochromu c. Mutanty auksotroficzne, wymagające do wzrostu tyrozyny i fenyloalaniny, przy ograniczonych ilościach tych aminokwasów nie syntetyzują izo-1 cytochromu c, natomiast izo-2 cytochrom c pozostaje w nich nadal. Cykloheksimid działając na komórki drożdży w czasie adaptacji tlenowej hamuje całkowicie syntezę enzymów oddechowych (12). Nawet przy wysokim stężeniu tego antymetabolitu synteza izo-1 cytochromu c jest hamowana całkowicie, natomiast synteza izo-2 cytochromu c jedynie w 30—40%. Badania kinetyki indukowanej tlenem syntezy obu izocytochromów wykazały, że ilość

izo-2 cytochromu c zwiększa się szybko i niezależnie od obecności cykloheksimidu w ciągu pierwszej godziny adaptacji tlenowej, zaś ilość izo-1 cytochromu c zaczyna wzrastać dopiero po osiągnięciu przez izo-2 cytochrom c stałego poziomu (56).

1d. Mutant „cyt”

Mutant „cyt”, wykryty przez Gunge i wsp. (18), hodowany w temperaturze 25° zawiera wszystkie cytochromy, natomiast w wyższych temperaturach synteza cytochromów jest zahamowana i nagromadzają się koproporfiryny. Pomimo braku układu cytochromowego, mutant ten wykazuje nikły wzrost na podłożu zawierającym mleczan jako jedyne źródło węgla. Autorzy sądzą, że mutacja ta polega na występowaniu u mutantu termolabilnej dekarboksylazy koproporfirynogenowej. W niższej temperaturze enzym ten działa prawie normalnie przekształcając koproporfinę w protoporfirynę, natomiast podniesienie temperatury powoduje jego całkowitą inaktywację.

2. Mutanty cytoplazmatyczne ro^-

Wszystkie zbadane dotąd mutanty cytoplazmatyczne *S.cerevisiae* pozbawione są cytochromów $a+a_3$ oraz b i mają zwiększoną zawartość cytochromu c . Są więc pod tym względem zbliżone do najliczniejszej grupy mutantów jądrowych p . Natomiast w przeciwieństwie do mutantów jądrowych mutanty ro^- nie są zdolne do rewersji (43).

2a. Mutanty ro_n^-

Zachowują się w krzyżówkach w sposób charakterystyczny dla pozajądrowych (cytoplazmatycznych) czynników dziedzicznych (59, 62). Niektóre z tych mutantów po skrzyżowaniu ze szczepami standardowymi dają diploidy standardowe, a po mejozie wszystkie spory są również typu standardowego. Mutanty te nazwano cytoplazmatycznymi mutantami neutralnymi i oznaczono symbolem ro . Niezależnie otrzymane mutanty ro_n^- nie wykazują komplementacji, gdyż po skrzyżowaniu dają małe diploidy nie zdolne do sporulacji. W krzyżówkach między mutantami cytoplazmatycznymi ro_n^- i mutantami jądrowymi p , otrzymuje się diploidy typu standardowego, a po mejozie połowa spor w tetradach jest typu standardowego, połowa zaś ma mutację p . Zatem mutacje ro_n^- „gubią się” w procesie krzyżowania.

Szczegółowe badania wykazały jednak, że takie mutanty jądrowe jak p_3 , ly_6 i ly_8 w krzyżówkach z ro_n^- dają wyłącznie diploidy małe, a mutant p_1 — do kilkudziesięciu procent diploidów małych. Wyniki wielokrotnego powtarzania tego rodzaju krzyżówek z udziałem różnych mutantów p wskazują, że niektórym mutacjom typu p towarzyszą mutacje cytoplazmatyczne. Można przypuszczać, że normalne funkcjonowanie niektórych

genów jądrowych jest niezbędne do normalnego funkcjonowania czynnika (czynników ?) cytoplazmatycznego. Mutacje zaś w innych genach jądrowych powodują zwiększenie częstości mutacji cytoplazmatycznych.

2b. Mutanty ro^-

Inna grupa mutantów małych, nazwanych mutantami cytoplazmatycznymi supresyjnymi, ro^- jest przedmiotem nieukończonych jeszcze, wieloletnich badań Ephrussi'ego i wsp. (6, 7, 8, 9, 61). Mutanty te po skrzyżowaniu ze szczepem standardowym dają zygoty, które normalnie przechodzą mejozę, jeśli są umieszczone na podłożu sporulacyjnym bezpośrednio po diploidyzacji. Niemniej wszystkie lub prawie wszystkie otrzymane z nich spory są mutantami ro^- . Jeśli natomiast zygoty są przez pewien czas rozmnażane wegetatywnie, to otrzymuje się trzy typy kolonii diploidalnych: małe, nie barwiące się chlorkiem tetrazolu, duże typu standardowego, oraz kilka rodzajów kolonii mieszanych złożonych z komórek nie barwiących się, dobrze barwiących się i pośrednich. Ilość tych trzech typów kolonii może być różna, ale jest ona mniej więcej stała dla danego mutantu. Ephrussi uważa, że po połączeniu się cytoplazmy normalnej i cytoplazmy z mutantów ro^- następuje przejściowy okres równowagi chwiejnej, w ciągu którego czynniki środowiskowe mogą modyfikować procent kolonii małych: podłoże zawierające octan sodu sprzyja zwiększeniu ilości dużych kolonii, a temperatura suboptymalna (18°C) — małych kolonii. Zygoty powstające z drożdży standardowych, hodowanych beztlenowo i mutantów ro^- zdolne są do wytworzenia enzymów łańcucha oddechowego i pobierania tlenu. Prawdopodobnie zatem czynnik supresyjny nie niszczy układu enzymów oddechowych, a tylko w jakiś sposób przeszkadza powstawaniu normalnych mitochondriów. W przejściowym okresie równowagi istnieje więc konkurencja między namnażaniem się mitochondriów normalnych i zmutowanych. Okres ten w ciągu którego „wahają się losy” obu typów mitochondriów jest dość długi.

Mutacje cytoplazmatyczne zachodzą u drożdży na innej zasadzie niż mutacje jądrowe. Logicznemu przypuszczeniu Wierzbickiego i Bartkowiaka (78), że pozajądrowe czynniki genetyczne mogą zwiększać oporność komórek na przypadkowe działanie mutagenów, przeczą wyniki badań nad drożdżami. Mutacje jądrowe zachodzą u drożdży rzadko. Nawet przy indukowaniu najskuteczniejszymi mutagenami częstość mutacji p i cy w pojedynczym genie mierzona jest ułamkami procentów. W przeciwieństwie do tego częstość spontanicznych mutacji cytoplazmatycznych u drożdży jest rzędu jednego, a u niektórych szczepów nawet kilku procent. Euflawina lub akryflawina w stężeniu 1×10^{-6} M wywołują u drożdży mutacje, które praktycznie w 100% są typu ro^- (7, 36, 74), podczas gdy mutagenność tych związków w stosunku do genów jądrowych (poza bakteriofagami) nie została udowodniona. Sherman

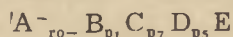
(60) indukując ultrafioletem mutanty typu cy otrzymywał do 50% kolonii małych, wśród których przytłaczającą większość stanowiły mutanty ro^- , a nie więcej niż 2% kolonie o zmienionym spektrum cytochromu c, jakkolwiek mutacja w którymkolwiek z co najmniej sześciu różnych genów jądrowych prowadzi do mutacji cy. Analogiczne wyniki co do częstości indukowanych ultrafioletem mutacji ro^- otrzymali S a r a c h e k i B i s h (54).

IV. Komplementacja między mutantami p i ro^- a pobieranie tlenu

J a k o b (24) określała po jakim czasie od powstania zygoty z różnych mutantów p i ro^- wykazują one zdolność do oddychania (oba haploidy rodzicielskie nie są zdolne do oddychania, ale w wyniku komplementacji diploid powinien zachowywać się jak typ standardowy). Oddychanie mierzone zużyciem tlenu w aparacie Warburga w pożywce bez źródła azotu i z etanolem jako źródłem węgla.

Drożdże standardowe hodowane przez 20 pokoleń beztlenowo uzyskują zdolność do oddychania dopiero po dwu godzinach przebywania w warunkach tlenowych, na pożywce z cukrem, a maksymalne zużywanie tlenu wynosi 250 μ l na godzinę, na 10^8 komórek (dokładniej: jednostek zdolnych do utworzenia kolonii, ang. *colony forming units*). Zygotom $p_5 \times p_1$ oraz $p_5 \times p_7$ wystarczyło pół godziny przebywania na podłożu z cukrem, by osiągnąć takie zużycie tlenu. Podobnie zachowywały się zygoty $p_5ro^+ \times Pro^-$. Natomiast zygoty $p_1ro^+ \times Pro^-$ nie były zdolne do oddychania przez 1,5 godziny.

Zygoty $p_5ro^+ \times p_7ro^-$ a także $p_5ro^+ \times p_1ro^-$ wykazywały zdolność do oddychania po półgodzinnym przebywaniu na podłożu z cukrem. Natomiast zygoty $p_5ro^- \times p_7ro^+$ osiągały poziom 250 μ l O_2 dopiero po siedmiodzinnym przebywaniu na glukozie, a zygoty $p_5ro^- \times p_1ro^+$ aż po ośmiu godzinach. Na tej podstawie Jakob przypuszcza, że odtworzenie aparatu oddechowego zachodzi w następujących etapach:



Mutacje ro^- blokują etap najwcześniejszy, p_5 zaś — najpóźniejszy. Gdy obie mutacje występują w tym samym haploidzie wyjściowym, z jakichś powodów przedłuża się okres, w ciągu którego zygota odbudowuje swój aparat oddechowy.

Jednakże K o n i e c z n a i L a c h o w i c z (25) stwierdzili, że zygota powstała w wyniku skrzyżowania mutantu p ze szczepem standardowym nie jest zdolna przez jakiś czas do wzrostu na glicerolu. Wskazuje to, iż nie może ona normalnie oddychać jakkolwiek mutanty p są recesywne. Autorzy wysunęli alternatywną hipotezę, że mutanty oddechowe p mają w cytoplazmie inhibitor uniemożliwiający przez jakiś czas normalne oddychanie.

Bardzo interesującą jest obserwacja J a k o b (24), że po okresie

przejęciowym omawiane zygoty zaczynają zużywać znacznie więcej tlenu niż szczep kontrolny dziki. Na przykład po 10—11 godzinach od skrzyżowania zygoty $p_5ro^+ \times Pro^-$ zużywają cztery razy więcej tlenu niż kontrola, następnie zaś zużycie tlenu maleje i po 22 godzinach od skrzyżowania powraca do normy. Zygoty $p_7ro^+ \times Pro^-$ osiągały maksymalne zużycie tlenu po 12 godzinach, ale w ciągu następnych 12 godzin było ono nadal wyższe niż w kontroli. Należy zaznaczyć, że okres 24 godzin odpowiada mniej więcej 12 pokoleniom komórkowym. Podobnie zachowywały się wszystkie badane przez autorkę zygoty. Pobieranie tlenu i spalanie substratu normalnie podlega zatem jakiemuś systemowi regulacyjnemu, który nie funkcjonuje u zygot powstałych z połączenia mutantów oddechowych i jest odbudowywany bardzo powoli.

U krzyżówek $p_5ro^+ \times Pro^-$ wykazano (57, 58), że wzrastające wartości zużycia tlenu związane są z syntezą *de novo* oksydazy cytochromowej. Synteza ta ulegała zahamowaniu pod wpływem cykloheksimidu.

V. Mitochondrialny DNA a mutanty oddechowe

Zagadnienie obecności kwasów nukleinowych w mitochondriach, jak i biosynteza białka w tych organellach omawiane było w dwóch artykułach w *Postęпах Biochemii* (75, 78). Również w mitochondriach drożdży wykazano zarówno obecność DNA (42, 43, 44, 73) jak i polimerazy DNA (79). Według Mounolou i wsp. (42) DNA mitochondriów drożdży stanowi od 10—14% całego DNA komórki. Tewari i wsp. (73) wykazali, że własności fizyczne DNA jądrowego i mitochondrialnego różnią się. Obie frakcje można rozdzielić drogą ultrawierowania w gradiencie chlorku cezu. Frakcja mitochondrialna składa się z dwóch podfrakcji, co stwierdzono badając gęstość pozorną DNA i zależność absorpcji w ultrafiolecie od temperatury. Potwierdzają to Moustacchi i Williamson (44), którzy stwierdzili w komórkach drożdży obecność trzech rodzajów DNA o gęstości pozornej 1,699 g/cm³, 1,706 g/cm³ i 1,683 g/cm³. Pierwsza z tych wartości odpowiadałaby DNA jądrowemu, trzecia — DNA mitochondrialnemu. Autorzy ci wykazali ponadto, że hodowanie drożdży w różnych warunkach fizjologicznych a także indukowanie akryflawiną mutacji cytoplazmatycznych zmienia jedynie ilość DNA przypisywanego mitochondriom, a nie wpływa na dwa pozostałe rodzaje DNA. Podobne wyniki otrzymali Mounolou, Jakob i Słonimski (42, 43). Badali oni DNA z mutantów oddechowych jądrowych oraz cytoplazmatycznych: neutralnych i supresyjnych (por. tabl. 2). Frakcje DNA otrzymane ze szczepu dzikiego nie różnią się swoimi właściwościami od DNA z mutantów jądrowych. Wartości gęstości pozornej wynosiły 1,701 g/cm³ dla DNA jądrowego; 1,705 g/cm³ dla jednej z pozostałych dwóch frakcji pozajądrowych i 1,687 g/cm³ dla frakcji odpowiadającej DNA mitochondrialnemu

(tablica 2). Natomiast u mutantów cytoplazmatycznych gęstość pozorna DNA cytoplazmatycznego jest inna: u mutantu neutralnego wynosi ona $1,683 \text{ g/cm}^3$, a u mutantu supresyjnego wzrasta do $1,695 \text{ g/cm}^3$. W związku z tym nasuwa się pytanie czy rzeczywiście w DNA mitochondrialnym jest zakodowana informacja o pierwszorzędowej strukturze ich białek. Z wartości obliczonego ciężaru cząsteczkowego znajdującego się w mitochondrium DNA wydaje się to możliwe (42), jednak różnice gęstości pozornej DNA z mitochondriów szczepów standardowych oraz mutantów ro_n^- i ro^- , nie mogą być traktowane jako dowód. Przede wszystkim nie wiadomo, czy zmiany w DNA u mutantów cytoplazmatycznych wywołują między innymi zmiany w strukturze i funkcji mitochondriów czy też zmiany w mitochondriach prowadzą między innymi do zmian w gęstości pozornej ich DNA. Zmiany takie zdaniem M o u n o l o u i wsp. (43) mogą być spowodowane na przykład występowaniem większej czy mniejszej niż normalnie ilości zmetylowanych zasad, dołączeniem cząsteczki cukru itd. Zmiany gęstości pozornej DNA mogą być także uwarunkowane występowaniem w szczepach standardowych dwóch rodzajów mitochondriów; mutacja ro^- uniemożliwiając namnażanie jednego prowadziłyby do nagromadzania się wyłącznie drugiego rodzaju.

Pewnych danych o roli mitochondrialnego DNA w syntezie enzymów łańcucha oddechowego dostarczyły badania przy użyciu testów hybrydyzacyjnych i chloramfenikolu. Testy hybrydyzacyjne odznaczają się wyjątkowo wysoką specyficznością, czego dowodem jest zidentyfikowanie za ich pomocą frakcji mRNA syntetyzowanego przez operony laktozy (45, 70), galaktozy (1) i tryptofanu (22, 23) u *E.coli*. Mitochondrialny DNA (14) wyodrębniono z drożdży szczepu dzikiego hodowanego beztlenowo oraz poddanych adaptacji tlenowej. Testy hybrydyzacyjne wykonywano z RNA: rybosomalnym, przenoszącym i związanym ze strukturami podkomórkowymi. Ten ostatni rodzaj odpowiadał wielkocząsteczkowym frakcjom ulegającym szybko znakowaniu metodą pulsacyjną. Ten RNA z drożdży adaptowanych hybrydyzował z DNA mitochondrialnym w dużo większym stopniu niż RNA z drożdży nie adaptowanych. Różnic takich nie stwierdzono przy hybrydyzacji z DNA jądrowym. RNA rybosomalny i przenoszący hybrydyzowały nieznacznie z DNA mitochondrialnym, bardzo dobrze natomiast z DNA jądrowym, przy czym adaptacja tlenowa nie wywierała wpływu. Autor (14) sugeruje, że DNA mitochondrialny koduje informację dla specjalnej klasy RNA, a jej transkrypcję ułatwiają lub też powodują warunki adaptacji tlenowej.

W obecności chloramfenikolu i innych antybiotyków synteza enzymów łańcucha oddechowego ulega zahamowaniu (4, 21, 74). Najsilniej hamowana jest synteza oksydazy cytochromowej, cytochromu b, c_1 i dehydrogenazy bursztynianowej. Prawie zupełnie natomiast nie jest hamowana synteza cytochromu c. Ze względu na zachodzącą w mitochondriach syntezę białka (30) oraz specyficzne działanie chloramfenikolu na rybosomy

Tablica 1

Enzymy powstające w czasie adaptacji tlenowej komórek drożdży (według 66)

Enzym	Aktywność (wyrażona w ilości zredukowanego substratu)		Wzrost aktywności
	nieadaptowanych	adaptowanych	
1.9.3.1. oksydoreduktaza cytochrom c : O ₂ (μl O ₂ /godz)	1	180	200 ×
1.11.1.5. oksydoreduktaza feroocytochrom c : nad-tlenek wodoru (stała reakcji w czasie 0)	0,03	1,6	50 ×
1.11.1.6. oksydoreduktaza nad-tlenek wodoru: nad-tlenek wodoru (stała reakcji w czasie 0) (cytochrom c/mol × 10 ⁻¹⁰)	0,3 około 0.1	10 1.8	30 × około 20 ×
1.1.2.3. oksydoreduktaza L-mleczan: ferricytochrom c (μl H ₂ /godz.)	około 0,5	25	około 50 ×
1.1.1.8. oksydoreduktaza glicerofosforan: ferricytochrom c (μl/H ₂ /godz.)	0,2	12	50 ×
1.6.2.3. oksydoreduktaza zred. NADP: ferricytochrom c (μl H ₂ /godz.)	1,6	64	około 40 ×
1.3.99.1. oksydoreduktaza bursztynian: akceptor (μl H ₂ /godz.)	0,3	13	około 40 ×
4.2.1.3. hydrolaza cytrynianu (izocytrynianu) (μl H ₂ /godz.)	7,0	20	3 ×
5.2.1.1. cis-trans-izomeraza maleinianu (μl fumaran/godz.)	120	800	7 ×
4.2.1.2. hydroliza L-jabłczanu (μl H ₂ /godz.)	20	110	6 ×
1.1.1.1. oksydoreduktaza alkohol: NAD (μl H ₂ /godz.)	83	35	0,4 ×

Tablica 2

Własności jądrowego i mitochondrialnego DNA z mutantów oddechowych drożdży typu jądrowego i cytoplazmatycznego (wg 42)

Szczep	Rodzaj mutacji		Q ₀₂	Cytochromy			DNA		
	jądrowa	cytoplazmatyczna		a + b	b	c	jądrowy gęstość	mitochondrialny	
								gęstość	% całości
Normalny Pro ⁺	+	+	100	+	+	+	1,701 ±0,002	1,687 ±0,002	około 14
D 243-2B-R ₁ Chromosomalny „petite” p ₁ ro ⁺	recesywna	normalny	0	—	—	++	1,701 ±0,002	1,687 ±0,002	około 10
D 243-2B Neutralny „petite” p ₁ ro-	—	recesywna	0	—	—	++	1,701 ±0,002	1,683 ±0,002	około 14
D 243-2B g Supresyjny „petite” p ₁ ro _s	—	dominująca	0	—	—	++	1,702 ±0,001	1,695 ±0,001	około 10

mitochondrialne dane te mogą być pośrednim dowodem autonomii mitochondriów, które warunkowałyby syntezę niektórych enzymów łańcucha oddechowego. Można jednak również przypuszczać, że synteza komponent białkowych oksydazy cytochromowej, cytochromu b i c₁ nie jest wybiórczo hamowana przez chloramfenikol, a cytochromy te nie mogą przybrać swej ostatecznej konfiguracji na skutek zahamowania syntezy białek strukturalnych mitochondriów.

Podstawy genetyczne układu oddechowego *S.cerevisiae* są wyjątkowo skomplikowane. Po pierwsze, część informacji genetycznej zawarta jest w DNA jądrowym, część zaś — w mitochondrialnym a badanie „podziału kompetencji” utrudnia fakt, że wiele mutacji jądrowych (typu p) i cytoplazmatycznych prowadzi do podobnych skutków fizjologicznych. Po drugie, jest olbrzymia dysproporcja między ilością tzw. genów strukturalnych i regulacyjnych: z sześciu genów jądrowych cy jeden tylko zawiera informację o sekwencji aminokwasów w izo-1 cytochromie c, pięć pozostałych zaś w jakiś określony sposób wpływa na poziom tego enzymu w komórce. Jeszcze mniej jasna jest rola genów p. Żadnemu z nich nie można przypisać informacji o sekwencji aminokwasów w którymś z cytochromów. Po trzecie, mutacje cytoplazmatyczne zachodzą z niezwykłą częstością i zupełnie nie wiadomo, czy następuje jednocześnie identyczna mutacja we wszystkich cząsteczkach DNA mitochondrialnego, czy też mutują tylko niektóre cząsteczki, a następnie namnażają się wybiórczo, nawet jeśli są to mutacje ro⁻. Po czwarte, sposób mutacji DNA mitochondrialnego — zmiana jego gęstości — jest sprzeczny ze wszystkim, co dotąd wiadomo o mechanizmie mutacji jądrowych.

LITERATURA

1. Attardi G., Naono S., Rouviere J., Jacob F., Gros F., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **28**, 363 (1963).
2. Biggs D. R., Linnane A. W., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 785 (1963).
3. Chaix P., Labbe P., w *Mechanisms des Regulation des Activites Cellulaires chez les Microorganismes*, Marseille 1963, CNRS 1965 str. 481.
4. Clark-Walker G. D., Linnane A. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 8 (1966).
5. De Robichon-Szulmajster H., Surdin Y., Mortimer R. K., *Genetics* **53**, 609 (1966).
6. Ephrussi B., Granchamp S., *Heredity* **20**, 1 (1965).
7. Ephrussi B., Hottinguer H., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **16**, 75 (1951).
8. Ephrussi B., Jakob H., Granchamp S., *Genetics* **54**, 1 (1966).
9. Ephrussi B., deMargerie-Hottinguer H., Roman H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **41**, 1065 (1955).
10. Ephrussi B., Słonimski P. P., *Biochim. Biophys. Acta* **6**, 256 (1950).

11. Ephrussi B., Słonimski P. P., Yotsuyanagi Y., Tavlitzki J., *Compt. Rend.* **26**, 87 (1956).
12. Fukuhara H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 297 (1965).
13. Fukuhara H., *J. Mol. Biol.* **17**, 334 (1966).
14. Fukuhara H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1065 (1967).
15. Fukuhara H., Sels A., *J. Mol. Biol.* **17**, 319 (1966).
16. Galzy P., Słonimski P. P., *Compt. Rend.* **245**, 2556 (1957).
17. Guerin B., Sułkowski E., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 193 (1966).
18. Gunge N., Sugimura T., Iwasaki M., *Genetics* **57**, 213 (1967).
19. Heyman-Blanchet T., Chaix P., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 85 (1959).
20. Heyman-Blanchet T., Ohaniance L., Chaix P., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 462 (1964).
21. Huang M., Biggs D. R., Clark-Walker G. D., Linnane A. W., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 434 (1966).
22. Imamoto F., Morikawa N., Sato K., *J. Mol. Biol.* **13**, 169 (1965).
23. Imamoto F., Morikawa N., Sato K., Mishima S., Nishimura T., Matsushiro A., *J. Mol. Biol.* **13**, 157 (1965).
24. Jakob H., *Genetics* **52**, 75 (1965).
25. Konieczna M., Lachowicz T., w *Materiałach XVI Zjazdu P.T.M. Lublin 1967*, str. 20.
26. Kovac L., Bednarova H., Greksak M., *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 32 (1968).
27. Kovac L., Hrusovska E., *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 43 (1968).
28. Kovac L., Lachowicz T. M., Słonimski P. P., *Science* **158**, 1564 (1967).
29. Kovac L., Weissova K., *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 55 (1968).
30. Kroon A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 391 (1963).
31. Lachowicz T., w *Materiałach XVI Zjazdu P.T.M. Lublin 21—23.IX.1967* str. 25
32. Lachowicz T., Kotylak Z., Kołodyński J., Sniegocka Z., w *Materiałach XVI Zjazdu P.T.M. Lublin 1967* str. 26.
33. Linnane A. W., w *Oxidases and Related Redox System*, John Wiley, New York, 1965, str. 1102.
34. Linnane A. W., Vitols E., Nowland P. G., *J. Cell. Biol.* **13**, 345 (1962).
35. Lorenc R., *Badania mechanizmu adaptacji oddechowej. Praca na stopień doktora medycyny, Akademia Medyczna, Białystok 1967.*
36. Luzzati M., *Inhibition spécifique de la recombinaison entragenétique. Praca doktorska L'Université de Paris 1965.*
37. Mackler B., Douglas H. D., Will S., Hawthorne D. C., Mahler H. R., *Biochemistry* **4**, 2016 (1965).
38. Magasanik B., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **26**, 249 (1961).
39. Mahler H. R., Mackler B., Grandchamp S., Słonimski P. P., *Biochemistry* **3**, 668 (1964).
40. Mahler H. R., Mackler B., Słonimski P. P., Grandchamp S., *Biochemistry* **3**, 677 (1964).
41. Mortimer R. K., Hawthorne D. C., *Genetics* **53**, 165 (1966).
42. Mounolou J. C., Jakob H., Słonimski P. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 218 (1966).
43. Mounolou J. C., Jakob H., Słonimski P. P., w *The Control of Nuclear Activity*, red. L. Goldstein, Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, New York 1967 r., str. 413.
44. Moustacchi E., Williamson D. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 56 (1966).

45. Naono S., Rouviere J., Gros F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 664 (1965).
46. Narita K., Titani J., Yaoi Y., Murakami H., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 688 (1963).
47. Nygaard A. P., *J. Biol. Chem.* **236**, 920 (1961).
48. Nygaard A. P., *J. Biol. Chem.* **236**, 1585 (1961).
49. Ogur M., Roshanmanesh A., Ogur S., *Science* **147**, 1590 (1965).
50. Ohnishi T., Kawaguchi K., Hagihara B., *J. Biol. Chem.* **241**, 1797 (1966).
51. Ohnishi T., Kroger A., Heldt H. W., Pfaff E., Klingenberg M., *Eur. J. Biochem.* **1**, 301 (1967).
52. Polakis E. S., Bartley W., Meek G. A., *Biochem. J.* **90**, 369 (1964).
53. Roy B. R., *Nature* **201**, 80 (1964).
54. Sarachek A., Bish J. T., *Cytologie* **28**, 450 (1963).
55. Shurmans-Stekhoven F. M. A. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 555 (1966).
56. Sels A. A., *Arch. Internat. Physiol. Biochim.* **70**, 760 (1962).
57. Sels A. A., Fukuhara H., Pere G., Słonimski P. P., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 486 (1965).
58. Sels A. A., Jakob H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 453 (1967).
59. Sherman F., *Genetics* **48**, 375 (1963).
60. Sherman F., *Genetics* **49**, 39 (1964).
61. Sherman S., Ephrussi B., *Genetics* **47**, 695 (1962).
62. Sherman F., Słonimski P. P., *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 1 (1964).
63. Sherman F., Stewart J. W., Margoliash E., Parker J., Campbell W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 1498 (1966).
64. Sherman F., Tabor H., Campbell W., *J. Mol. Biol.* **13**, 21 (1965).
65. Słonimski P. P., Thesis, Masson Paris, 1953.
66. Słonimski P. P., *Post. Biochem.* **2**, 493 (1956).
67. Słonimski P. P., Archer R., Pere G., Sels A. A., Somlo M., w Mechanisms de regulation des activitites cellulaires chez les microorganismes. Paris: CRNS, 1965, s. 435.
68. Somlo M., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 183 (1965).
69. Somlo M., Fukuhara H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 587 (1965).
70. Spiegelman S., Hayashi M., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **28**, 161 (1963).
71. Stewart J. W., Margoliash E., Sherman F., *Federation Proc.* **25**, 647 (1966).
72. Sułkowski E., Guerin B., Befaye J., Słonimski P. P., *Nature* **202**, 36 (1964).
73. Tewari K., Jayaman H., Mahler H. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 141 (1965).
74. Thomas D. Y., Wilkie D., *Genet. Res.* **11**, 33 (1968).
75. TurSKI W., Gross M., *Post. Biochem.* **13**, 350 (1967).
76. Tustanoff E. R., Bartley W., *Biochem. J.* **91**, 595 (1964).
77. Wallace P. G., Linnane A. W., *Nature* **201**, 1191 (1964).
78. Wierzbicki R., Bartkowiak J., *Post. Biochem.* **12**, 577 (1966).
79. Wintersberger E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 1 (1966).
80. Yotsuyanagi Y., *J. Ultrastructure Res.* **7**, 121 (1962).
81. Yotsuyanagi Y., *J. Ultrastructure Res.* **7**, 141 (1962).

K o m u n i k a t

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej podaje do wiadomości wszystkim zainteresowanym, że IV Zjazd PTDL odbędzie się w dniach 17—20.IX. 1970 w Szczecinie.

Temat Zjazdu:

„Rola i znaczenie diagnostyki enzymologicznej we współczesnej medycynie”

W ramach Zjazdu odbędzie się również Sympozjum na temat:

„Lekooporność drobnoustrojów chorobotwórczych”

W dniu 17.IX.1970 odbędzie się również Walne Zgromadzenie Delegatów PTDL, na którym zostanie dokonany wybór nowych władz Towarzystwa.

Zarząd Główny
Polskiego Towarzystwa
Diagnostyki Laboratoryjnej

TADEUSZ MIKULSKI *

Elektronowy rezonans paramagnetyczny i jego zastosowanie w biochemii

Electron Spin Resonance and Its Application in Biochemistry

Description of the phenomenon and the ESR method in biochemistry are presented. The results of studying the free radicals in tissues, in enzymatic reactions and in radiobiology have been analysed. A study covering the structure and the triplet states of molecules by ESR method has been discussed.

Zjawisko elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ERP) odkrył Z a w o j s k i j (179). Pierwsze jego doświadczenia dotyczyły absorpcji rezonansowej przy częstościach radiowych w jonach soli i żelaza. Jednak dopiero rozwój techniki mikrofalowej upowszechnił zjawisko ERP i umożliwił zbudowanie spektrometrów ERP o dużej czułości. Pozwala to na badanie atomów i cząsteczek posiadających nieskompensowany spin, dlatego też badanie ERP stosuje się w różnych dziedzinach fizyki i chemii. Od 1954 roku, kiedy C o m m o n e r i wsp. (39) zaobserwowali widmo ERP w tkankach królika, metoda ERP znalazła też zastosowanie w biologii i biochemii. Poza identyfikacją wolnych rodników metoda ta dostarcza bowiem wiele istotnych i cennych informacji dotyczących stosunków energetycznych, mechanizmów reakcji oraz elektronowej struktury badanego układu biochemicznego.

Już w roku 1960 odbyła się pierwsza konferencja międzynarodowa poświęcona zastosowaniu ERP w układach biologicznych (165), a w ostatnich latach ukazało się kilka monografii poświęconych zjawisku ERP (4, 102) oraz jego zastosowaniu w chemii i biologii (19, 41, 70).

W niniejszej pracy dla zrozumienia istoty ERP opisano bardzo ogólnie podstawy spektroskopii ERP. W części drugiej podano wyniki osiągnięte metodą ERP w różnych działach biochemii.

I. Zjawisko ERP

Rozpatrzmy atom z jednym nieskompensowanym elektronem, np. atom wodoru. Jak wiadomo elektron, oprócz orbitalnego momentu pędu, po-

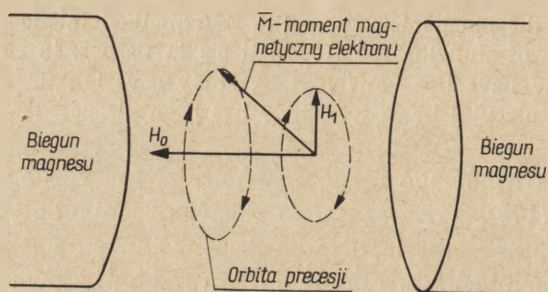
* Dr med., mgr, Zakład Fizyki Lekarskiej, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin.

siada własny moment — spin s , który może przyjmować dwie wartości: $m_s = \pm 1/2$. Ze spinem związany jest moment magnetyczny μ , który posiada ten sam kierunek, lecz przeciwny zwrot. Zależność tę można zapisać w postaci wzoru (1):

$$\bar{\mu} = g\bar{s} \quad 1$$

gdzie g jest współczynnikiem Landego dającym informację o oddziaływaniu orbitalnego i spinowego momentu pędu elektronu.

Moment magnetyczny elektronu, ze względu na swój ruch obrotowy w stałym polu magnetycznym o natężeniu H_0 , wykonuje ruch precesyjny (rysunek 1), tworząc kąt Θ z kierunkiem natężenia pola.



Rys. 1. Precesja momentu magnetycznego elektronu wokół stałego pola magnetycznego H_0

Częstotliwość precesji ω_0 wyraża się wzorem (2):

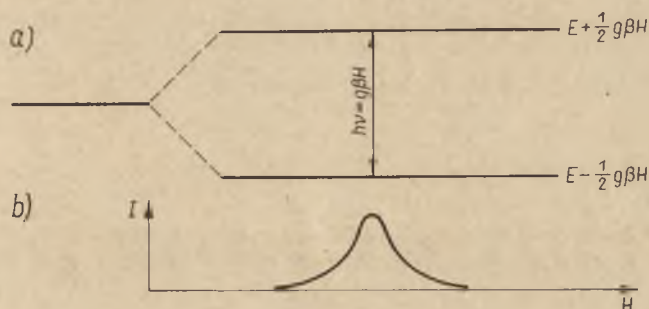
$$\omega_0 = \gamma H_0 \quad 2$$

gdzie γ jest współczynnikiem giromagnetycznym.

Proces zmiany jednej orientacji μ na inną odpowiada zmianie kąta Θ ; można tego dokonać przykładając prostopadle do H_0 zmienne pole magnetyczne H_1 , zgodne w fazie z precesją elektronu. Gdy częstotliwość zmiennego pola magnetycznego ω równa się częstotliwości precesji ω_0 , wtedy zachodzi warunek rezonansu. Zmienne pole magnetyczne można traktować jako wynik nałożenia się dwóch pól kołowo spolaryzowanych o przeciwnych kierunkach. Ale w zjawisku rezonansu bierze udział tylko składowa obracająca się w kierunku precesji momentu magnetycznego elektronu. Wiruje ona z tą samą częstością, z którą odbywa się precesja spinu. Na moment magnetyczny działa więc mały, ale stały moment obrotowy, który stopniowo zmienia jego kierunek na przeciwny. W ten sposób na skutek działania zmiennego pola magnetycznego, którym jest pole wielkiej częstotliwości, spin oraz jego moment magnetyczny zmieniają zwroty na przeciwne.

Rozpatrzmy teraz zbiór atomów o nieskompensowanym spinie. W stałym polu magnetycznym spiny oraz ich momenty magnetyczne przybiorą

orientację równoległą lub antyrównoległą do kierunku natężenia pola. Pierwotnie chaotycznie ułożony zbiór momentów magnetycznych elektronów pod wpływem pola rozdzieli się na dwie grupy o różnych stanach energetycznych (rysunek 2).



Rys. 2. Poziomy energetyczne nieskompensowanego elektronu w stałym polu magnetycznym (a). Jeżeli spełniony jest warunek rezonansu, to nastąpi absorpcja energii mikrofalowej (b)

Energia każdego elektronu o spinie równoległym do natężenia pola zmniejszy się o $1/2gH$, a energia elektronu o spinie przeciwrównoległym wzrośnie o $1/2gH$. Wobec tego różnica energii tych dwóch stanów wynosi $g\beta H$ (rysunek 2a). Dolny poziom energetyczny jest liczniej obsadzony niż górny. Względna liczba obsadzenia tych stanów wyraża się wzorem 3:

$$\frac{n_1}{n_2} = e^{-g\beta H/kT} \quad 3$$

- gdzie n_1 — liczba elektronów w stanie o większej energii
 n_2 — liczba elektronów w stanie o mniejszej energii
 g — czynnik Landego
 β — magneton Bohra
 H — wartość natężenia pola magnetycznego
 k — stała Boltzmana
 T — temperatura w skali Kelvina

Jeżeli teraz do takiego układu zorientowanych spinów w stałym polu magnetycznym H_0 przyłożymy zmienne pole elektromagnetyczne o składowej magnetycznej prostopadłej do H_0 i częstotliwości ν takiej, że spełniony jest warunek wyrażony wzorem 4:

$$h\nu = g\beta H_0 \quad 4$$

to mówimy, że rozpatrywany układ jest w rezonansie. Po przyłożeniu zmiennego pola elektromagnetycznego spełniającego warunek 4, prawdopodobieństwo przejścia elektronu z poziomu o mniejszej energii na wyż-

szy i odwrotnie, czyli emisji i absorpcji energii, jest jednakowe. Ale jak już wyżej podano (wzór 3), poziom o mniejszej energii jest liczniej obsadzony i dlatego w rozpatrywanym układzie spinów nastąpi absorpcja energii zmiennego pola elektromagnetycznego spełniającego warunek rezonansu. Energię tę rejestruje się jako sygnał ERP. Wyrażając częstotliwość pola zmiennego w megahercach, a natężenie stałego pola magnetycznego w erstedach, warunek rezonansu ERP zapisany w postaci wzoru 4 przybierze dla wolnego elektronu postać wzoru 5:

$$\nu_0 [\text{MHz}] = 2,8 [\text{Oe}] \quad 5$$

Dzięki absorpcji kwantu zmiennego pola elektromagnetycznego zachodzi wyrównanie się poziomów energetycznych. Po pewnym czasie ustala się równowaga i wtedy energia przejścia przekazywana jest jako drganie otaczającego środowiska. Prędkość ustalenia się równowagi można zapisać w postaci wzoru 6:

$$-\frac{d(n - n_1)}{dt} = k(n - n_1) \quad 6$$

gdzie k jest stałą prędkości.

Najczęściej w ERP posługujemy się wielkością odwrotną do stałej prędkości k i określamy ją czasem relaksacji τ . Określa on czas, w którym nadmiar spinów na niższym poziomie energetycznym zmniejszy się e razy. Czas relaksacji charakteryzuje zatem wzajemne oddziaływanie spinów z okrążającym środowiskiem (matrycą).

II Parametry widma ERP

Widmo ERP uzyskuje się stosując stałe pole magnetyczne przy ciągłej zmianie częstotliwości zmiennego pola elektromagnetycznego, lub odwrotnie. Ze względów technicznych przyjęto drugą możliwość. Ustala się częstotliwość zmiennego pola elektromagnetycznego, a stopniowo w sposób ciągły zmienia się natężenie stałego pola magnetycznego. W pewnym przedziale rezonansu absorpcja mocy zmiennego pola elektromagnetycznego jest funkcją natężenia pola (rysunek 2b).

Powierzchnię pola pod krzywą absorpcji (rysunek 2b) można łatwo obliczyć wyznaczając wartość wyrażoną wzorem 7:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} J(H) dH \quad 7$$

gdzie $J(H)$ jest zaabsorbowaną mocą zależną od natężenia przykładanego pola. Wartość wyznaczona ze wzoru (7) jest proporcjonalna do liczby

paramagnetycznych cząstek w badanym układzie. Prawidłowo interpretując widmo ERP można nie tylko zidentyfikować cząstki paramagnetyczne, na przykład wolne rodniki, lecz także otrzymać informacje o strukturze rodników, ich oddziaływaniu z matrycą, energii aktywacji itd.

Widmo ERP charakteryzuje się czterema następującymi parametrami:

1. współczynnikiem Landego g
2. wielkością subtelnego rozszczepienia
3. wielkością nadsubtelnego rozszczepienia
4. kształtem i szerokością.

1. Współczynnik g informuje o oddziaływaniu orbitalnego i spinowego momentu pędu nieskompensowanego elektronu. Wartość jego może zmieniać się od 1 do 6, a dla wolnego elektronu wynosi 2,002319 (174). W licznych wolnych rodnikach występujących w układach biochemicznych sprzężenie spin-orbita jest bardzo małe i wobec tego czynnik g niewiele różni się od wartości g dla wolnego elektronu. Dla rodników zawierających lekkie atomy (H, O, C, N) różnice te wynoszą 3 do 4 jednostek na trzecim miejscu po przecinku. Wartość czynnika g daje pośrednie informacje o stanie energetycznym orbitala rodnika. Najczęściej oblicza się ją ze wzoru 4 po zmierzeniu w chwili rezonansu wartości natężenia stałego pola magnetycznego i częstotliwości zmiennego pola elektromagnetycznego. Pomiaru te jednak są dość uciążliwe (15) i dlatego w badaniach biochemicznych stosuje się metodę względną (31, 32).

2. Drugi parametr — wielkość subtelnego rozszczepienia — pojawia się w widmie atomów lub cząsteczek, dla których wypadkowy spin jest większy od $1/2$. Dla dwurodnika $S = 1$ i w polu wewnętrznym kryształu nastąpi rozszczepienie poziomą na dwa poziomy energetyczne. Przy stałej częstotliwości zmiennego pola elektromagnetycznego uzyskuje się oddzielne dwie linie rezonansowe przy dwóch różnych wartościach natężenia stałego pola magnetycznego.

3. Nadsubtelna struktura widma powstaje w wyniku oddziaływania momentu magnetycznego nieskompensowanego elektronu z magnetycznym momentem jądra. Spin jądra J w stałym polu magnetycznym przyjmuje $2J + 1$ możliwych orientacji: $J, J - 1, \dots, -J$. Wobec tego dla przejść ERP reguły wyboru przybiorą postać:

$$\Delta m_s = \pm 1; \Delta m_J = 0$$

W przybliżeniu można powiedzieć, że elektronowe przejścia między poziomami energetycznymi zachodzą w lokalnych polach powstałych na skutek różnej orientacji spinu jądra w stosunku do natężenia stałego pola magnetycznego. W przypadku jądra wodoru elektron znajduje się raz w większym, drugi raz w mniejszym polu w zależności od orientacji spinu jądra. Dla jądra wodoru spin J równy jest $1/2$, a zatem możliwe są tylko

dwie orientacje rzutu spinu na kierunek stałego pola magnetycznego, wobec czego warunek rezonansu można zapisać w postaci wzoru 8:

$$h\nu_i = g\beta H + \sum_{m_1=J}^{m_1=-J} a_i m_1 \quad 8$$

We wzorze 8 ν_i jest częstotliwością odpowiadającą przejściu i , m_i — oznacza rzut spinu jądrowego na kierunek stałego pola magnetycznego, a — jest stałą nadsubtelnego rozszczepienia, która charakteryzuje stopień oddziaływania nieskompensowanego elektronu z jądrem i zależy od typu jego orbitalu atomowego lub cząsteczkowego.

Dla innych atomów wartości spinów jądrowych są następujące: $D_1^2 = 1$, $N_7^{14} = 1$, $P_{15}^{31} = 1/2$. Istotny jest fakt, że C_6^{12} i O_8^{16} mają spin równy zeru.

a) Jeżeli elektron znajduje się na orbitalu s lub σ , to oddziaływanie jest bezpośrednie, gdyż gęstość nieskompensowanego elektronu w punkcie jądra jest różna od zera. Powstaje wtedy tzw. izotropowa nadsubtelna struktura. Stałą a_i ze wzoru 8 wyznacza wzór 9:

$$a_i = \frac{8\pi}{3h} \gamma \gamma_i \beta \beta_i |\psi(0)|^2 \quad 9$$

gdzie γ , γ_i — współczynniki magnetogiryczne elektronu i jądra

β , β_i — elektronowy i jądrowy magneton Bohra

h — stała Plancka

$|\psi(0)|^2$ — kwadrat modułu funkcji falowej, charakteryzujący gęstość nieskompensowanego elektronu w punkcie i tego jądra.

b) Izotropowa nadsubtelna struktura powstaje również gdy nieskompensowany elektron opisany jest zhybrydowaną funkcją falową włączającą część s orbitalu. Analiza izotropowa rozszczepienia widma daje informacje o rozkładzie gęstości elektronu. Izotropowa struktura znika gdy $|\psi(0)|^2 = 0$, ale wtedy może pojawić się nadsubtelna struktura tzw. anizotropowa, uwarunkowana oddziaływaniem typu dipol-dipol między momentem magnetycznym jądra i elektronu. Zależy ona od odległości jądra od uśrednionej gęstości nieskompensowanego elektronu. Dla wolnych rodników w roztworach, jej wartość uśrednia się do zera i dlatego zjawisko to nie będzie rozpatrywane szczegółowo.

c) Rozpatrzmy teraz nadsubtelną strukturę powstającą na skutek tzw. konfiguracyjnego oddziaływania. Zjawisko to występuje w związkach aromatycznych. Wydawałoby się, że widmo ERP wolnego rodnika nie powinno wykazywać nadsubtelnej struktury, ponieważ nieskompensowany elektron znajduje się na orbitalu molekularnym typu π , który jako kombinacja liniowa orbitali atomowych $2p_z$ posiada gęstość elektronową równą zeru w płaszczyźnie pierścienia aromatycznego. Ale z drugiej strony jedynymi jądrami w cząsteczkach aromatycznych o spinie różnym

od zera są właśnie protony pierścieni i tylko one mogą powodować powstanie struktury nadsubtelnej widma ERP. Zjawisko to można wyjaśnić na podstawie prostego układu jakim jest jon M_n^{2+} . Posiada on budowę elektronową: $(1s)^2 (2s)^2 (2p)^6 (3s)^2 (3p)^3 (3d)^5$, a mimo to daje widmo ERP o nadsubtelnej strukturze z 6 składowymi. Fakt ten tłumaczy się tym, że jon manganu nie jest w stanie podstawowym, lecz znajduje się w stanie wzbudzonym o następującej konfiguracji elektronowej: $(1s)^2 (2s)^2 (2p)^6 (3s)^1 (3p)^6 (3d)^5 (4s)^1$. Nieskompensowany elektron znajduje się na orbitalu s dzięki czemu powstaje nadsubtelna struktura widma ERP (70). Zjawisko istnienia nadsubtelnej struktury widma wolnego rodnika związków aromatycznych daje się tłumaczyć przy założeniu, że funkcja falowa opisująca nieskompensowany elektron typu π zawiera pewną domieszkę orbitalu σ . W widmie wolnych rodników nadsubtelne rozszczepienie wywołane protonem jest proporcjonalne do gęstości spinowej nieskompensowanego elektronu q_i na π orbitalu i wyraża się wzorem 10, podanym przez Mc Connella (70):

$$\Delta H = Q\rho_i \quad 10$$

gdzie Q jest wielkością stałą i dla rodników aromatycznych przyjmuje wartość 280e. Wzór ten daje możliwość obliczenia rozszczepienia nadsubtelnego widma ERP.

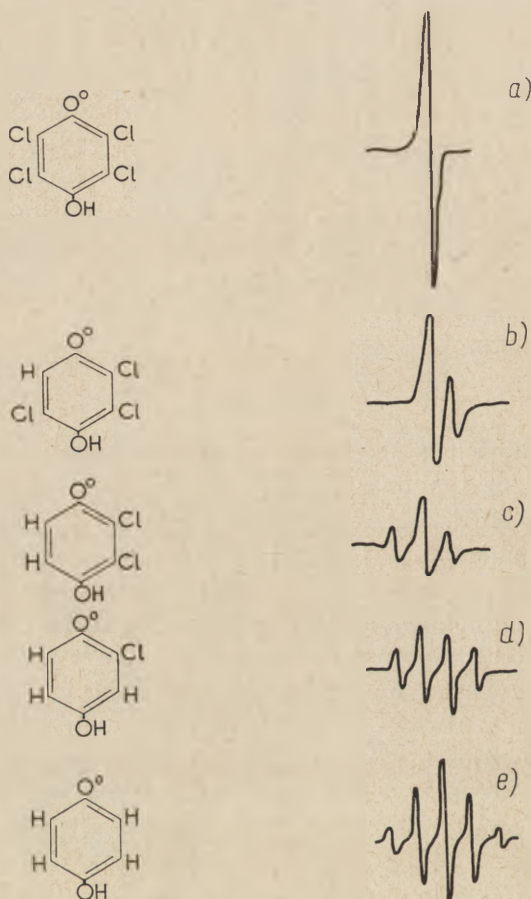
Powstawanie nadsubtelnej struktury można przedstawić na przykładzie chlorobenzosemichinonu. W semichinonach powstających przy wolnej redukcji chinonów, atom chloru ma spin jądrowy równy zeru i jego jądro nie oddziałuje na nieskompensowany elektron (rysunek 3a). Widmo tego związku nie wykazuje więc subtelnej struktury. Jeżeli jeden atom chloru podstawią się atomem wodoru, to nieskompensowany elektron oddziałuje ze spinem jądra wodoru, którego wartość równa jest $1/2$. Wobec istnienia dwóch możliwych orientacji spinu protonu, w polu magnetycznym nastąpi rozszczepienie sygnału ERP na dwie składowe (rysunek 3b).

Po zastąpieniu dwóch atomów chloru dwoma atomami wodoru, ich momenty magnetyczne mogą być skierowane równoległe albo antyrównoległe do kierunku stałego pola magnetycznego, lub tylko jeden będzie zorientowany w kierunku pola, a drugi w przeciwnym. Prawdopodobieństwo tego trzeciego stanu jest dwukrotnie większe niż prawdopodobieństwo dwóch poprzednich. Dlatego amplituda środkowego pasma jest dwukrotnie większa niż dwóch pozostałych (rysunek 3c).

Po zamianie 3 atomów chloru na atomy wodoru możliwe są 4 konfiguracje spinów jądrowych i dlatego na rysunku 3d widmo składa się z czterech pasm. Rysunek 3e przedstawia widmo ERP po zamianie 4 atomów chloru 4 atomami wodoru. W ogólnym przypadku n ekwiwalentnych protonów o spinie równym $1/2$ wytworzy w widmie ERP nadsubtelną strukturę o $(n+1)$ pasm składowych. Dokładny pomiar nadsubtelnej

struktury umożliwia obliczenie rozkładu spinowej gęstości w cząsteczce (110, 111, 132).

4. Możliwość obserwacji nadsubtelnej struktury widma ERP jak również, w niektórych warunkach, absorpcji rezonansowej zależy od szerokości



Rys. 3. Widma ERP chlorobenzosemichinonów (wg 79)

kości widma. Parametr ten jest związany ze średnim czasem znajdowania się cząstki na wzbudzonym poziomie energetycznym. Absorpcja rezonansowa ERP jest natury kwantowej i do jej opisu stosuje się zasadę nieoznaczoności Heisenberga, przedstawiona wzorem 11:

$$\Delta E \tau = \hbar$$

1

gdzie τ — czas relaksacji

ΔE — różnica energii

\hbar — stała Plancka dzielona przez 2π

Ze wzoru 11 szerokość widma w jednostkach częstotliwości wynosi:

$$\Delta\nu = \frac{\Delta E}{h} = \frac{1}{\tau} \quad 12$$

a zatem sygnał ERP zależy od czasu relaksacji. Jeżeli τ jest bardzo duże, co odpowiada małej prędkości ustalania się rozdziału spinów na poziomach energetycznych, to stopień obsadzenia poziomów szybko wyrównuje się i wtedy powstaje niepożądane zjawisko nasycenia linii widmowej. Bardzo mały czas relaksacji daje linię o wielkiej szerokości, co utrudnia jej wykrycie. Szerokość linii ERP jest zawsze większa od rzeczywistej z powodu zmniejszania się czasu relaksacji wskutek wzajemnego oddziaływania każdej niezależnej cząstki paramagnetycznej z otaczającym środowiskiem. W zasadzie rozróżnia się dwa czasy relaksacji:

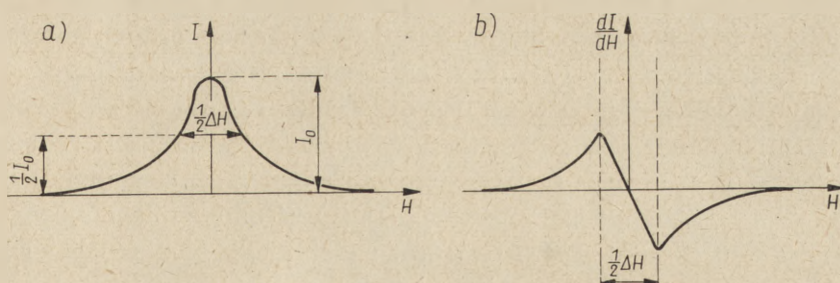
- a. czas relaksacji spin — siatka (T_1)
- b. czas relaksacji spin — spin (T_2)

Jeżeli absorbowana przez rozpatrywany spin energia szybko przekazywana jest drganiom siatki, to szerokość linii zależy od T_1 . Relaksacja spin — siatka może być procesem jednofononowym tzn. pojedynczy kwant energii spinowej wymienia się z jednym fononem czyli kwantem drgań energii siatki, lub dwufononowym w którym znika fonon o częstotliwości ν_1 a pojawia się nowy fonon o takiej częstotliwości ν_2 , że spełniony jest warunek 13:

$$\nu_2 - \nu_1 = \Delta E \quad 13$$

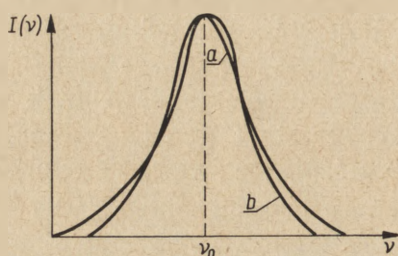
gdzie ΔE jest energią kwantu wzbudzonej paramagnetycznej cząstki. Ten rodzaj przekazywania energii zachodzi przy dostatecznie dużych temperaturach.

Szerokość linii zależy również od oddziaływania typu dipolowego między spinami. Można sobie łatwo wyobrazić, że jeżeli dwie paramagnetyczne cząstki są oddalone o r od siebie, to na każdą z nich pomimo zewnętrznego pola magnetycznego działa dodatkowo pole magnetyczne H_i wytworzone przez sąsiadującą cząstkę i . Wobec tego rezonans dla każdego spinu



Rys. 4. Funkcja kształtu linii ERP (a) i jej pochodna (b)

i zachodzi w polu $H = H_0 \pm H_1$. Dlatego ten typ oddziaływania prowadzi do poszerzenia linii widmowej. W spektroskopii ERP podaje się najczęściej wartość połówkowej szerokości linii (rysunek 4a). Połówkowa szerokość pochodnej linii absorpcji jest odległością między prostymi równoległymi, poprowadzonymi przez maximum i minimum linii absorpcji (rysunek 4b).



Rys. 5. Dwa typy kształtu linii absorpcji paramagnetycznej: a — typ Lorentza, b — typ Gaussa

Krzywe absorpcji są krzywymi typu Gaussa i typu Lorentza (rysunek 5). Najczęściej uzyskuje się krzywą, która jest sumą tych dwóch postaci zwłaszcza wtedy, gdy jest ona asymetryczna. Kształt krzywej daje pośrednią informację o oddziaływaniach wewnątrz badanego układu.

III. Metody pomiarowe

Jak już wspomniano widmo ERP otrzymuje się doświadczalnie drogą ciągłych zmian natężenia pola magnetycznego przy stałej wartości częstości mikrofalowej ν . Aby zapewnić dostateczną czułość układu pomiarowego należy stosować duże wartości natężenia pola magnetycznego co wynika ze wzoru 3 i 4. Przy dużym H wzrasta ΔE , a to daje większą różnicę między n_1 i n_2 .

Do badania wolnych rodników w układach biochemicznych najczęściej stosuje się spektrometry o długości fali 3 cm (41). Odpowiada to natężeniu pola magnetycznego rzędu 3kOe. Bardzo rzadko stosuje się spektrometry o zakresie milimetrycznym (32). Spektrometry o częstościach radiowych umożliwiają badanie próbek w roztworach wodnych o stosunkowo dużej objętości, ale mają zbyt małą czułość (81). Spektrometr mikrofalowy ERP składa się z 5 zasadniczych elementów: stabilnego źródła pola elektromagnetycznego wielkiej częstotliwości, komory rezonansowej, magnesu o stałym jednorodnym natężeniu pola rzędu 4kOe, detektora do pomiaru

absorbowanej energii w przedziale rezonansu oraz z układu rejestrującego.

Źródłem mikrofal jest stabilizowany klistron refleksowy o częstotliwości około 10GHz. Klistron wytwarza energię mikrofalową, która przechodzi przez komorę rezonansową do detektora, diody krystalicznej. Przed komorą rezonansową znajdują się urządzenia do regulacji i kontroli mocy wyjściowej i do pomiarów długości fali. Komora rezonansowa wraz z próbką badanej substancji paramagnetycznej znajduje się w stałym polu magnetycznym wytworzonym przez elektromagnes. Posiada on cewki modulacyjne.

Natężenie pola stałego można zmieniać w sposób ciągły od 0 do 4kOe. Jeżeli podczas zmiany natężenia pola magnetycznego w pewnym przedziale zostanie spełniony warunek rezonansu wyrażony wzorem 4, to próbka paramagnetyczna pochłonie energię mikrofalową i na detektorze pojawi się sygnał ERP, który po wzmocnieniu można uwidocznic na oscylografie. Przesuwnik fazowy i detektor fazowy umożliwiają rejestrację sygnału ERP na autokompensatorze.

Zasady działania wymienionych elementów spektrometru mikrofalowego podają monografie (4, 19, 70, 100), a w licznych pracach można znaleźć dodatkowe informacje dotyczące konstrukcji spektrometrów ERP o dużej czułości (6, 66, 91, 112, 129, 155, 161, 163).

IV. Metodyka ERP w biochemii

Układy biochemiczne charakteryzują się zmienną ilością centrów paramagnetycznych. Badane reakcje zachodzą przeważnie w wodnych roztworach. Woda w stanie ciekłym wykazuje nierezonansową absorpcję na skutek oddziaływania momentu dipolowego cząsteczki ze składową elektryczną pola mikrofalowego. Nawet bardzo mała ilość wody w próbce obniża moc pola mikrofalowego wskutek czego gwałtownie maleje czułość pomiaru ERP, dlatego też badanie ERP wywołanego obecnością wolnych rodników w układach biochemicznych wykonuje się na specjalnie przygotowanych próbkach np. szybko zamrożonych w ciekłym azocie.

Zamrażając próbki w różnych odstępach czasu od rozpoczęcia reakcji można otrzymać obraz jej kinetyki (72). Jeżeli stężenie wolnych rodników nie jest duże stosuje się liofilizację większych objętości roztworu. Zazwyczaj wystarcza temperatura -10°C i ciśnienie równe 10^{-3} mm Hg (33). S t o o d l e y (164) przedyskutował zależność między czułością typowego spektrometru ERP a grubością cylindrycznej próbki zawierającej wodę. C o o k i M a l l a r d (40) opisują typ rezonatora TE_{10n} , w którym można zarejestrować sygnał ERP dla stężenia spinów 2×10^{12} w roztworze wodnym.

Do badań nad kinetyką wolnych rodników stosuje się odpowiednio

zmodyfikowane komory przepływowe (23, 29, 30), które są jednocześnie mieszalnikami. Układy takie silnie „rozciągają” czas życia labilnych produktów paramagnetycznych, dzięki czemu można dokładnie określić stężenie wolnych rodników i zbadać parametry widma ERP.

Badanie nadsubtelnej struktury widma związków znakowanych deuterem (50, 76, 94) wykazało, że jest ona uwarunkowana protonami przy atomach węgla. Protony polarnych grup: hydroksylowej, karboksylowej i aminowej przyczyniają się w niewielkim stopniu do powstawania nadsubtelnej struktury.

Stężenie wolnych rodników można określić porównując pole pod krzywą absorpcji badanej próbki z polem wzorca zawierającego znaną ilość paramagnetycznych centrów. Dotychczas najczęściej jako standard stosowano stabilny wolny rodnik dwufenylopikrylohydrazyl (DPPH), o czynniku g równym 2,0036, niewiele różniącym się od czynnika g wolnych elektronów. Przy jednoczesnym zapisie widma badanej substancji i wzorca DPPH krzywe absorpcji nakładają się i rozdzielenie pól jest niemożliwe. Skonstruowane specjalne rezonatory (80) tylko w niewielkim stopniu eliminują powyższą wadę. Zapis widma ERP badanej substancji i krystalicznego wzorca należy zatem przeprowadzić dwukrotnie, co obarcza pomiar dużym błędem.

Dokładniej stężenie wolnych rodników można oznaczyć dokonując jednoczesnego zapisu widma substancji i krystalicznego wzorca (31) paramagnetycznego jonu Mn^{2+} wbudowanego do monokryształu MgO w temperaturze $1100^{\circ}C$ (65, 99). Widmo takiego wzorca wykazuje nadsubtelną strukturę o sześciu składowych, których odległość wynosi 88,5Oe, a jego czynnik g równy jest 2,0059 (47, 95).

Za pomocą wzorca z Mn^{2+} można również wyznaczyć czynnik g . Właściwe wyznaczanie czynnika g zależy od dokładności pomiaru natężenia pola magnetycznego i częstotliwości, przy czym jednoczesny ich pomiar jest często trudny (1, 156). Przy użyciu wzorca Mn^{2+} wystarcza jednak znajomość tylko jednej z tych dwóch wielkości. Jeżeli znana jest częstotliwość mikrofalowa to czynnik g można obliczyć ze wzoru 14:

$$g_x = \frac{g_w}{1 + \frac{(a_1 - a)}{2a} \frac{\Delta H \beta}{h\nu} g_x} \quad 14$$

gdzie g_w — czynnik g wzorca Mn^{2+}

ΔH — odległość między sąsiednimi liniami nadsubtelnej struktury wzorca Mn^{2+} równa 88,5Oe

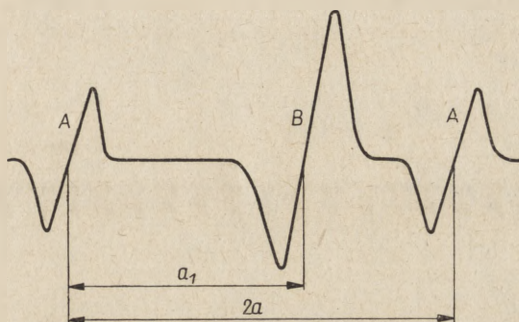
β — magneton Bohra

h — stała Plancka

a_1 i a_2 — odległości przedstawione na rysunku 6.

Jeżeli natomiast znane jest natężenie pola magnetycznego to czynnik g badanej substancji można obliczyć ze wzoru 15:

$$g_x = \frac{g_w}{1 \pm \frac{(a_1 - a)}{2a} \frac{H}{H_w}} \quad 15$$



Rys. 6. Widmo ERP badanej substancji zapisane jednocześnie z trzecią i czwartą linią nadsubtelnej struktury Mn^{2+} (wg 31)

A — trzecia i czwarta linia nadsubtelnej struktury wzorca Mn^{2+} .

B — widmo ERP badanej substancji

Pomiary stężenia i czynnika g wolnych rodników za pomocą wzorca wewnętrznego ze względu na swą prostotę i stosunkowo dużą dokładność są obecnie często stosowane w badaniach biochemicznych.

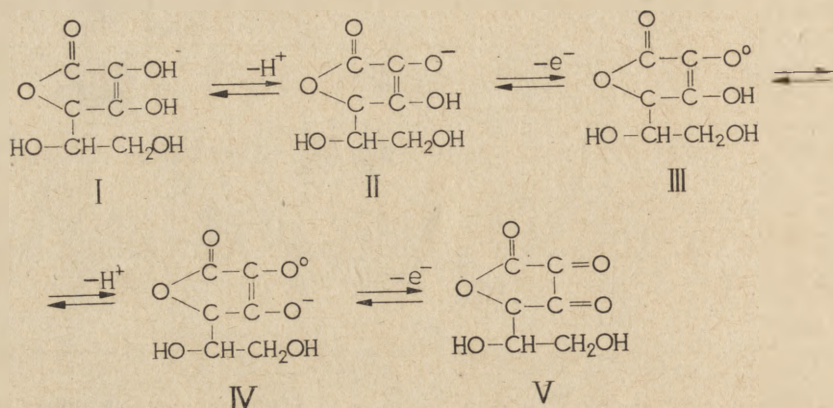
V. Badanie kinetyki reakcji biochemicznych metodą ERP

Według teorii Michaelisa w procesach metabolicznych przenoszenie elektronów prowadzi do powstania niewielkiej stałej puli wolnych rodników. Określenie tej puli może wyjaśnić mechanizm danej reakcji. Przykładem może być identyfikacja wolnych rodników przy oddziaływaniu kwasu askorbinowego z różnymi białkami. Na podstawie analizy widma ERP można przypuszczać, że produktem pośrednim utleniania witaminy C do kwasu dehydroaskorbinowego jest jon-rodnik typu semichinonu (schemat 1).

Reakcje $II \rightarrow III$ oraz $IV \rightarrow V$ przebiegają tylko w obecności akceptorów elektronów. Ta właściwość witaminy C łatwego oddawania elektronów odpowiednim akceptorom z wytworzeniem jonu-rodnika typu semichinonu warunkuje według Runge i Blumenfelda (150) jej udział w wielu reakcjach enzymatycznych. Wniosek ten potwierdzają badania (22, 25, 125) nad redukcją jonu Cu^{2+} przez kwas askorbinowy w odpowiednich układach enzymatycznych.

Ryboflawina wchodząca w skład około 40 różnych enzymów daje

zawsze jednakowe widmo ERP niezależnie od metod redukcji ($H = 170e$, czynnik $g = 2,004$). Wykazuje ono nadształną strukturę: w środowisku kwaśnym składa się z 32 linii składowych, a w środowisku obojętnym z 15, co świadczy o niejednakowych oddziaływaniach nieskompensowanego

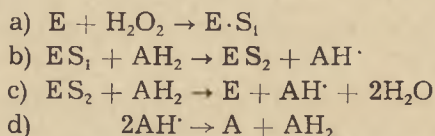


Schemat 1. Utlenianie kwasu askorbinowego do dehydroaskorbinowego

I — kwas askorbinowy, II — forma jonowa, III — obojętna forma rodnikowa. IV — jon rodnik typu semichinonu, V — kwas dehydroaskorbinowy

elektronu z protonami pierścieni aromatycznych w tych środowiskach. Dzięki temu można śledzić reakcję koenzymu z apoenzymem (13, 93, 96, 121, 122, 132).

Yama zaki i wsp. (175, 176, 177) szczegółowo rozpatrzyli powstawanie produktów przejściowych przy działaniu peroksydazy na różne substraty. Badania przeprowadzone w komorze przepływowej przy temperaturze pokojowej, pozwalają oprócz identyfikacji produktów przejściowych wyznaczyć stałe prędkości poszczególnych etapów reakcji zachodzącej według schematu:



gdzie E — peroksydaza, AH_2 — kwas askorbinowy

AH^\bullet — wolny rodnik kwasu askorbinowego

ES_1 — pierwszy przejściowy kompleks enzym-substrat

ES_2 — drugi przejściowy kompleks enzym-substrat

A — kwas dehydroaskorbinowy

Z prostych matematycznych rozważań wynika, że stężenie wolnych rodników $[\text{AH}^\bullet]$ jest proporcjonalne do pierwiastka kwadratowego ze

stężenia enzymu. Stosując podobną metodę zbadano kinetykę reakcji oksydoredukcyjnych w układzie zawierającym cytochrom C, hydrochinon i n-benzochinon. Reakcja cytochromu C z hydrochinonem znacznie przyspiesza się w układzie zawierającym n-benzochinon. Uzyskane w ten sposób dane ERP pozwoliły również obliczyć stałe prędkości poszczególnych etapów reakcji.

Liczna jest grupa prac poświęconych badaniu wpływu metali na reakcje enzymatyczne. Wiele jonów metali zawiera nieskompensowany elektron, który łatwo przyłącza się do wolnego rodnika (74, 123). Dzięki temu metale mogą stabilizować wolne rodniki organiczne i decydować o produktach reakcji. Metodą ERP zbadano rolę różnych metali w układzie enzym-metal-substrat (35, 105, 116, 126, 127). Stosując jon Mn^{2+} ustalono, że w takim układzie stężenie jonu metalu zmienia się równoległe do zmiany stężenia wolnych rodników.

W podobny sposób tłumaczy się działanie oksydazy p-dwufenolowej, która katalizuje przenoszenie elektronów z p-dwufenoli i p-dwuamin na tlen cząsteczkowy. Badania ERP dowodzą, że w czasie takiej reakcji miedź wchodząca w skład enzymu zmienia swą wartościowość, co powoduje zmianę rozkładu gęstości elektronowej w cząsteczce. Analogiczne zjawisko spotyka się w innych enzymach np. w ceruloplazminie (125, 131). Oprócz badania reakcji enzymatycznych, metoda ERP umożliwia badanie kinetyki reakcji nieenzymatycznych np. denaturacji białka i rozpadu związków kompleksowych (65, 69, 151).

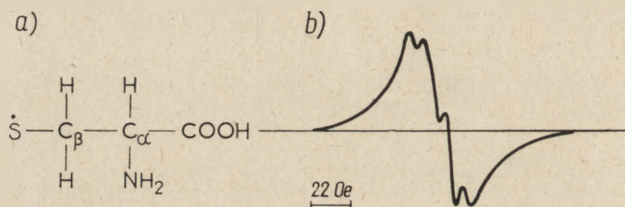
Holloc her (64) wykazał metodą ERP, że w przebiegu denaturacji oksyhemoglobiny następuje utlenienie jej w methemoglobinę lub podobny związek, a stężenie centrów paramagnetycznych nieodwracalnie maleje. Poza tym widma ERP pozwalają wnioskować o istnieniu conajmniej dwóch kompleksów heminy ze zdenaturowaną globuliną. Zbadano wpływ szeregu organicznych rozpuszczalników i ich soli na wartość sygnału ERP w funkcji temperatury. Ustalono, że w niektórych układach procesy denaturacyjne zachodzą już w temperaturze 25°C. Większa część przebadanych organicznych związków z wyjątkiem gliceryny i sacharozy obniża temperaturę denaturacji. Ślady nieorganicznych soli na przykład jodek potasu obniżają, a aniony wysalające białka podwyższają temperaturę denaturacji hemoglobiny.

VI. Badanie pierwotnych zjawisk radiologicznych metodą ERP

Metoda ERP umożliwia wykrycie i identyfikację wolnego rodnika powstałego w wyniku oddziaływania promieniowania jonizującego na materiał biologiczny (86, 87, 88, 115, 136, 147, 172, 180, 181, 182).

W cząsteczkach oraz w złożonych układach jak przetrwalniki, bakterie, nasiona, promieniowanie jonizujące wytwarza dużą ilość wolnych

rodników (36). Przy niskich dawkach ilość ich jest proporcjonalna do pochłoniętej dawki, a przy dawkach rzędu megaradów osiąga pewien stan nasycenia (180, 181). Ze względu na szybką rekombinację wolnych rodników badania przeprowadza się na suchych preparatach lub w różnych matrycach zamrożonych do temperatury 77°K (177). W taki sposób określono rodniki powstałe przez napromienianie aminokwasów, kwasów nukleinowych i białek (17, 18, 57). Gordy stwierdził, że napromienianie białka daje dwa typy widma ERP (58), pochodzące od dwóch rodników. Pierwszy z nich zwany rodnikiem cysteinowym powstaje w wyniku rozzerwania i jonizacji jednego z atomów siarki cysteiny. W ten sposób tworzy się jeden wolny elektron na fragmencie cząsteczki SR. Rodnik cysteinowy i jego widmo ERP przedstawia rysunek 7.

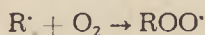


Rys. 7. Wolny rodnik cysteinowy (a) i jego widmo ERP (b) (wg 141)

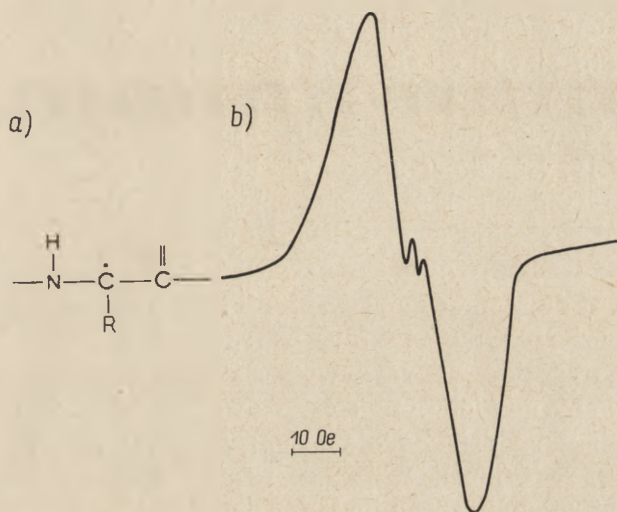
Tego typu rodnik tworzy się również po napromienianiu cysteiny w temperaturze 77°K (141). Widmo posiada nadsubtelną strukturę o intensywności 1 : 3 : 3 : 1, a szerokość wynosi około 70 Oe. Struktura nadsubtelna wytwarza się przez oddziaływanie z nieskompensowanym elektronem dwóch protonów przy atomie C_{α} i jednego przy C_{β} . Po ogrzaniu do temperatury pokojowej opisane widmo przekształca się stopniowo w sygnał o szerokości około 120 Oe i $g = 2,0249$. Intensywność jego zależy od ilości aminokwasów zawierających siarkę (141, 142). Drugi typ rodnika i jego widmo ERP przedstawia rysunek 8.

Rodnik ten nosi nazwę peptydowego. Powstaje on przez odłączenie atomu wodoru od atomu węgla łączącego peptydowe grupy białka, które zostało napromienione w warunkach beztlenowych. Nieskompensowany elektron nie jest zlokalizowany na orbitalu p atomu węgla, lecz prawie połowa jego gęstości spinowej przyporządkowana jest całej cząsteczce. Obliczenia Pulmana i Pulmana (138), sugerują, że na protonie związanym z atomem azotu gęstość spinowa wynosi 0,3. Nadsubtelna struktura, uwarunkowana oddziaływaniem między magnetycznym momentem nieskompensowanego elektronu a magnetycznym momentem protonu, jest proporcjonalna do gęstości spinowej. Wobec tego powstaje nadsubtelna struktura widma w postaci słabo wyrażonego dubletu o szerokości około 15 Oe z czynnikiem g zbliżonym do wolnego elektronu. Sygnał białka napromienionego w powietrzu nie wykazuje na ogół nadsubtelnej struktury

dzięki tzw. efektowi tlenowemu. Gordy (57) sądził, że mechanizm tego zjawiska polega na tworzeniu rodników typu $ROO\cdot$ w myśl reakcji:



Para wodna nie wpływa na zmianę charakteru tego sygnału (139, 140). Ale nie tylko tlen modyfikuje widmo ERP napromienionych związków, lecz także naświetlenie ultrafioletem wywołuje zmianę widma ERP białka i aminokwasów w matrycach stałych (63, 84, 120). W tryptofanie ultra-



Rys. 8. Wolny rodnik peptydowy (a) i jego widmo ERP (b) (wg 115)

fiolet zmienia poziom i rodzaj rodników (również w obecności światła widzialnego) (7). W roztworze tryptofanu zachodzi fotojonizacja z wytworzeniem dodatniego jonu rodnika. Schwytane przez matrycę elektrony przechodzą na niższy poziom energetyczny. Po naświetleniu światłem długofalowym elektrony rekombinują z wolnymi rodnikami (9, 21, 83). Widmo napromienionych aminokwasów i białek zależy od zawartości siarki i może ono być typu rodnika cysteinowego, peptydowego lub widma ze słabo wyrażoną nadsubtelną strukturą.

Widmo napromieniowanych kwasów nukleinowych nie jest rezultatem nałożenia się widm poszczególnych ich elementów. Nieskompensowane elektrony lokalizują się głównie w pierścieniu adeninowym i cytozynowym. Gęstość spinowa na guaninie i tyminie jest bardzo mała. Gordy i Rexraad (58) wyjaśnienie tego zjawiska znajdują w stosunkowo łatwym przemieszczaniu nieskompensowanego elektronu wzdłuż całego łańcucha cząsteczek. W czasie takiej wędrówki zachodzi rekombinacja z innymi wolnymi rodnikami. Najwięcej wolnych rodników tworzy się z adeniny, a najmniej z tyminy. Migracja energii między kwasami

nukleinowymi a białkami zachodzi w niewielkim stopniu (3). DNA poddany działaniu promieniowania X daje widmo bez nadsubtelnej struktury o połówkowej szerokości 6—8 Oe (20, 51, 52, 152). W zależności od ułożenia spirali w stosunku do kierunku natężenia pola magnetycznego szerokość widma oraz wartość czynnika g ulegają zmianie.

Aleksander i Lett (3) badali widmo ERP czystych napromienionych preparatów DNA i porównywali je z widmem uzyskiwanym z główek nasienia łosia napromienionych ^{60}Co . Badania wykazały, że widma DNA w temperaturze 77°K są bardzo podobne. Znaczne różnice występują w temperaturze pokojowej, przy której zachodzi rekombinacja rodników. Badania nad rekombinacją rodników napromienionych białek wykazały, że to zjawisko zależy od ich struktury drugorzędowej (101, 102).

W napromienionej hemoglobinie w atmosferze tlenu azotu Gordy rozróżnia trzy typy paramagnetycznych centrów (50, 118). Centra pierwszego typu uwarunkowane są obecnością jonów żelaza pierścienia hemu. Dają one bardzo szeroki sygnał, który można wykryć w temperaturze ciekłego helu. Centra drugiego typu związane są z grupą NO. W temperaturze pokojowej dają one sygnał o średniej szerokości.

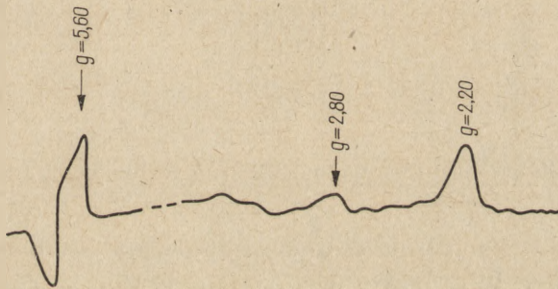
Centra trzeciego typu powstają na skutek napromienienia. Widmo ERP wykazuje 2 składowe, co dowodzi, że nieskompensowany elektron jest zlokalizowany na globulinie stosunkowo daleko od pierścienia hemu. Dzięki temu nie ma oddziaływania z centrami paramagnetycznymi pierwszego i drugiego rodzaju. Działanie promieniowania jonizującego na układ enzym-substrat wywołuje jego inaktywację. W takich układach dla inaktywacji enzymu wystarcza pojedyncza jonizacja w dowolnym punkcie kompleksu (5).

VII. Badanie metodą ERP struktury i stanów tripletowych cząsteczek

ERP stwarza doskonałą możliwość badania struktury związków zawierających jon paramagnetyczny w otoczeniu grup funkcyjnych. Współczynnik g i stała oddziaływania nadsubtelnego nieskompensowanego elektronu dają dodatkową informację o wiązaniu jonu paramagnetycznego, oraz umożliwiają śledzenie przenoszenia gęstości spinowej z jonu centralnego na pozostałe elementy cząsteczki (70, 162, 178). Zagadnienie to zilustrujemy na przykładzie cząsteczki hemoglobiny. W hemie atom żelaza tworzy 6 koordynacyjnych wiązań. Cztery z nich związane są z atomami azotu w płaszczyźnie hemu, dwa pozostałe są prostopadłe do płaszczyzny pierścienia hemu (59). Jedno z nich wiąże się z globuliną, drugie z grupą X, którą może być O_2 , CO , H_2O , NO . W methemoglobinie grupą X jest H_2O , a żelazo występuje w postaci utlenionej. Widmo ERP jonów żelaza zależy od typu jego wiązania z grupami funkcyjnymi. W utlenionym

żelazie Fe^{3+} występuje 5 elektronów ze spinami zgodnie skierowanymi, z których każdy znajduje się na oddzielnym orbitalu 3d. W hemoglobinie znajdują się one w silnym polu krystalicznym. Tworzą one w myśl zasady Pauliego 2 pary oraz jeden elektron nieskompensowany. Wobec tego Fe^{3+} posiada spin o wartości $1/2$, a czynnik g widma ERP będzie zbliżony do czynnika g wolnego elektronu.

Ingram badał ERP różnych pochodnych hemoglobiny. Dla kwaśnej ferrihemoglobiny czynnik g wynosi 5,9, co bardzo wyraźnie świadczy o silnym zaburzeniu jonu Fe^{3+} przez pozostałe grupy funkcyjne cząsteczek. Czynnik g posiada osiową symetrię i wartość jego zależy od położenia płaszczyzny hemu w stosunku do kierunku natężenia stałego pola magnetycznego (71, 73, 90, 106, 109, 168). Widmo ERP methemoglobiny uzyskane przez Gordy'ego i Shields'a (59) pokazuje rysunek 9, na którym jest wyraźny szeroki sygnał od jonu żelaza $g = 5,60$ i mniej intensywny sygnał z czynnikiem $g = 2,20$. Pomiary wykonano w temperaturze ciekłego helu. Widmo ERP świadczy o istnieniu jonowych wiązań w cząsteczce hemoglobiny. W azydku hemoglobiny i cytochromie c czynnik g przybiera wartość zbliżoną do 2, a zatem w tych kompleksach wiązania są typu kowalentnego.



Rys. 9. Widmo ERP methemoglobiny (wg 59)

Metodą ERP można badać konfigurację i typ wiązania w enzymach zawierających Cu^{2+} . Tyrozynaza daje widmo ERP w postaci pojedynczej linii o g równym 2,00 (22). ERP stosowano do badania kompleksów, w których zachodzi przemieszczenie ładunku (2, 60). Zastosowanie metody ERP w tych wypadkach jest jednak ograniczone. Większe znaczenie posiada ERP w badaniu wolnych rodników związków, których widma wykazują nadsubtelną strukturę, jak na przykład chloropromazyny, fenotiazyny (53, 134, 135), lub niektórych witamin (16, 153). Widmo ERP semichinonu witaminy K (rysunek 10) składa się z 21 składowych. Nadsubtelna struktura jest wynikiem oddziaływania nieskompensowanego elektronu z protonami metylowych i metylenowych grup cząsteczki.

Oprócz badania konfiguracji i typu wiązania w kompleksach metoda ERP pozwala na określenie stanów energetycznych cząsteczek. J a b ł o ń-

s k i (77) już w roku 1935 podał i przedyskutował teorię poziomów elektronowych cząsteczek wykazujących w odpowiednich warunkach nie tylko zjawisko fluorescencji lecz również fosforescencji. Jednym z założeń tej teorii jest występowanie poziomu metatrwałego, który leży poniżej poziomu wzbudzonego. Przejście z poziomu wzbudzonego na poziom podstawowy może nastąpić bezpośrednio lub też pośrednio poprzez poziom metatrwały. Fosforescencja cząsteczek organicznych związana jest z istnieniem metatrwałego stanu, który jest stanem tripletowym o spinowej liczbie kwantowej S równej 1. Wobec tego cząstki w stanie tripletowym posiadają dwa nieskompensowane spiny. Przejścia promieniste ze stanu tripletowego do singletowego ze względu na zakaz interkombinacji są silnie wzbronione i dlatego czas przebywania cząstek w stanie tripletowym jest stosunkowo długi.

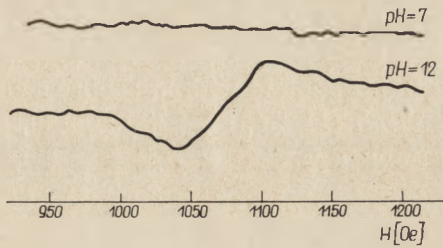


Rys. 10. Nasubtelna struktura widma ERP semichinonu witaminy K (wg 15)

ERP w cząsteczkach organicznych najłatwiej jest badać w bezpostaciowych szklkach lub roztworach. Ale wtedy występuje silne oddziaływanie typu dipol-dipol między dwoma spinami. Powstaje zjawisko anizotropii, która daje silną zależność absorpcji rezonansowej od kierunku nateżenia wektora pola magnetycznego. Badanie stanów tripletowych jest więc utrudnione i dopiero Hutchinson i Magnum (67, 68) wykazali istnienie stanów tripletowych naftalenu w monokryształe durenenu metodą ERP.

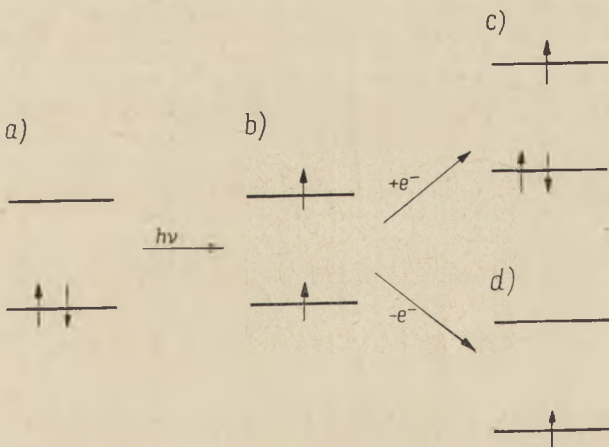
Dopiero niedawno wykryto metodą ERP stan tripletowy w cząsteczkach ośrodków bezpostaciowych obserwując przejścia $\Delta m = 2$, w których anizotropia jest dużo mniejsza (14, 61, 168). Ostatnio stwierdzono, że w temperaturze ciekłego azotu, można obserwować w ciałach bezpostaciowych nawet przejścia $\Delta m = 1$ (34, 46, 62). Dla niektórych cząstek stanem podstawowym może być stan tripletowy, ale najczęściej stwierdza się go przy fotowzbudzeniu. Metodą ERP stwierdzono tripletowe stany w chlorofilu (149) aminokwasach fotosensybilizowanych barwnikami (10) i białkach (157, 158).

Shulman i Rahn (159) zbadali stany tripletowe różnych zasad pirymidynowych i purynowych metodą ERP. Oprócz normalnie występujących rezonansowych linii, autorzy spostrzegli dodatkowe linie ERP uwarunkowane zjonizowanymi stanami tyminy i 5-metylocytozyny. Widmo ERP stanu tripletowego TMP pokazuje rysunek 11. Wyraźny sygnał występuje tylko przy pH 12.



Rys. 11. Widmo ERP stanu tripletowego TMP (wg 159)

W niektórych układach porfiryńowych np. w cząsteczce chlorofilu prawdopodobieństwo istnienia stanu tripletowego przy fotowzbudzeniu jest stosunkowo duże (55). Stan taki jest zjawiskiem pierwotnym. Zjawisko redukcji i utleniania można traktować jako etap następnego stanu tripletowego, co sugeruje prosty schemat White i Tollina (173) podany na rysunku 12. W układzie porfiryńowym orbital o większej energii jest pusty, a dolny jest zajęty (rysunek 12a). Pod wpływem kwantu światła jeden elektron obsadza orbital o większej energii. Układ porfiryńowy jest w stanie tripletowym (rysunek 12b). Redukcję i utlenianie traktować można jako „produkt” stanu tripletowego (rysunek 12c i 12d).



Rys. 12. Redukcja i utlenianie porfiryńy jako „produkt” stanu tripletowego (wg 173)

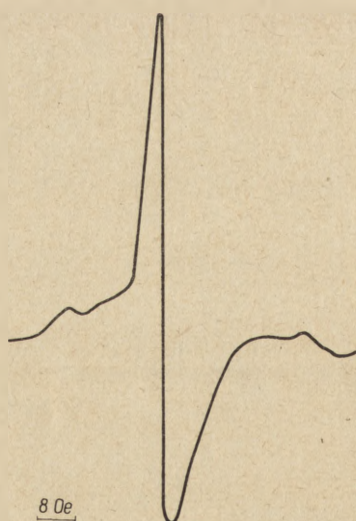
VIII. ERP w tkankach, komórkach i strukturach subkomórkowych

Commer i wsp. (39) za pomocą metody ERP stwierdzili po raz pierwszy występowanie wolnych rodników w liofilizowanych tkankach królika i u roślin. Okazało się, że stosunkowo wysoki poziom wolnych rodników jest charakterystyczny dla tkanek o dużej aktywności metabolicznej (wątroba i nerka). Wolne rodniki są związane głównie z frakcją białkową przy czym denaturacja białka wyraźnie zmniejsza ich stężenie. Tkanki zwierzęce i roślinne dają widma ERP w postaci pojedynczej linii o połówkowej szerokości około 10 Oe, ich czynniki g są zbliżone do czynnika g wolnego elektronu. Podobne widmo zaobserwowali i inni autorzy w liofilizowanych tkankach (11, 54, 82, 92, 108, 130, 133, 166, 167) i ich wodnych ekstraktach (tablica I).

Tablica 1

Stężenie wolnych rodników w tkankach szczura (wg 104)

Tkanka	Stężenie wolnych rodników mol/g $\times 10^{-9}$	Czynnik g	H
Wątroba	$8,58 \pm 0,62$	$2,004 \pm 0,0003$	$13,6 \pm 0,2$
Nerki	$5,63 \pm 0,33$	$2,004 \pm 0,0002$	$13,7 \pm 0,4$
Serce	$4,74 \pm 0,42$	$2,003 \pm 0,0002$	$14,0 \pm 0,9$
Śledziona	$0,99 \pm 0,12$	$2,002 \pm 0,0005$	$13,3 \pm 0,5$
Płuca	$0,79 \pm 0,09$	$2,001 \pm 0,0005$	$14,4 \pm 0,5$
Mięśnie	$1,26 \pm 0,4$	$2,002 \pm 0,0001$	$13,8 \pm 1,4$
Krew	0,1		



Rys. 13. Asymetryczne widmo tęczęwki w temperaturze 77°K (wg 114)

Tkanki zawierające substancje barwnikowe wykazują w przybliżeniu ten sam typ widma ERP (42, 43, 48, 49, 113, 114). Widmo ERP tkanek jest asymetryczne, a jego typowy kształt podano na rysunku 13.

Możliwość wykrycia sygnału ERP w tkankach zależy w dużej mierze od odpowiedniego przygotowania próbki, od rodzaju otaczającej atmosfery, jej wilgotności oraz temperatury (97, 119, 127, 165). Suchy tlen nie wpływa na poziom wolnych rodników w liofilizowanych preparatach biologicznych (78), natomiast wilgotne powietrze w znacznym stopniu modyfikuje intensywność sygnałów ERP. W początkowej fazie amplituda widma wzrasta, a następnie maleje. Zjawisko to jest wynikiem sorpcji rozpuszczalnika. Zależnością między stężeniem wolnych rodników a określonym stanem fizjologicznym lub patologicznym danej tkanki zajmuje się wielu badaczy (56, 57). Okazało się na przykład, że ilość centrów paramagnetycznych podczas skurczu mięśnia zmniejsza się (154). Ilość wolnych rodników jest mniejsza w atrofii mięśni, zaś w stanach zapalnych większa niż w zdrowym mięśniu (8). Stężenie wolnych rodników wzrasta w tkankach poddanych działaniu różnych czynników fizycznych i chemicznych (11).

Pake nie stwierdził znaczących różnic między stężeniem wolnych rodników w tkankach zdrowych i objętych procesem nowotworowym (126). Jednak zdaniem innych badaczy (124, 130) poziom wolnych rodników zwiększa się w niektórych stanach nowotworowych, na przykład w białaczce limfatycznej ich stężenie wzrasta czterdziestokrotnie. Vithayathil i wsp. (170) stwierdzili zwiększenie szerokości linii widma ERP wątroby szczura poddanego działaniu substancji rakotwórczej. Powyższe spostrzeżenie potwierdzają również Mallard i Kent (104). Nie uzyskano jednak dowodów na potwierdzenie hipotezy, według której nowotworowa aktywność związków chemicznych byłaby zależna od łatwości tworzenia przez nie wolnych rodników w obecności łagodnych środków redukujących (98, 107). Kości zwierząt różnych gatunków wykazują różne widma ERP (12). Szerokość połówkowa linii kości ludzkich wynosi około 18 Oe, u zwierząt zimnokrwistych przybiera wartość 100 Oe. Wartość czynnika g zmienia się w zależności od położenia beleczek kostnych w stosunku do kierunku natężenia pola i przyjmuje wartość od 2,0 do 2,3. Dwa typy wolnych rodników wykryto w komórkach drożdży (171). Również w jajach, zarodkach i gonadach jeźowca zarejestrowano dwa pojedyncze sygnały o szerokości 12 Oe i 70 Oe (103). Prawdopodobnie sygnał o małej szerokości należy przypisać obecności enzymów oddechowych, a szeroki uwarunkowany jest układem białka i barwników karotenowych. Karotenoidy wyodrębnione z komórek jajowych jeźowca są paramagnetyczne niezależnie od naświetlania promieniowaniem widzialnym. Liofilizowana skóra żaby wykazuje obecność dwóch typów paramagnetycznych centrów (89, 160), jednego związanego prawdopodobnie

z aktywnym transportem jonów, a drugiego z metabolizmem wewnątrzkomórkowym. Rolę wolnych rodników w zjawisku fotosyntezy usiłowano wyjaśnić badając ERP chlorofilu, chloroplastów, wodorostów i fotosyntezujących bakterii (24, 28, 79, 85, 148, 149). Wyniki tych badań dały szereg nowych informacji o mechanizmie fotosyntezy.

Commoner i Hollocher (37, 38) zarejestrowali widmo ERP w mitochondriach. Hamując odpowiednimi inhibitorami kolejno poszczególne reakcje w łańcuchu oddechowym, autorzy doszli do wniosku, że nieskompensowany elektron lokalizuje się na flawinie dehydrogenazy. Poziom wolnych rodników w mitochondriach zależy od stanu metabolicznego tkanki poddanej ekstrakcji. Wkład mitochondriów w ogólny sygnał ERP całych komórek jest mały i wynosi w przybliżeniu 4%. Sygnały otrzymane z samych jąder komórek są jeszcze mniejsze, a protoplazma daje około 25% ogólnego sygnału (26, 143, 144, 145, 146). Przypuszcza się, że sygnały ERP tkanek, komórek i struktur subkomórkowych uwarunkowane są jonowo-rodnikowymi formami połączeń typu chinonów, tworzącymi się przy ich stopniowym utlenianiu i redukcji. Nieobecność nadsubtelnej struktury charakterystycznej dla każdego organicznego rodnika, związana jest z ich sorpcją na powierzchni cząsteczki białka (44, 45).

LITERATURA

1. Adams M., Blois M. S., Sands R. H., *J. Chem. Phys.* **28**, 774 (1958).
2. Ajbinder N. J., Grecziszkin W. S., Subbotin G. I., *Opt. Spekr.* **18**, 108 (1965).
3. Aleksander P., Lett J. T., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 207 (1961).
4. Altszuler S. A., Kozyriew B. M., *Elektronowy Rezonans Paramagnetyczny* PWN, Warszawa 1965.
5. Aripowa D. F., Sanassi E. F., Kajuszin L. P., Pułatowa M. K., Eidus L. Ch., *Biofizika* **12**, 206 (1967).
6. Assenheim H. K., *Lab. Pract.* **13**, 1079 (1964).
7. Ayscongh P. B., Thomson C., *J. Chem. Soc.* str. 2855 (1962).
8. Azipa J. I., *Biofizika* **10**, 500 (1965).
9. Azipa J. I., Kajuszin L. P., Lwow K. M., *Biofizika* **7**, 610 (1962).
10. Azizowa C. A., *Biofizika* **9**, 745 (1964).
11. Azizowa C. A., Kajuszin L. P., Pułatowa M. K., *Biofizika* **11**, 970 (1966).
12. Becker R. O., *Nature* **199**, 1304 (1963).
13. Beinert H. I., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5323 (1956).
14. Bijl D., Kainer H., Rose-Innes A. C., *J. Chem. Phys.* **30**, 765 (1959).
15. Blois M. S., Maling J. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 132 (1960).
16. Blois M. S., Zahlen A. B., Maling J. E., *Biophys. J.* **4**, 471 (1964).
17. Blumenfeld L. A., Kalmanson A. E., *Biofizika* **2**, 546 (1957).
18. Blumenfeld L. A., Kalmanson A. E., *Biofizika* **3**, 87 (1958).
19. Blumenfeld L. A., Wojewodskij W. W., Siemienow A. G., *Priemienienije elektronnoho paramagnitnoho rezonansa w chimii*, AN SSSR Nowosybirsk 1962.
20. Boag J. W., Müller A., *Nature* **183**, (1959).

21. Bonner T. G., Duncan A., *Nature* **194**, 1078 (1962).
22. Bonchilloux S., Mc Manill P., Mason H. S., *J. Biol. Chem.* **238**, 1699 (1963).
23. Borg D. C., *Nature* **201**, 1087 (1964).
24. Brody S. S., Newell G., Gasther T. I., *J. Phys. Chem.* **64**, 554 (1960).
25. Broman L., Malmström B. G., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 365 (1963).
26. Brzewska O. H., Kajusz L. P., Kondraszewa M. H., Niedielina O. S., *Biofizika* **11**, 1076 (1966).
27. Brzewska O. H., Marinov W. S., Niedielina O. S., Szeksiejew E. M., *Biofizika* **12**, 354 (1967).
28. Burnow N. N., Krasnawskij A. A., Umridina A. S., Cepałow W. F., Szlapintoch W. J., *Biofizika* **5**, 121 (1960).
29. Chance B., Bicking L., Legullais V., w Swobodnyje radikaly w biologiczeskich sistiemach, red. L. A. Blumenfeld, Moskwa 1963 str. 133.
30. Chance B., Legallais V., *Rev. Sci. Instr.* **30**, 735 (1959).
31. Charitomienkow I. G., *Biofizika* **11**, 905 (1966).
32. Charitomienkow I. G., *Biofizika* **12**, 224 (1967).
33. Charitomienkow I. G., Kalmanson A. E., Czietwiernikow A. G., Blumenfeld L. A., *Biofizika* **9**, 172 (1964).
34. Charles S. W., Fischer P. H., Mc Dowell C. A., *Mol. Phys.* **9**, 517 (1965).
35. Cohn M., Leigh I. G., *Nature* **193**, 1037 (1962).
36. Commoner B., Heise I. I., Lipincott B. B., Norberg R. E., Passonneau J. V., Towsend J., *Science* **126**, 57 (1957).
37. Commoner B., Hollocher T. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **46**, 405 (1960).
38. Commoner B., Hollocher T. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **46**, 416 (1960).
39. Commoner B., Towsend J., Pake G., *Nature* **174**, 689 (1954).
40. Cook P., Mallard I. R., *Nature* **198**, 145 (1963).
41. Cook R. J., Whiffen D. H., *Advan. Phys. Med. Biol.* **7**, 277 (1962).
42. Cope F. W., *J. Chem. Phys.* **40**, 2653 (1964).
43. Cope F. W., Sever R. J., Polis B. D., *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 171 (1963).
44. Czietwiernikow A. G., Blumenfeld L. A., Famin G. B., *Biofizika* **10**, 169 (1965).
45. Czietwiernikow A. G., Kalmanson A. E., Charitonienkow I. G., Blumenfeld L. A., *Biofizika* **9**, 18 (1964).
46. Douzeu P., Ptah M., Ropars C., *Nature* **197**, 1105 (1963).
47. Eastman I. W., Saylor M. A., Calvin M., *J. Chem. Phys.* **36**, 1197 (1962).
48. Edwards M., Kerkut G. A., Munday K. A., Ingram D. I., Saxena M. C., Leach K., *Nature* **184**, 1402 (1959).
49. Edwards M., Kerkut G. A., Munday K. A., Leach K., *Nature* **190**, 1005 (1961).
50. Ehrenberg A., Ehrenberg L., Löfroth G., *Nature* **200**, 376 (1963).
51. Ehrenberg A., Erikson L., Gören E., *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 453 (1964).
52. Elliott I. P., Wyard S. I., *Nature* **208**, 483 (1965).
53. Forest J. S., Forest F. M., Begler M., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 441 (1958).
54. Fujimori E., Livingston R., *Nature* **180**, 1036 (1957).
55. George O., Ingram D. J., Nicholls P., *Nature* **182**, 1398 (1958).
56. Gibson J. E., Ingram D. J., *Nature* **178**, 871 (1956).
57. Gordy W., *Radiation Res. Suppl.* **1**, 491 (1959).

58. Gordy W., Rexraad H. N., w Swobodnyje radikaly w biologiczeskich sistemach red. L. A. Blumenfeld, Moskwa 1963, str. 312.
59. Gordy W., Shields H. I., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **46**, 1124 (1960).
60. Grecziszkin W. S., *Opt. Spekr.* **20**, 532 (1966).
61. Grot M S., Waals J. H., *Mol. Phys.* **3**, 190 (1960).
62. Henn D. W., Whifen D. A., *Mol. Phys.* **8**, 407 (1964).
63. Henriksen Th., Sanner J., Pihl A., *Radiation Res.* **18**, 147 (1963).
64. Hollocher Th. C., *J. Biol. Chem.* **241**, 1958 (1966).
65. Hollocher Th. C., Weber M. M., *Nature* **195**, 247 (1962).
66. Honning J. C., *Rev. Scient. Ingram.* **32**, 35 (1961).
67. Hutchinson C. A., Magnum B. W., *J. Chem. Phys.* **29**, 952 (1958).
68. Hutchinson C. A., Magnum B. W., *J. Chem. Phys.* **34**, 908 (1961).
69. Ilnina A. N., Naktinis I. I., Maszkowskij J. Sz., Blumenfeld L. A., *Biofizika* **12**, 181 (1967).
70. Ingram D. J. E., *Free Radicals as Studied by Electron Spin Resonance*, New York 1958.
71. Ingram D. J. E., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 392 (1961).
72. Ingram D. J. E., *Lab. Pract.* **3**, 1056 (1964).
73. Ingram D. J. E., Kendrew I. C., *Nature* **178**, 905 (1958).
74. Ingraham L. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **81**, 309 (1959).
75. Isenberg I., *Physiol. Rev.* **44**, 487 (1964).
76. Itoh K., Miyagawa I. J., *J. Chem. Phys.* **40**, 3328 (1964).
77. Jabłoński A., *Acta Phys. Polon.* **4**, 311 (1935).
78. Kalmanson A. E., Charitonienkow I. G., Czetwierikow A. G., Blumenfeld L. A., *Biofizika* **8**, 722 (1963).
79. Kalvin M., w *Sowremiennyje problemy biofiziki*, tom I red. G. M. Frank Moskwa 1962, str. 203.
80. Kenlein W., Muller A. E., w *Swobodnyje radikaly w bioł. sist.* red. L. A. Blumenfeld, Moskwa 1963 str. 145.
81. Kent M., Mallard J. R., *J. Scient. Inst.* **42**, 505 (1965).
82. Kent M., Mallard J. R., *Nature* **215**, 736 (1967).
83. Kirby-Smith J. S., *Radiation Res. Suppl.* **2**, 668 (1960).
84. Koch R., Mönig H., *Nature* **208**, 86 (1965).
85. Kohl D. H., Towsend J., Commoner B., Crespi H. L., Dougherty R. C., Katz J. I., *Nature* **206**, 1105 (1965).
86. Kołomiejcewa I. K., *Radiologija* **3**, 359 (1963).
87. Kołomiejcewa I. K., Kałuszkina L. P., Kuzin A. M., *Dokł. Akad. Nauk. SSSR* **147**, 951 (1962).
88. Kołomiejcewa I. K., Kajuszina L. P., Kuzin A. M., *Radiobiologija* **7**, 294 (1967).
89. Komietianin Z. P., *Biofizika* **10**, 352 (1965).
90. Kotani M., *Biopolymers* **2**, 67 (1964).
91. Kramer K., Müller-Warmuth W., *Z. Angew. Phys.* **16**, 281 (1963).
92. Krebs A. T., Benson B. W., *Nature* **207**, 1412 (1965).
93. Kubo H., Shiga T., Uozumi M., Izomato A., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **14**, 219 (1963).
94. Lebediew J. S., Armanow G. A., *Biofizika* **12**, 338 (1967).
95. Lindblom R. O., w *Swobodnyje radikaly w biologiczeskich sistemach* red. L. A. Blumenfeld, Moskwa 1963, str. 344.
96. Lindenmayer A., Smith L., *Biochim. Biophys. Acta* **93**, 445 (1964).
97. Lion M. B., Kirby-Smith I. S., Randolph M. L., *Nature* **192**, 34 (1961).
98. Lipkin P., Towsend I., Weissman S. J., *Science* **117**, 534 (1953).

99. Low W., *Phys. Rev.* **101**, 1827 (1956).
100. Low W., *Paramagnetic Resonance in Solids*, New York 1960.
101. Lwow K. M., *Biofizika* **10**, 212 (1965).
102. Lwow K. M., *Biofizika* **12**, 347 (1967).
103. Łukiewicz S., *Folia Biol.* **13**, 121 (1965).
104. Mallard J. R., Kent M., *Nature* **210**, 588 (1966).
105. Malmström B. G., Mosbach R., Vänngård T., *Nature* **183**, 321 (1959).
106. Mason H. S., Ingram D. J., Allen B., *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 225 (1960).
107. Mason R., *Nature* **181**, 820 (1958).
108. Mc Brierty V. I., Cook P. D., *Nature* **205**, 1197 (1965).
109. Mc Cornick G., Gordy W., *J. Phys. Chem.* **62**, 783 (1958).
110. Mc Lachlan A. D., *Mol. Phys.* **3**, 233 (1960).
111. Mc Lachlan A. D., Dearman H., Lefebvre R., *J. Chem. Phys.* **33**, 65 (1961).
112. Mehlkops A. F., Smith J., *Rev. Scient. Instrum.* **32**, 1421 (1961).
113. Mikulski T., *Klinika Oczna* **37**, 471 (1967).
114. Mikulski T., *Acta Fizj. Pol. w druku.*
115. Mikulski T., praca nieopublikowana
116. Mildram A. G., Cohn N., *Biochemistry* **2**, 910 (1963).
117. Minkoff G. I., *Zamrożone wolne rodniki*. Warszawa 1963.
118. Miyagawa I., Gordy W., *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1031 (1961).
119. Miyake J., Mason H. S., Langraf W., *J. Biol. Chem.* **242**, 393 (1967).
120. Möning H., Koch R., *Nature* **202**, 289 (1964).
121. Nakamura T., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 44 (1958).
122. Nakamura T., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 538 (1958).
123. Nakamura T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2**, 11 (1960).
124. Nebert D. W., Mason H. S., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 415 (1964).
125. Osaki S., Johnson D. A., Frieden E., *J. Biol. Chem.* **241**, 2746 (1966).
126. Pake G. E., *Discussion Faraday Soc.* **19**, 181 (1955).
127. Palmer G., Sands R. N., *J. Biol. Chem.* **241**, 253 (1966).
128. Palmer G., Sands R. N., Mortenson L. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 357 (1966).
129. Parker A. J., Lainé D. C., *J. Scient. Instr.* **43**, 688 (1966).
130. Pawłowa N. I., Liwienson A. R., *Biofizika* **10**, 169 (1965).
131. Peisach J., Lewine W. G., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 615 (1963).
132. Peterson G. A., Mac Lachlan A. D., *J. Chem. Phys.* **45**, 628 (1966).
133. Pietiajew M. M., Reznikow S. A., Tierieszczenko T. W., Czieriepniew I. E., Siusina T. G., *Biofizika* **12**, 357 (1967).
134. Piette L. H., Bulow G., Yakazaki J., *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 120 (1964).
135. Piette L. H., Forest J. S., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 419 (1962).
136. Powers E. L., Webb R. B., Ehret C. F., *Radiation Res. Suppl.* **2**, 94 (1960).
137. Pulman A., Pulman B., w *Molecular Orbitals in Chemistry, Physics and Biology*, red. P. O. Löwdin i B. Pulman, Academic Press New York, Londyn 1964, str. 547.
138. Pulman B., Pulman A., *Quantum Biochemistry*, Interscience Publ. New York Londyn 1963.
139. Pułatowa M. K., *Biofizika* **7**, 402 (1962).
140. Pułatowa M. K., *Biofizika* **8**, 632 (1963).
141. Pułatowa M. K., Azizowa O. A., *Biofizika* **9**, 33 (1964).

142. Pułatowa M. K., Rogulenkowa W. J., Kajuszyn L. P., *Biofizika* **6**, 548 (1961).
143. Rajchman L. M., *Biochimija* **31**, 277 (1966).
144. Rajchman L. M., *Biofizika* **12**, 352 (1967).
145. Rajchman L. M., *Biofizika* **12**, 563 (1967).
146. Rajchman L. M., Blumenfeld L. A., *Biochimija* **31**, 1127 (1966).
147. Redhard A., *Strahlentherapie* **109**, 133 (1959).
148. Richiriewa G. T., Gribowa Z. P., Kajuszyn L. P., Umrichina A. W., Krasnowskij A. A., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **159**, 196 (1964).
149. Richiriewa G. T., Kajuszyn L. P., Krasnowskij A. A., *Biofizika* **9**, 390 (1964).
150. Ruuge E. K., Blumenfeld A. A., *Biofizika* **10**, 689 (1965).
151. Ruuge E. K., Timoszenkow W. A., Blumenfeld L. A., *Biofizika* **11**, 611 (1966).
152. Salovey R., Shulman R. S., Walsh W. M., *J. Chem. Phys.* **39**, 839 (1963).
153. Sands R. H., Beinert H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1**, 175 (1959).
154. Sazomienko M. K., *Biofizika* **10**, 252 (1955).
155. Schmidt J. A., Solomon I., *J. Appl. Phys.* **37**, 3719 (1966).
156. Segal B. G., Kaplan M., Frankel G. K., *J. Chem. Phys.* **43**, 4191 (1965).
157. Shiga T., Piette L. H., *Photochem. Photobiol.* **3**, 213 (1964).
158. Shiga T., Piette L. H., *Photochem. Photobiol.* **3**, 223 (1964).
159. Shulman R. G., Rahn R. O., *J. Chem. Phys.* **45**, 2940 (1966).
160. Skou J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 6 (1960).
161. Stankowski J., *Post. Fizyki* **16**, 325 (1965).
162. Stankowski J., *Post. Fizyki* **18**, 93 (1967).
163. Stankowski J., Dezor A., *Prace Komis. Mat. Przyr.* **11**, 227 (1964).
164. Stodley L. G., *J. Electr. Contr.* **14**, 531 (1963).
165. Swobodnyje radikaly w biologiczeskich sistemach, red. L. A. Blumenfeld, Moskwa 1963, (tłum. z ang.).
166. Truby F. K., Goldzicher J. W., *Nature* **182**, 1371 (1958).
167. Umrichina A. W., Gołubiew J. H., Kajuszi L. P., Krasnowskij A. A., *Biofizika* **9**, 423 (1964).
168. Van der Waals I. H., de Grot M. S., *Mol. Phys.* **2**, 333 (1959).
169. Van Roggen A., van Roggen L., Gordy W., *Phys. Rev.* **105**, 50 (1957).
170. Vithayathil A. I., Fernberg J. L., Commoner B., *Nature* **207**, 1246 (1965).
171. Wanin A. F., Halbagian P. M., *Biofizika* **10**, 167 (1967).
172. Webb R. B., Powers E. L., Ehret C. F., *Radiation Res.* **12**, 682 (1960).
173. White R. A., Tollin G., *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1253 (1967).
174. Wilkinson D. T., Crane H. R., *Phys. Rev.* **130**, 852 (1963).
175. Yamazaki I., Mason H. S., Piette L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1**, 336 (1959).
176. Ymazaki I., Mason H. S., Piette L., *J. Biol. Chem.* **235**, 2444 (1960).
177. Yamazaki I., Ohnishi T., *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 469 (1966).
178. Yonetani T., Schleyer H., *J. Biol. Chem.* **242**, 3919 (1967).
179. Zawoiskij E. K., *J. Phys. USSR* **9**, 245 (1945).
180. Zimmer K. G., *Radiation Res. Suppl.* **1**, 521 (1959).
181. Zimmer K. G., Ehrenberg A., *Strahlentherapie* **103**, 3 (1957).
182. Zimmer K. G., Köhnlein W., Holz G., Müller A., *Strahlentherapie* **120**, 161 (1963).

WŁODZIMIERZ OSTROWSKI*

Michał S. Cwiet — twórca chromatografii kolumnowej **

(W 65-lecie pierwszego wykładu na temat techniki chromatografii kolumnowej)

Wprowadzenie kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej do analizy barwników roślinnych wiąże się z nazwiskiem M. S. Cwieta, choć już wcześniej były publikowane prace o stosowaniu tej techniki do rozdziału składników ropy naftowej. Pierwsze podstawy techniki adsorpcyjnej chromatografii Cwiet przedstawił podczas wykładu dnia 21 marca 1903 roku w Sekcji Biologicznej Warszawskiego Towarzystwa Nauk Przyrodniczych (5). Cwiet miał wówczas 31 lat i był asystentem Uniwersytetu Warszawskiego.

Uwagi biograficzne

Większość wiadomości o prywatnym życiu Cwieta i przebiegu studiów pochodzi z jego listów pisanych w latach 1896—1917 do przyjaciela w Szwajcarii J. Briqueta, znajdujących się w bibliotece Instytutu Botanicznego Uniwersytetu w Genewie. Ponadto nieliczne materiały dotyczące działalności Cwieta w Warszawie znajdują się w Archiwum Państwowym miasta stołecznego Warszawy w Sekcji „Uniwersytet Warszawski”. Akta Uniwersytetu Warszawskiego, wywiezione podczas ewakuacji Uniwersytetu do Rosji w 1915 roku przed wkroczeniem Niemców do Warszawy, po II wojnie światowej zostały Polsce przekazane przez Związek Radziecki, ale nie są jeszcze całkowicie uporządkowane i być może znajdują się dalsze materiały dotyczące tego okresu, który dla Cwieta był najbardziej naukowo płodnym i jak na ironię — jest nam najmniej znany. W 1940 r. J. Briquet opublikował krótką biografię Cwieta w pracy pt. *Biographie des Botanistes à Geneve* (1). Później o Cwiecie pisali Dhéré (13), Zechmeister (30), Robinson (19), Strain i Sherma (24), oraz Kosztojanc i Kalmykow (16).

* Doc. dr, Katedra Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Kraków.

** Fragmenty referatu wygłoszonego 21.III.1968 roku na posiedzeniu Krakowskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Krakowie.

M. Cwiet urodził się 14 maja 1872 roku w Astii (Piemont) we Włoszech, jako syn Szymona Cwieta, narodowości rosyjskiej i Marii De Dorozza, obywatelki Italii. Jak wynika z notatek parafialnych w Astii, matka Michała miała wówczas 12 lat. W latach 1891—1896 Cwiet studiuje na uniwersytecie w Genewie Wydział Przyrodniczy i botanikę u prof. Thury i Chodat, fizykę u Soreta i chemię u Guye. Szczególnie wysoko cenił sobie Cwiet naukę u prof. Chodat, którego nazywa swoim nauczycielem, a który rozbudził u niego zainteresowania w kierunku studiów nad fizjologią komórki.

W 1896 roku Cwiet przenosi się do Petersburga, gdzie rozpoczyna pracę w laboratorium biologicznym oraz fizjologicznym Akademii Nauk u akademika A. S. Faminicyna. Przystępuje do pracy nad chlorofilem. W 1899 roku publikuje dwie prace: „O nowych własnościach ciał białkowych”, w których zwraca już uwagę na dwa zielone barwniki roślin, tak zwane chlorofiliny alfa i beta i podaje sposób ich ekstrakcji z komórek. Poza badaniami w laboratoriach zajmuje się uczeniem panien z towarzystwa podstaw nauk przyrodniczych. Pracuje bardzo intensywnie i przygotowuje pracę magisterską, gdyż jak wynika z jego korespondencji, dalsze swoje życie chce związać z karierą uniwersytecką w obrębie Imperium Carskiego. Ciekawe, że Cwiet nie broni pracy magisterskiej na Uniwersytecie Petersburskim, lecz na Uniwersytecie Kazańskim. Był to najsłynniejszy w ówczesnym okresie uniwersytet w Rosji, którego wychowankami byli między innymi twórca geometrii nieeuklidesowej M. Łobaczewski, Lew Tołstoj, (nota bene skreślony z listy studentów „za brak uzdolnień”), oraz W. Lenin. W 1901 roku Cwiet zdaje egzaminy magisterskie w Kazańskim Uniwersytecie i 21 września przedstawia swoją dysertację na stopień magistra botaniki pod tytułem „Fizykochemiczna budowa ciała chlorofilowego”. Pracę tę wydaje w postaci niewielkiej książeczki poświęcając ją pamięci swego ojca „myśliciela i działacza”. Oponentami rozprawy magisterskiej Cwieta byli profesorowie: J. J. Gordiagin, W. I. Sorokin i N. W. Sorokin.

Od 1 stycznia 1902 roku Cwiet uzyskuje stanowisko starszego asystenta, tzw. nadetatowego laboranta, przy Katedrze Anatomii i Fizjologii Roślin Cesarskiego Uniwersytetu Warszawskiego. Cesarski Uniwersytet Warszawski został utworzony w 1869 roku z równoczesną likwidacją tzw. Szkoły Głównej, której działalność, jakkolwiek trwała zaledwie kilka lat, była bardzo owocna i z której wyszło wiele wybitnych nazwisk w nauce polskiej. Nie znamy motywów, które skłoniły Cwieta do przyjazdu do Polski. Poziom Uniwersytetu nie był zbyt wysoki, choć wyszło z niego wielu świetnych profesorów, którzy pracowali później na uniwersytetach w odrodzonej Polsce (O. Bujwid, Z. Dmochowski, W. Sierpiński, J. Nusbaum, E. Biernacki i inni) przyczyniając się w istotny sposób od odbudowy zniszczonych podczas I wojny światowej warsztatów pracy naukowej i dydaktycznej. Z różnych dokumentów z tego okresu dowiadujemy się,



M. Cwieta

М. С. Цвѣтъ.

О новой категоріи адсорбціонныхъ явленій и о приѣвевіи ихъ
къ біохимическому анализу.

Предварительное сообщеніе.

(Обобщено въ біологическомъ отдѣленіи Варшавскаго Общ. Естественснмтателей
4/21 Марта 1903 г.).

Введеніе.

Подъ названіемъ *адсорбціи* соединяются въ настоящее время явленія отчасти въ своей сущности, можетъ быть, разнородныя, но отвѣчающія слѣдующему общему опредѣленію: сгущеніе на поверхности тѣлъ окружающихъ ихъ газовъ, паровъ, жидкостей или растворенныхъ въ послѣднихъ веществъ.

Поглощеніе животными и древесными углемъ не только красящихъ веществъ, но общераспространенному мѣлкію, но и вообще всевозможныхъ растворенныхъ веществъ, и также газовъ; поглотительная способность почвы, огромная поглотительная способность для газовъ палладіевой и платиновой черни; сгущеніе водяныхъ паровъ и газовъ на стеклинныхъ и металлическихъ поверхностяхъ (образованіе такъ называемыхъ „Wasserhaut“ или „Luftbaut“); поглощеніе водяныхъ паровъ мелко-порошкообразными и коллоидальными металлическими окислами; поглощеніе воды гидротелемъ кремнистаго ангида; поглощеніе солей целлюлозой и животными перепонками; имбационныя свойства целлюлозы, крахмала и пр.:

Rys. 1. Podobizna M. Cwieta z własnoręcznym podpisem

Rys. 2. Strona tytułowa wydawnictwa Warszawskiego Towarzystwa Przyjaciół Nauk, w którym wydrukowany został referat Cwieta z 1903 r., poświęcony podstawom chromatografii kolumnowej

że do tzw. „Prywislanskiego kraju” przybywali licznie pracownicy nauki z Rosji i studenci rosyjscy dla odbycia tutaj studiów. Warunki do pracy naukowej i do studiów były raczej dobre:

„Uniwersytet Warszawski nie był szczególnie w złym położeniu, gdyż nie odbijały się na nim ogólnorosyjskie rozruchy, uważał je za obce sobie, nie dał się nimi porwać; starcia na podłożu narodowym rzadko miały tutaj miejsce i dlatego też Uniwersytet Warszawski mógł spokojnie pracować wówczas, gdy prawie wszystkie inne uniwersytety rosyjskie były areną zamieszek” (18). Przybywający z Rosji pracownicy Uniwersytetu Warszawskiego otrzymywali specjalny dodatek do uposażenia, ale trudno przypuścić, aby u Cwieta ten czynnik grał istotną rolę przy podejmowaniu decyzji przybycia do Warszawy. Jako nadetatowy laborant był opłacany z kredytów pozabudżetowych i było to stanowisko wyższe niż asystenta i magistra. W każdym razie faktem jest, że w Warszawie Cwiet natychmiast rozpoczyna intensywną pracę naukową i już 11 listopada 1902 roku na nadzwyczajnym posiedzeniu rady Wydziału Matematyczno-Fizycznego (był to najlepiej zorganizowany i obsadzony najlepszymi siłami fachowymi wydział uniwersytetu) magister botaniki M. Cwiet wygłosił dwa próbne wykłady dla uzyskania tytułu prywatnego docenta. W aktach Uniwersytetu Warszawskiego zachował się oryginalny protokół posiedzenia Rady Wydziału (protokół nr 10), w którym czytamy:

„Nadzwyczajne posiedzenie, 11 listopada 1902 roku. Na tym posiedzeniu magister botaniki Cwiet w celu uzyskania stopnia docenta prywatnego botaniki przeczytał dwa próbne wykłady. Jeden na temat przez niego wybrany: „Enzymy, ich istota i znaczenie w przyrodzie”. Drugi — przedstawiony przez Wydział Matematyczno-Fizyczny na temat: „Klasyfikacja bakterii”. Po wysłuchaniu wykładów Wydział Matematyczno-Fizyczny uznał je za zadowalające i postanowił przyznać magistrowi Cwietowi stopień prywatnego docenta botaniki, jak również wydać należne zaświadczenie. Dziekan, członkowie, sekretarz”.

Z protokołu wynika, że tytuł prywatnego docenta został wówczas Cwietowi nadany.

W 1907 roku Cwiet otrzymuje tytuł profesora botaniki i agronomii w Warszawskim Instytucie Weterynarii, a w rok później zostaje powołany na stanowisko profesora botaniki i mikrobiologii na Politechnice Warszawskiej, pracując równocześnie dalej na Uniwersytecie Warszawskim, gdzie pracę przerywa dopiero w 1909 roku. W 1908 roku Cwiet zwraca się z prośbą do Wydziału o zezwolenie na prowadzenie wykładów na I roku mikrobiologii ogólnej, podobnie jak to czynił w latach 1903—1904. Dziekan załączył prośbę Cwieta i skierował własne pismo do senatu w tej sprawie, ale jak wynika z dokumentów Uniwersytetu, ministerstwo nie zezwoliło Cwietowi na prowadzenie wykładów. Z tego faktu możnaby wnosić, że Cwiet nie był w łaskach u ówczesnych czynników rządowych, a zwłaszcza kuratora Warszawskiego Okręgu Szkolnego Apuchtina.

W 1910 roku, 28 listopada Cwiet przedstawił na Uniwersytecie Warszawskim monografię pt. „Chlorofile w świecie roślin i zwierząt” jako dysertację na stopień doktora botaniki. Oponentami pracy byli prof. botaniki D. J. Iwanowski i W. F. Chmielowski oraz chemik prof. W. W. Kuryłow. Cwiet otrzymał wówczas drugi doktorat z botaniki (pierwszy uzyskał jeszcze jako pracownik Uniwersytetu w Genewie), a w 1911 roku — wielką nagrodę im. A. N. Achmatowa, nadaną mu przez Akademię Nauk za monografię o chlorofilu. Podczas inwazji armii niemieckiej na Warszawę w 1915 roku Cwiet wraz z całym Uniwersytetem został ewakuowany najpierw do Moskwy a następnie do Niżnego Nowogrodu. W 1907 roku przebywał we Władykaukazie, gdzie leczył się jako chory prawdopodobnie na gruźlicę. Pod koniec tegoż roku został powołany na stanowisko profesora botaniki i dyrektora ogrodu botanicznego na Uniwersytecie w Dorpacie (Estonia). Inwazja Niemców na Estonię w 1918 roku ponownie spowodowała jego przeniesienie w głąb Rosji, tym razem do Woroneża, gdzie zmarł 26 czerwca 1919 roku, w wieku 47 lat.

Omówienie działalności naukowej

W działalności naukowej Cwieta można rozróżnić trzy okresy:

1. okres genewski 1891—1896,
2. okres petersburski 1897—1901,
3. okres warszawski 1901—1915.

Ten ostatni okres twórczości był okresem jego sukcesów i przyniósł mu światową sławę, choć dopiero w kilkadziesiąt lat po śmierci. Jeszcze jako student w Genewie, pracując w laboratorium prof. Thury opracowuje zagadnienie teratologicznych zaburzeń u rośliny *Lycium*. W 1894 roku ogłasza drukiem pracę pt. *Etudes de Physiologie Cellulaire*, za którą otrzymał od Uniwersytetu Genewskiego nagrodę im. Davy’ego, a następnie doktorat z botaniki w 1896 roku. Już w tej pracy Cwiet wysuwa przypuszczenie, że chlorofil w roślinach jest związany z substancją białkową, nazywając to połączenie „chloroplastyną”. Wyodrębnia następnie ten białkowy kompleks z chlorofilem przez ekstrakcję rezorcynolem i wytrącenie wodą (2, 3). Przez analogię do hemoglobiny nazywa go „chloroglobina” sugerując podobny mechanizm wiązania grupy prostetycznej, jak to ma miejsce w przypadku hemu i globiny. Podczas ekstrakcji zielonego barwnika z rozartych liści Cwiet używał węglanu wapnia do neutralizacji kwaśnych produktów roślin, które mogłyby powodować rozpad barwników. Zauważył wówczas, że oprócz karotenu wszystkie pozostałe barwniki adsorbowały się na węglanie wapnia. Osad przemywał dla oddzielenia zanieczyszczeń, a barwniki eluował mieszaniną eteru naftowego i alkoholu. Ta technika frakcjonowanej adsorbcji była przez Cwieta wielokrotnie stosowana w jego pracach i być może była natchnieniem do opracowania

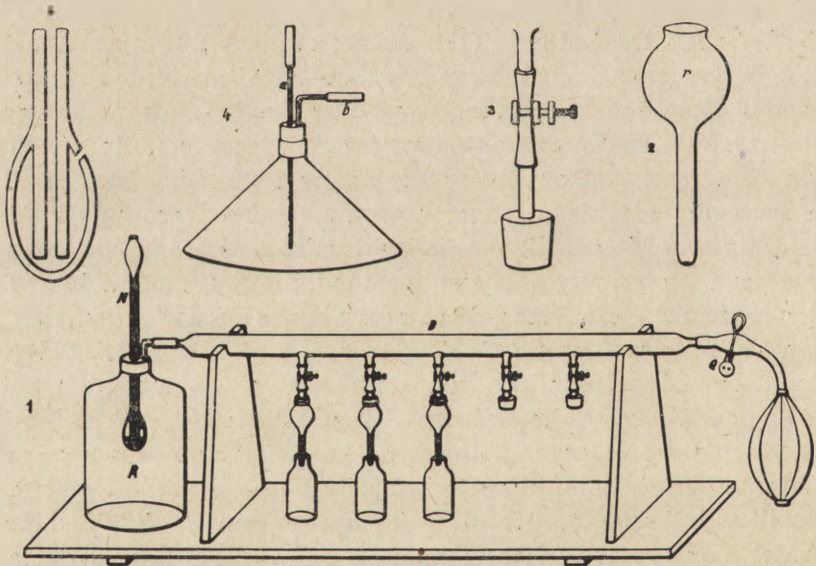
metody kolumnowej, na co zresztą wskazywałyby ustęp z jego już wspomnianej pracy doktorskiej, o czym będzie mowa poniżej. W 1901 roku Cwiet stwierdza, że w zielonych liściach znajdują się dwa zielone barwniki, rozdzielając je od siebie za pomocą frakcjonowanej ekstrakcji i nadaje im nazwy chlorofilina alfa i chlorofilina beta (4). Dla ścisłości należy dodać, że zarówno sposób rozdziału barwników, jak i myśl o złożonym charakterze barwnika zielonego pochodzi od Stokesa (22) i Sorby'ego (21), którzy nie wykazali jednak tego w tak prosty i przekonujący sposób, jak to zrobił Cwiet. W następnych latach (1905—1906) wyosabia z brunatnych alg inny barwnik, znany dziś jako chlorofil c (u Cwieta chlorofilina gamma), a którego obecność w materiale roślinnym w 36 lat później potwierdzili Strain i Manning (23). Z zabarwionych jesienią liści wyodrębnia barwniki powstające w wyniku obumierania roślin i stwierdza zanik chlorofilu a pojawienie się związków z grupy antocyjanu, nazwanych przez niego „Herbstxantofil” (9). Stwierdza przy tym, że niektóre części rośliny ogrzewane z kwasami wykazują barwę czerwoną. Cwiet wyosobnił czerwony barwnik i określił jego własności fizykochemiczne stwierdzając przynależność do grupy antocyjanu. Dziś znamy te barwniki roślinne, zmieniające barwę w obecności kwasów, jako leukoantocyjany ponownie odkryte i zbadane przez Rosenheima (20) w wiele lat po ich opisanie przez Cwieta.

W 1897 roku D. T. Day (12), Amerykanin, publikując metodę rozdziału i oczyszczania składników ropy naftowej stwierdza, że po przepuszczeniu oleju przez kolumnę wypełnioną sproszkowanym węglanem wapnia uzyskuje się znaczny stopień jego oczyszczenia. Na Międzynarodowym Kongresie Naftowców w Paryżu w 1900 roku Day przedstawił dalsze szczegóły przebiegu frakcjonowania węglowodorów na kolumnach z ziemią Fullera. Metoda Day'a nie była jednak nazwana chromatografią. Odegrała ona istotną rolę w rozwoju metod analizy składników ropy naftowej, o czym świadczą liczne prace pojawiające się na ten temat w latach następnych. Między innymi C. Engler i E. Albrecht (14) w 1900 roku zastosowali kolumnę do rozdziału różnych substancji a zbierając frakcje z pod kolumny określali ich gęstość właściwą, lepkość lub temperaturę wrzenia. Powyższych autorów należałoby zatem uznać za prekursorów chromatografii kolumnowej chociażby z uwagi na wcześniejsze daty ich publikacji. Ponadto, jak to wykazują Weil i Williams (25), a również sam Cwiet w swojej monografii „Chlorofile w świecie roślin i zwierząt”, analiza kapilarna na bibule i w innych środowiskach była sporadycznie stosowana już od połowy XIX wieku, zwłaszcza do rozdziału barwników i z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że doświadczenia Cwieta nad chromatografią kolumnową swymi korzeniami sięgają do tych właśnie źródeł. Wydaje się jednak, że niezależnie od osiągnięć na polu chemii nafty Cwiet nie znał tych prac, a w każdym razie na nich się nie wzorował, jak to wykazują Kosztójanc i Kalmykow (16)

oraz Zechmeister (31). W tym przekonaniu utwierdza nas również analiza prac Cwieta, a zwłaszcza te fragmenty różnych publikacji, które mają związek z omawianą techniką.

W 1906 roku ukazuje się pełna praca Cwieta w *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* (7), w której nazywa on swoją metodę chromatograficzną analizą adsorbcyjną lub krótko chromatografią i podaje szczegóły tej techniki, opis aparatury oraz uzyskane wyniki podczas frakcjonowania mieszanin barwników wyekstrahowanych z zielonych części roślin. Cwiet pisał w niej:

„Jeśli roztwór chlorofilu w eterze naftowym filtruje się poprzez kolumnę adsorbenta (zwykle stosuję węgiel wapnia, który dobrze przywiera do szklanej rurki), barwniki rozdzielają się od góry ku dołowi kolumny w postaci zabarwionych pasm zgodnie z ich zdolnością adsorbowania się; silniej adsorbujące się substancje wypierają słabiej zaadsorbowane i spychają je ku dołowi. Rozdział ten jest praktycznie kompletny jeśli po przepuszczeniu roztworu barwnika przepuści się solwent przez kolumnę adsorbenta. Tak więc podobnie jak pasma światła w widmie, różne składniki mieszaniny barwników rozdzielają się w uporządkowany sposób na kolumnie z węglanem wapnia i przeto mogą być tym sposobem oznaczone



Rys. 3. Przyrząd z pięcioma kolumnienkami do chromatograficznego rozdziału drobnych ilości ekstraktów roślinnych

- 1 — M — manometr, R — naczynie o objętości około 3 litry jako rezerwuuar wyrównawczy ciśnienia, D — szklana rurka dystrybucyjna ciśnienia, P — pompka do wytwarzania nadciśnienia
 2 — lejek stanowiący kolumnę chromatograficzną
 3 — łącznik szklany z korkiem i ścisnąćcem
 4 — przyrząd do odparowywania eteru naftowego z ekstraktów roślinnych
 5 — przekrój zbiornika manometru rtęciowego M (z książki M. Cwieta — Chlorofile w świecie roślin i zwierząt)

jakościowo jak również ilościowo. Taki preparat nazywam chromatogramem a to postępowanie metodą chromatograficzną”.

Praca Cwieta opublikowana w *Berichte* może nawet dziś, po przeszło 50-ciu latach służyć jako wzór jak powinny być konstruowane doświadczalne prace w zakresie analizy chemicznej i biochemii. Cwiet dobrze sobie zdawał sprawę z tego, że opisana przez niego metoda ma znaczenie uniwersalne i może być zastosowana do rozdziłu mieszanin różnych substancji chemicznych (6):

„Należy wspomnieć, że opisane zjawiska adsorbcyjne odnoszą się nie tylko do barwników chlorofilowych. Należy oczekiwać, że wszystkie rodzaje chemicznych związków barwnych lub bezbarwnych podlegają tym samym prawom”.

Dalsze rozwinięcie techniki chromatografii kolumnowej podał Cwiet w swojej monografii „Chlorofile w świecie roślin i zwierząt” (11) opublikowanej w Warszawie w 1910 roku.

Niestety sugestia Cwieta została przez świat naukowy zrozumiana dopiero po około 25-ciu latach nieśmiałych i sporadycznych prób stosowania techniki chromatografii kolumnowej w analizie chemicznej.

Uwagi końcowe

W ciągu kilkunastu lat swego produktywnego życia Cwiet ogłosił 62 prace doświadczalne i rozprawy, w tym dwie książki. Z wyjątkiem jednej pozycji wszystkie prace były napisane przez niego samego. Należy z naciskiem podkreślić, że 38 pozycji bibliografii opracowane było w Warszawie i stąd wysyłane do druku w czasopismach francuskich, niemieckich i rosyjskich. Po wyjściu z Warszawy w 1915 roku Cwiet nie napisał już ani jednej pracy i ani jednego referatu. Okres warszawskiej twórczości Cwieta był dla niego najbardziej owocny i zapewnił mu na trwałe nazwisko w historii nauki światowej. Wszystko co osiągnął w nauce było dokonane w Polsce, na Uniwersytecie Warszawskim.

Po opracowaniu swojej metody chromatografii kolumnowej Cwiet wykazał, że oprócz omówionych barwników w zielonych liściach znajduje się grupa barwników żółtych — ksantofili (8): ksantofil alfa' i alfa'' zwany obecnie violaksantyną, ksantofil alfa zwany luteinolem, względnie właściwym ksantofilem oraz ksantofil beta, zwany obecnie neoksantyną. Wszystkie te barwniki Cwiet doskonale rozdzielił na kolumnie i zidentyfikował na podstawie widm w spektroskopie przez siebie skonstruowanym. Trzeba tu nadmienić, że mimo tych wyników Cwieta tak wytrawny badacz jak Willstätter, który otrzymał ksantofil w stanie krystalicznym nie uznał jego heterogenności i mocno krytykował Cwieta (26). Dopiero gdy znacznie późniejsze badania przy zastosowaniu bardziej wyrafinowanych metod, na przykład adsorpcji na aktywnym tlenku magnezu, wykazały

słuszność obserwacji Cwieta, Willstätter (28) pisał w swoich pamiętnikach *Aus meinem Leben*:

„Zawsze zwracałem na to uwagę po przeprowadzeniu moich doświadczeń, czy byli przede mną jacyś badacze, których ścieżką kroczyłem lub ją krzyżowałem, tak, aby im oddać sprawiedliwość lub spłacić pełny dług. W konsekwencji tego np. stwierdziłem, że moimi poprzednikami w tych badaniach byli fizyk Stokes, oraz botanicy Kraus, Borodin, Monteverde, Cwiet i Molisch”.

I dalej:

„W początkach badań nad chlorofilem duże znaczenie odegrała wypróbowana adsorbcyjna technika botanika Cwieta z Warszawy”.

Szkoda, że tej opinii o pracach Cwieta Willstätter nie miał wówczas, kiedy ten je publikował i wykazywał niezbitcie w sposób konsekwentny, że chlorofil można wydzielić, oczyścić i scharakteryzować za pomocą prostej techniki chromatograficznej, a nie tylko na zasadzie czysto chemicznych metod badając wiele pochodnych chlorofilu w „wyniku reakcji z kwasami i zasadami”. Willstätter nie stosował techniki adsorbcyjnej Cwieta w swych badaniach nad barwnikami roślinnymi, a dopiero jego uczniowie Winterstein i Stein (29) oraz Karrer i Schlientz (15) otrzymali w latach trzydziestych tą metodą czyste chlorofile i karoteny alfa i beta.

Tę samą zresztą zasadę wyłącznej reakcji z kwasami i zasadami przy ustalaniu struktury chlorofilu wyznawał nasz wielki chemik Leon Marchlewski. Marchlewski wykazywał w swoich pracach, że chlorofil traktowany kwasem daje dwa rodzaje pochodnych tzw. filoksantynę i filocyjaninę. Sądził, że są to dwa różne stadia degradacji tej samej cząsteczki chlorofilu. Natomiast Cwiet wykazał logicznie, że jedna z tych pochodnych, którą otrzymywał Marchlewski, pochodzi z chlorofilu alfa, druga z chlorofilu beta, (według jego nomenklatury tzw. chlorofilan alfa i chlorofilan beta (17)). Marchlewski i grupa innych chemików tego okresu nie chcieli uznać faktu, że w przyrodzie występują dwie odmiany chlorofilu alfa i beta, mimo że Cwiet rozdzielił je za pomocą chromatografii kolumnowej. Powyższe kontrowersje spowodowały między obu uczonymi dramatyczną polemikę dla nas dziś niezrozumiałą. Konflikt zaostrzał Willstätter, który ignorował zarówno prace Marchlewskiego jak i Cwieta tworząc własną nomenklaturę pochodnych chlorofilu i nie biorąc pod uwagę możliwości heterogenności zielonego barwnika roślin. Willstätter argumentował, że chromatografia nie jest odpowiednią metodą do preparatywnego otrzymywania substancji chemicznych (27). Cwiet odpowiadał na zarzuty jasno i skromnie (10):

„Przypuszczenia, że moje preparaty są zanieczyszczone ponieważ nie otrzymałem barwników w stanie stałym są zupełnie nieuzasadnione. Chlorofilany (pochodne chlorofilu alfa i beta) były wyizolowane za pomocą analizy adsorbcyjnej, która jest jaknajbardziej metodą preparatywną

i w wielu względach ma przewagę nad metodami precypitacji czy krystalizacji. Prawdopodobnie nie byłoby żadnych specjalnych trudności w zastosowaniu metody adsorpcyjnej do przygotowania większych ilości barwnika wystarczających do analizy..... W każdym razie analiza adsorpcyjna jest już teraz stosowana jako potężna metoda kontroli; żaden preparat barwnika nie może być uznany za zdefiniowany jako substancja czysta, jeśli nie wykazuje również jednorodności podczas próby chromatograficznej”.

Do tych słów nie można nic dodać dzisiaj przy współczesnej ocenie czystości preparatów chemicznych.

Tak więc kompetencyjny spór między uczonymi w początkach naszego wieku spowodował, że jedna z najbardziej przydatnych w nauce metod jaką jest chromatografia została zapomniana na okres prawie trzydziestu lat. Dopiero bowiem w latach trzydziestych ta technika została ponownie wprowadzona do analizy chemicznej i jak widzimy, z wielkim powodzeniem.

LITERATURA

1. Briquet J., *Bull. Soc. Bot. Suisse* **1a**, 463 (1940).
2. Cwiet M., *Compt. Rend.* **129**, 609 (1899).
3. Cwiet M., *Botan. Zent.* **81**, 81 (1900).
4. Cwiet M., *Botan. Zent.* **89**, 120 (1902).
5. Cwiet M., *Trudy Warszawskiego Obszczestwa Jestestwoispytatielej, Oddzielenie Biologii* **14**, nr 6, str. 1, 1905.
6. Cwiet M., *Ber. Deutsch. Botan. Gesell.* **24**, 316 (1906).
7. Cwiet M., *Ber. Deutsch. Botan. Gesell.* **24**, 384 (1906).
8. Cwiet M., *Biochem. Z.* **5**, 6 (1907).
9. Cwiet M., *Ber. Deutsch. Botan. Gesell.* **26A**, 88 (1908).
10. Cwiet M., *Biochem. Z.* **10**, 404 (1908).
11. Cwiet M., *Chlorofilly w rastitielnom i ziwotnom mirie*, Warszawa, 1910.
12. Day D. T., *Proc. Am. Phil. Soc.* **36**, 112 (1897).
13. Dhère C., *Candollea* (Genewa) **10**, 23 (1943).
14. Engler C., Albret E., *Z. Angew. Chem.* **13**, 1200 (1900).
15. Karrer P., Schlientz W., *Helv. Chim. Acta* **17**, 7 (1934).
16. Kosztójanc K. S., Kalmykow K. F., *Biochimija* **16**, 479 (1951).
17. Machlewski L., *Biochem. Z.* **7**, 282 (1908).
18. Orlikowska C., *Studia i Materiały z Dziejów Nauki Polskiej, Ser. B*, PWN, Warszawa, 1962, str. 113.
19. Robinson T., *J. Chem. Education* **36**, 144 (1959).
20. Rosenheim O., *Biochem. J.* **14**, 178 (1920).
21. Sorby H. C., *Proc. Roy. Soc.* **21**, 442 (1873).
22. Stokes G. G., *Proc. Roy. Soc.* **13**, 144 (1864).
23. Strain H. H., Manning W. M., *J. Biol. Chem.* **144**, 625 (1942).
24. Strain H. H., Sherma J., *J. Chem. Education* **44**, 235 (1967).
25. Weil H., Williams T. I., *Nature* **166**, 1000 (1950).
26. Willstätter R., Mieg W., *Liebig's Ann.* **355**, 1 (1907).

27. Willstätter R., *Ann.* **390**, 269 (1912).
28. Willstätter R., *Aus meinem Leben*, Weinheim, 1949, str. 69.
29. Winterstein A., Stein G., *Z. Physiol. Chem.* **220**, 247; 263 (1933).
30. Zechmeister L., *Isis* **36**, 108 (1946).
31. Zechmeister L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **49**, 145 (1948).

RECENZJE

Research in Protozoology, tom II, red. Tze-Tuan Chen, Pergamon Press, 1967

Drugi tom *Research in Protozoology* zawiera rozdziały obejmujące takie dziedziny jak: morfogeneza pierwotniaków, funkcja aparatu jądrowego pierwotniaków, ekologia pierwotniaków niepasżytnicznych, wpływ promieniowania na komórki pierwotniacze oraz wzrost pierwotniaków pasożytniczych w kulturach tkankowych.

Zagadnienie morfogenezy pierwotniaków zostało opracowane przez Vance T a r t a r a w rozdziale pt. *Morphogenesis in Protozoa*. Autor jest wybitnym specjalistą w tej dziedzinie. Potrafi on jasno i zwięźle przedstawić najważniejsze osiągnięcia badań nad morfogenezą struktur komórkowych pierwotniaków: a) w czasie podziału komórkowego, b) w przebiegu cyklu życiowego, c) w czasie regeneracji fizjologicznej oraz post-traumatycznej. Zjawisko polimorfizmu oraz pojawiania się tzw. form podwójnych (dubletów) u pierwotniaków zostało w pełni uwzględnione przy omawianiu niektórych rzadziej spotykanych form morfologicznych.

Najbardziej szczegółowej analizie poddano przebieg morfogenezy u orzęsków, które od czasu pionierskich badań Stanisławy Dembowskiej w latach dwudziestych stały się niemal klasycznym obiektem badań w tej dziedzinie. Orzęski są szczególnie dogodnym modelem do badań zjawisk morfogenezy na szczeblu komórkowym, gdyż posiadają bogato zróżnicowane struktury powierzchniowe (*cortex*) oraz podwójny aparat jądrowy w postaci mikro- i makro-nukleusów. W końcowych częściach artykułu V. Tartar analizuje w interesujący sposób rolę poszczególnych składników komórkowych (*cortex*, cytoplazma, aparat jądrowy) w przebiegu procesu morfogenezy komórek pierwotniaczych.

D. M. Prescott i G. E. Stone w rozdziale pt. *Replication and Function of the Protozoan Nucleus* omawiają zagadnienie syntezy DNA i RNA u różnych gatunków pierwotniaków w oparciu o najnowsze dane eksperymentalne, uzyskane przy jednoczesnym użyciu technik mikrochirurgicznych (enukleacja, transplantacja jąder itp.) oraz radioaktywnych prekursorów. Autorzy słusznie podkreślają znaczenie badań prowadzonych na synchronizowanych kulturach *Tetrahymena pyriformis*, które dostarczyły biologom wiele danych o przemianach związków nukleinowych w przebiegu podziału komórkowego.

K. G. Grell w rozdziale pt. *Sexual Reproduction in Protozoa* podjął się niewdzięcznego zadania syntetycznego omówienia skomplikowanych stosunków w zakresie zróżnicowania płciowego komórek w różnych grupach pierwotniaczych. Dzięki solidnemu omówieniu oraz uporządkowaniu bardzo różnorodnego materiału, artykuł ten może być cenną informacją zarówno dla ogólnego biologa, którego interesują zagadnienia zróżnicowania płci na szczeblu organizmów jednokomórkowych jak i dla specjalisty protozoologa, zainteresowanego badaniami z zakresu ekologii, fizjologii oraz genetyki pierwotniaków.

Rozdział opracowany przez L. E. Nolanda i M. Gojdics pt. *Ecology of Free-living Protozoa* zawiera bogaty materiał, dotyczący warunków życia pierwotniaków niepasżytnicznych. W artykule omówiono szczegółowo znaczenie poziomu zasolenia, zawartości tlenu i pH środowiska oraz takich czynników fizycznych jak temperatura i światło. Zagadnienie niezbędnych składników odżywczych dla pierwotniaków poddano analizie w zależności od sposobów ich odżywiania ze szczególnym zwróceniem uwagi na rolę endosymbiontów wewnątrz-komórkowych oraz wzajemne stosunki w układzie; pierwotniaki — zwierzęta tkankowe. Warunki życia pierwotniaków glebowych oraz gatunków, występujących w wodach zanieczyszczonych (ściekowych), zostały słusznie omówione osobno z uwagi na specyficzne warunki środowiskowe oraz wyjątkowe znaczenie praktyczne tego zagadnienia.

Wpływ różnego rodzaju promieniowania na komórki pierwotniacze omawia szczegółowo A. C. Giese w obszernym rozdziale pt. *Effects of Radiation upon Protozoa*. Badania nad wpływami różnego rodzaju promieniowania dostarczyły cennej informacji na temat organizacji komórki pierwotniaczej i rzuciły nowe światło na wzajemne oddziaływanie jądra i cytoplazmy oraz na funkcje niektórych organelli komórkowych. Na osobną uwagę zasługują osiągnięcia w zakresie produkcji mutantów w wyniku naświetlania pierwotniaków promieniami UV lub X, co przyczyniło się do wyjaśnienia niektórych zagadnień związanych z dziedzicznością u tych organizmów.

W ostatnim rozdziale pt. *Growth of Parasitic Protozoa in Tissue Cultures* W. Trager i S. M. Krasner omawiają dotychczasowe osiągnięcia w zakresie hodowli pierwotniaków pasożytnicznych na podłożach kultur tkankowych. Celem tego rodzaju hodowli jest uzyskanie kultur umożliwiających badanie pierwotniaków w warunkach bardziej dostępnych dla badacza niż te w jakich przebywają one w obrębie tkanek gospodarza. Dodatkową korzyścią, wynikającą z tego rodzaju hodowli, jest możliwość stosunkowo dokładnego badania wzajemnych zależności między pasożytem a tkankami żywiciela. W szczególności zastosowanie metody hodowli na podłożach tkankowych w stosunku do niektórych pasożytów wewnątrz-komórkowych (np. *Trypanosoma cruzi*, *Theileria*, *Toxoplasma*) stwarza całkowicie nowe możliwości badania tych pierwotniaków — i to zarówno pod kątem poznania ich biologii jak i skutecznego ich zwalczania przy zastosowaniu środków chemoterapeutycznych oraz immunologicznych.

H. Dominas
S. Dryl

Praktikum z biochemii. Podstawy metodyczne. Praca zbiorowa pod redakcją Witolda Brzeskiego i Zbigniewa Kaniugi PWRiL, Warszawa 1968, str. 360

Treścią książki są ważniejsze podstawy metodyczne, których znajomość jest konieczna do prowadzenia biochemicznych badań. Autorami są pracownicy katedr biochemii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie i Uniwersytetu Warszawskiego. Jest to jak gdyby wznowienie wydanego przed przeszło dziesięć laty podręcznika pod tytułem „Ćwiczenia z biochemii roślin”, poszerzonego o współczesne wiadomości teoretyczne i dostosowanego częściowo do realizowanych obecnie programów.

W podręczniku można wyodrębnić kilka części. Pierwsza omawia wykrywanie jakościowe podstawowych składników żywych organizmów (sacharydów, tłuszczow-

ców, aminokwasów, białek i składników kwasów nukleinowych) za pomocą ważniejszych reakcji charakterystycznych. Tego typu badania, jak słusznie podkreślają redaktorzy, „stanowią niezbędny wstęp do poznania metod stosowanych w badaniach biochemicznych”. Uzyskane tymi drogami dodatnie wyniki nie świadczą jeszcze o obecności poszukiwanego związku, natomiast ujemny wynik wyklucza jego obecność.

Następna część podręcznika poświęcona jest frakcjonowaniu materiału biologicznego, wstępnej czynności w wyodrębnianiu czystych składników żywej materii. Przedstawiono różne stosowane metody ekstrakcji, a następnie frakcjonowane wytrącanie z roztworu poszukiwanych substancji. Na szczególną uwagę zasługuje dość wyczerpująco opisana metoda ekstrakcji przeciwprądowej. Metoda ta pozwalająca na ilościowe rozdzielanie mieszanin złożonych z wielu nawet składników, zdobyła sobie bardzo szerokie uznanie.

W trzeciej części podano opisy różnych technik sporządzania roztworów buforowych. Podano również sposoby sprawdzania i oznaczania stężenia jonów wodorowych.

Kolejna, bardzo znaczna część książki poświęcona jest różnym odmianom chromatografii. W jednym z rozdziałów omówiono chromatografię adsorpcyjną, rodzaje stosowanych adsorbentów i rozpuszczalników, oraz urządzenia i aparaty. W następnym rozdziale autorzy wprowadzają czytelnika w zagadnienia chromatografii podziałowej, ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii bibułowej. Rozdział trzeci dotyczy zastosowania jonitów w praktyce laboratoryjnej. Omówiono różne odmiany stosowanych jonitów i ich mechanizm działania. Ostatni rozdział opisuje chromatografię cienkowarstwową, technikę jej stosowania i jej zalety.

Następne dwa rozdziały, to również metody rozdzielania mieszanin. Pierwszy z nich, poświęcony elektroforezie, omawia wady i zalety zarówno elektroforezy swobodnej jak i pasmowej, a w szczególności technikę elektroforezy bibułowej i na żelu skrobiowym. Drugi rozdział noszący tytuł „Sączenie molekularne”, poświęcony jest metodom rozdzielania składników mieszanin w oparciu o różnicę wielkości ich cząsteczek. Obok dializy, służącej od dawien dawna do oddzielania związków drobno-cząsteczkowych od makrocząsteczek, a szczególnie do odsalania roztworów białek, przedstawiono też od niedawna wprowadzoną metodę sączenia molekularnego poprzez preparaty dekstranu, znane pod nazwą *Sephadexów*. Podano różne sposoby zastosowania tych preparatów do odsalania i zatężania roztworów związków wielko-cząsteczkowych.

Ostatnie rozdziały poświęcone są zagadnieniom specjalnym. Jeden z rozdziałów zawiera opis fotometrii absorpcyjnej powszechnie używanej w biochemii do ilościowego oznaczania związków, a także do kontrolowania przebiegu reakcji, oznaczania stanu równowagi itp. W podręczniku znajdują się opisy aparatury jak i wskazówki do stosowania jej w prowadzonych badaniach.

W następnym rozdziale podano opis aparatu Warburga do badania wymiany gazowej a także przykłady zastosowania tego aparatu do rozwiązywania niektórych zagadnień.

Ostatni rozdział przeznaczony został na zaznajomienie czytelnika z radiometrią i autoradiografią. W rozdziale omówiono bezpieczeństwo pracy z izotopami promieniotwórczymi, budowę aparatów i możliwości ich zastosowania do badań biochemicznych, szczególnie metabolizmu *in vitro* i *in vivo*. Podano również wiele użytecznych informacji technicznych.

Należy dodać, że każdy rozdział poprzedzony jest podaniem podstawowych wiadomości, dobrze wprowadzających czytelnika w omawiane zagadnienia. Na końcu rozdziału zestawiono cenniejszą literaturę na dany temat. Każdy rozdział jest też ilustrowany kilku dobrze i bardzo szczegółowo opracowanymi ćwiczeniami i zadaniami, dzięki czemu podręcznik może służyć jako zbiór ćwiczeń studenckich z zakresu biochemii. Jest to dużą zaletą tej książki, gdyż w związku z przeprowadzanymi

obecnie reformami programów studiów zwiększa się, kosztem wykładów, liczby godzin zajęć praktycznych. Książka jest bardzo starannie opracowana i wydana, a jej wysoki poziom pozwala sądzić, że będzie ona cenną pomocą nie tylko dla laboratoriów studenckich lecz również dla naukowych pracowni biochemicznych.

B. Filipowicz

J. Opińska-Blauth i L. Tomaszewski Metody chromatograficzne w badaniach aminokwasów ze szczególnym uwzględnieniem aminoacydurii.

PZWL Warszawa 1966 (str. 88 cena 20 zł)

Książka przeznaczona jest dla lekarzy pragnących praktycznie wykorzystać dla celów diagnostycznych możliwości tkwiące w badaniach chromatograficznych moczu na obecność poszczególnych aminokwasów. Zgodnie z tym założeniem w pierwszej części (obejmującej rozdziały I—VIII) omówiono podstawy metodyczne, w drugiej zaś części (rozdziały IX—XI) przegląd aminoacydurii występujących w stanach fizjologicznych i patologicznych.

W części metodycznej autorzy zapoznają czytelników w krótkiej i zwięzłej formie z łatwo dostępnymi metodami analizy chromatograficznej aminokwasów w materiale biologicznym.

W części drugiej autorzy dokonują przeglądu i systematyki tych jednostek chorobowych, w których identyfikacja i oznaczenia poszczególnych aminokwasów może być bardzo istotnym czynnikiem w stawianiu diagnozy przez lekarza i rozpoczęcia wczesnego leczenia (zwłaszcza w okresie niemowlęcym). Bardzo cenna jest również próba usystematyzowania aminoacydurii patologicznych na wrodzone i nabyte. Współczesna diagnostyka kliniczna w szerokim zakresie podejmuje próby wykrywania zaburzeń metabolicznych poszukując etiopatogenezy wielu schorzeń w uszkodzeniach podstawowych mechanizmów sterujących prawidłową funkcją komórek i tkanek.

Wśród wielu metod biochemii klinicznej i chromatografia i elektroforeza zajmują poczesne miejsce ze względu na prostotę urządzeń oraz możliwości wykrywania i oznaczania licznych związków tej samej klasy w złożonych mieszaninach. Posługiwanie się tymi metodami wymaga jednak nie tylko nabycia przez badającego biegłości technicznej, ale przede wszystkim umiejętności dokonania wyboru właściwej procedury analitycznej prowadzącej do wyników nadających się do interpretacji. Autorzy tej książki nie tają licznych trudności z jakimi spotkać się może analityk podejmujący badania nad aminoacydurią.

Na uwagę zasługuje fakt, że poruszana tematyka jest bogato uzupełniona najnowszym piśmiennictwem co predestynuje omawianą książkę do roli podstawowego przewodnika po chromatografii w zastosowaniu do badań nad aminoacydurią.

W następnych wydaniach podręcznika byłyby również korzystne uwzględnienie zagadnienia występowania peptydów moczu oraz wyeliminowanie drobnych błędów, jakie umknęły uwagi korekty w obecnym wydaniu, jak np.:

brak zapowiedzianego schematu reakcji ninhydrinowej na stronie 16,

na stronie 23 zamiast 5 ml winno być 5 μ l,

na stronie 23 pominięto często używany bufor fosforanowy w zestawie układów służących do rozwijania chromatogramów,

na stronie 30 próbkę moczu powinno się nanosić po stronie anodowej, a nie ka-

todowej — jak podano w tekście, gdyż przy pH 2,2 aminokwasy w czasie elektroforezy migrują ku anodzie.

„Metody chromatograficzne w badaniach aminokwasów ze szczególnym uwzględnieniem aminoacydurii” stanowić powinny jedną z podstawowych pozycji w podręcznej bibliotece każdej pracowni analitycznej klinicznej, zwłaszcza w klinikach pediatrycznych.

M. Kański

Dennis V. Parke — The Biochemistry of Foreign Compounds. Pergamon Press 1968, str. 269

Jest to piąty tom z serii monografii poświęconych wybranym zagadnieniom z biochemii. Biochemia związków obcych jest jednym z nich, wynikającym z coraz większej produkcji i coraz szerszego stosowania związków chemicznych w rolnictwie, żywieniu i lecznictwie. Środowisko człowieka współczesnego, chemizowane przez substancje przeznaczone dla dobra człowieka zagraża jego zdrowiu, na skutek stałego wnikania tych substancji do ustroju przez przewód pokarmowy lub innymi drogami. Racjonalna ochrona zdrowia, ani racjonalne wykorzystywanie związków obcych nie są możliwe bez poznania szczegółowego ich przemian w ustroju oraz konsekwencji dla stanu zdrowia człowieka.

Celem monografii było udostępnienie (podczas studiów medycznych, rolniczych i innych oraz w szkoleniu podyplomowym) elementów biochemii tych związków, co jest uzasadnione nie tylko względami zdrowotnymi, ale również ekonomicznymi i społecznymi.

Książka składa się z dwóch części. W pierwszej — autor przedstawia mechanizmy wchłaniania i wydalania oraz rozmieszczenia obcych związków w ustroju, ich metabolizm z uwzględnieniem przemian katalizowanych przez enzymy mikrosomów wątroby a także czynników wpływających na ten metabolizm. Obszernym (20 stron) i celowym zakończeniem tej części monografii jest rozdział, w którym porównano metabolizm u zwierząt stało- i zmiennoocieplnych ze szczególnym uwzględnieniem ssaków. Część pierwsza stanowi podstawę dla omówienia biochemizmu wybranych związków naturalnych, związków dodawanych do żywności, leków, pestycydów i niektórych związków stosowanych w przemyśle chemicznym. Przykładowe to omówienie jest treścią części drugiej. Najwięcej w niej miejsca zajmują leki i związki naturalne. Rozdział dotyczący związków obcych w żywności formalnie najszczuplejszy (11 stron), faktycznie potraktowano najszerzej; uzupełniają ten rozdział wszystkie pestycydy i wiele związków naturalnych bądź stosowanych w przemyśle chemicznym, a nawet niektóre leki, jak np. kwas salicylowy (niedozwolony do konserwowania żywności).

Wskazuje to na trudność układu monografii biochemicznej, którą można również uznać za zarys współczesnej toksykologii. Monografia ta jest cennym wprowadzeniem do tego właśnie przedmiotu lub do toksykologii poszczególnych grup obcych związków. O takim właśnie jej charakterze świadczy także ogólna objętość tekstu i wzajemny ilościowy stosunek obu części, tj. 136 str.: 91 str.

Jest to książka nowoczesna pod względem treści i walorów dydaktycznych. Piśmiennictwo podane na zakończenie każdego prawie rozdziału wraz z odsyłaczkami do wykazu, obejmującego 504 pozycje pochodzi głównie z lat 1964—65. Podstawowym dziełem, z którego autor korzystał jest Williamsa R. T.: „*Detoxication Mechanisms*.”

The Metabolism and Detoxication of Drugs, Toxic Substances and Other Organic Compounds", II. wydanie. Rok 1959. Londyn.

Dyskusyjną sprawą może być umieszczenie chininy wśród substancji dodawanych do żywności zamiast wśród leków. Ze szkodą — wydaje się — pominięto w części pierwszej próbę wprowadzenia do mutagenności, teratogenności (choć pośród leków omówiono thalidomid) i do methemoglobinemii.

W części drugiej brak antybiotyków. W świetle aktualnych danych przynajmniej na taką samą wzmiankę jak penicylina, zasługują antybiotyki tetracyklinowe, stosowane zarówno w medycynie weterynaryjnej jak i dodawane do mieszanek paszowych dla zwierząt hodowlanych i drobiu, a przechodzące do ich mięsa i podrobów oraz występujące w jajach drobiu.

Do tego typu niedostatków zaliczam nie podanie w części drugiej, zwłaszcza przy azotynie sodowym, że związek ten posiada właściwości methemoglobinotwórcze. Występowanie tego związku w przyrodzie i stąd obecność azotynów w wodzie do picia i niektórych roślinach jadalnych stanowi przyczynę zatruc niemowląt. Zatrucia te przebiegają z objawami methemoglobinemii. Nie wykazano — jak dotąd — i autor nie cytuje piśmiennictwa, że w środkach spożywczych konserwowanych azotynem sodowym wytwarzają się rakotwórcze nitrozoaminy, jednak autor to stwierdza. Z wyjątkiem mączki rybnej stosowanej dla celów paszowych, w której stwierdzono wytwarzanie się nitrozoamin oraz z wyjątkiem badań wskazujących, że wytwarzają się one w obecności różnych amin przypuszcza się i jest to prawdopodobne, że wytwarzają się one w środkach spożywczych konserwowanych azotynem sodowym.

Monografia jest bogato ilustrowana schematami przebiegu reakcji chemicznych w ustroju, wynikającymi z aktualnego stanu wiedzy w dziedzinie omawianych związków obcych.

Wydawnictwu należą się słowa uznania za podjęcie tematu i staranne wydanie tej cennej pozycji naukowej. Życzyć jednak należy, aby następne wydanie zostało nieco poszerzone o zagadnienia wymienione wyżej i o toksyczne metabolity grzybów, jak np. aflatoksyny i inne.

M. Nikonorow

Proceedings of 2nd Meeting of FEBS, Vol. 4 Ribonucleic Acid-Structure and Function red. H. Tuppy, Pergamon Press, 1966, str. 150

Książka ta jest zbiorem dziesięciu sympozjalnych referatów przedstawionych na drugim Zjeździe Europejskich Towarzystw Biochemicznych FEBS w Wiedniu. Autorami referatów są czynni w danej problematyce badacze o światowej sławie.

Pierwsza pozycja dotycząca preparatywnych i analitycznych metod w ustalaniu struktury tRNA została napisana przez M. Stachelina. Druga, zatytułowana „Własności tRNA wytwarzanego podczas głodzenia aminokwasowego” opracowana przez U. Z. Littauera i R. Milbauera jest przeglądem dotychczasowej wiedzy na temat wpływu metylacji zasad w tRNA na jego własności biologiczne. Struktura specyficznego dla seryny tRNA jest przedmiotem następnego rozdziału. Autorami są H. G. Zachau, D. Dutting, F. Melchers, H. Feldmann i R. Thiebe. Podają oni skrót metodycznych danych, które doprowadziły do ustalenia struktury trzech specyficznych dla seryny tRNA, i porównują ich budowę z innymi tRNA o znanej sekwencji zasad.

Kolejnym problemem przedstawionym przez F. Grosa, S. Naono, J. Rouveriere, D. Hayesa i R. Cukier jest fizjologiczna korelacja między syntezą i funkcją informacyjnego RNA. Omawiana jest tu rola RNA polimerazy w syntezie mRNA na matrycy DNA i udział rybosomów w mechanizmie represji. Frakcje RNA w komórkach zwierzęcych odpowiadające informacyjnemu RNA są przedmiotem artykułu H. R. V. Arnsteina. Główna uwaga poświęcona jest fizykochemicznym własnościom RNA z retikulocytów królika odpowiadającemu mRNA dla hemoglobiny.

R. A. Cox przedstawia wyniki własne i innych na temat badań drugorzędowej struktury rybosomowego RNA w roztworach. Jest to obszerny artykuł omawiający zmiany konformacyjne RNA w różnych pH. Pierwszorzędowa struktura rybosomowego RNA jest przedmiotem rozważań J. P. Ebela.

Wpływ 8-azaguaniny, wbudowanej do mRNA, na jego funkcję omawia D. Grunberger. Zmiany w strukturze drugorzędowej RNA pod wpływem tego analogu purynowego i wynikających stąd konsekwencji w stosunku do biosyntezy białka są przedmiotem dociekań autora. Kolejny referat napisany przez G. Kocha jest zbiorem ustalonych faktów dotyczących własności, funkcji i replikacji wirusowego RNA. Autor porusza problem sekwencji i zjawisk prowadzących do syntezy białek w obecności wirusowego RNA, indukcję i represję funkcji RNA oraz możliwości przeniesienia genetycznej informacji RNA na DNA. Książkę zamyka artykuł S. Ochoa na temat procesów translacji.

Zbiór omawianych artykułów jest szerokim przeglądem wiedzy o strukturze i funkcji kwasów nukleinowych. Jest przeznaczony raczej dla specjalistów, chociaż wszystkie artykuły zawierają część poglądową, zaznajamiającą czytelnika z podstawowymi osiągnięciami danego kierunku. W sumie — bardzo wartościowa pozycja, która powinna być łatwo dostępna dla badaczy związków wysokocząsteczkowych.

P. Szafrąński

6-th International Congress of Clinical Chemistry. Monachium, 26—30 Lipca 1966. 4 tomy. Red. O. Weiland., S. Karger 1968, str. 487

Zbiór referatów głównych i streszczeń doniesień ogłoszonych na Szóstym Międzynarodowym Kongresie Chemii Klinicznej obejmuje 487 stron zawartych w czterech tomach. Każdy tom poświęcony jest większej tematyce całości chemii białek o klinicznym znaczeniu, enzymologii klinicznej, postępowi w metodyce kliniczno-chemicznej oraz postępowi w badaniach kliniczno-biochemicznych.

Wśród uczestników zjazdu znalazła się śmietanka międzynarodowej chemii i chemii klinicznej: Grassman, Tiselius, Putnam, Hitzig, Grabar, Bucher, Pfleiderer, Wieme, Boyd, Natelson, Stahl, Lynen, Standbury, With, Wieland.

Prawie trzy czwarte referatów poświęcone jest różnym aspektom chemii klinicznej białek jak nowoczesne metody rozdziału białek, synteza, struktura i funkcja γ -globulin, związek paraprotein z prawidłowymi immunoglobulinami, kliniczne efekty nieprawidłowych globulin osocza, nowe aspekty analizy immunoelektroforetycznej, izoenzymy, biochemia izoenzymów i ich diagnostyczne znaczenie, diagnostyka enzymologiczna (dehydrogenazy kwasu mlekowego, amylaz 5'-nukleotydz, cholines-teraz, fosfataz), immunologiczne inhibitory enzymatyczne, hemoglobiny, jodoproteidy itd.

Na drugim miejscu pod względem ilości referatów stoi metodologia, przystosowanie technik do potrzeb biochemii klinicznej. Nie ma prawie działu analityki, który by nie był wykorzystywany do chemii klinicznej: fluorymetria, chromatografia gazowa i cienkowarstwowa, mikroanalitka.

Z klasycznej fizjopatologii narządowej i układowej wymienić należy: enzymologię nefronu, chemię barwników żółciowych, genetykę biochemiczną, choroby moczu o zapachu liścia klonowego, wpływ czynników antyreumatycznych na metabolizm kolagenu oraz wpływ antykonceptyków na metabolizm hormonów tarczycy.

Biorąc pod uwagę zakres chemii klinicznej tematyka zjazdu nie jest zbyt szeroka, natomiast jest bardzo wyspecjalizowana, co niewątpliwie podnosi jej wartość merytoryczną, gdyż postęp w tych dziedzinach zapewnia tylko specjalizacja.

Próba przedstawienia poszczególnych wyników badań czy rozważań z góry skazana jest na niepowodzenie. Byłaby ona przejawem przede wszystkim osobistych zainteresowań recenzenta. Nie mniej jednak należy uwypuklić kierunki przyszłościowe, które w sposób mniej lub więcej systematyczny były rozważane w czasie zjazdu.

Zakres dotychczas uprawianej biopsji płynów pozakomórkowych ulega rozszerzeniu o chemiczną biopsję narządów wątroby i nerek. Próbkę tych narządów pobrane przyżyciowo drogą punkcji poddaje się równocześnie badaniu histologicznemu, biochemicznemu i ultramikroskopowemu uzyskując wgląd w zależność między funkcją a strukturą. Podstawowym warunkiem badania punktatów jest oczywiście stosowanie odpowiednich mikrometod. Do dalszych przyszłościowych kierunków należy inhibitorowa funkcja przeciwciał w stosunku do pewnych enzymów oraz swoiste inhibitory peptydowe poszczególnych izoenzymów. Otwierają się nowe perspektywy badań teoretycznych i fizjopatologicznych z zakresu regulacji aktywności enzymów.

W 6 Kongresie Chemii Klinicznej było tylko jedno doniesienie z Polski. Zwraca uwagę natomiast cały szereg doniesień z Bułgarii i z Jugosławii.

L. Tomaszewski

SPRAWOZDANIA

Letnia szkoła FEBS w Londynie na temat praktycznego nauczania biochemii studentów medycyny

Konferencja odbyła się w *Department of Biochemistry Medical College of St. Bartholomew's Hospital* w Londynie, w dniach 22 i 23 kwietnia 1968 r. W obradach brało udział około 25 osób z różnych krajów europejskich, w tym dwóch przedstawicieli Polski (doc. dr W. Ostrowski z Krakowa i prof. dr M. Żydowo z Gdańska). Celem spotkania była z jednej strony konfrontacja metod nauczania biochemii studentów medycyny w różnych krajach i szkołach europejskich, z drugiej zaś przedyskutowanie — jakie są najskuteczniejsze i najekonomiczniejsze metody nauczania medyków. Organizatorem „szkoły” z ramienia FEBS był prof. P. N. Campbell z Uniwersytetu w Leeds.

Pierwszy dzień konferencji był poświęcony poglądom na nauczanie biochemii i nauczaniu biochemii studentów medycyny w Wielkiej Brytanii. Z wypowiedzi referentów tego dnia można się było zorientować, że nie tylko wśród wykładowców biochemii różnych Uniwersytetów w Wielkiej Brytanii, ale także wśród nauczających biochemię w 12 londyńskich Szkołach Medycznych — panują zupełnie przeciwstawne poglądy na wartość praktycznego nauczania (tj. na przydatność praktycznych zajęć laboratoryjnych). Pierwszy referent — dr E. D. Wills z *Medical College of St. Bartholomew's Hospital*, reprezentował pogląd, że ćwiczenia laboratoryjne nie pomagają studentom medycyny w zrozumieniu przedmiotu, nie są także w stanie nauczyć w dostatecznym stopniu tych czynności laboratoryjnych, które w przyszłości byłyby potrzebne lekarzowi w jego codziennej pracy. Jakkolwiek w Szkole Medycznej, którą reprezentował dr Wills odbywają się praktyczne zajęcia z biochemii (głównie doświadczenia typu fizjologiczno-chemicznego, np. badanie wpływu wysiłku na poziom kwasu mlekowego w krwi, wbudowywanie znakowanej izotopowo glukozy i octanu w glikogen wątroby szczura), to jego zdaniem należałoby zaprzestać nauczania praktycznego biochemii medyków, zastępując ćwiczenia laboratoryjne większą ilością godzin seminaryjnych, konsultacyjnych i wykładowych. Potwierdzeniu tej tezy miały służyć wyniki ankiety rozpisanej wśród studentów medycyny londyńskich Szkół Medycznych, przedstawione przez Dr J. D. Hawkins'a z tegoż samego *Medical College of St. Bartholomew's Hospital*. W ankiecie tej zadano studentom szereg pytań dotyczących przydatności i atrakcyjności ćwiczeń laboratoryjnych z biochemii. Z liczb przedstawionych przez prelegenta wynikało, że istnieje wielka rozbieżność zdań co do atrakcyjności i przydatności ćwiczeń pomiędzy różnymi szkołami medycznymi. Wydaje się to bardzo zależeć od sposobu prowadzenia zajęć praktycznych i od zaangażowania personelu nauczającego. Jako bardzo atrakcyjne ocenili zajęcia praktyczne studenci z *Middlesex Hospital Medical School*, gdzie biochemii naucza Dr J. B. Jepson, który był następnym prelegentem. Przedstawił on schemat organizacyjny nauczania biochemii w swojej szkole i wyraził pogląd krań-

cowo różny od tego, jaki reprezentował Dr Wills. Stwierdził mianowicie, że podstawą nauczania powinny być zajęcia praktyczne, konsultacje i seminaria. Zdaniem Dr Jepsona każde praktyczne ćwiczenie powinno spełniać jeden z trzech warunków: 1) odpowiadać na pytanie, 2) uczyć techniki, która będzie w przyszłości zastosowana, lub 3) sprawiać niespodziankę. Tak zestawione ćwiczenia uczą — zdaniem Dr Jepsona — znacznie skuteczniej i lepiej, aniżeli suchy system wykładowo-seminaryjny, pobudzają do dyskusji i samodzielnych dociekań i dają lepsze podstawy zrozumienia medycyny.

Zestawienie przeciwstawnych poglądów na wartość laboratoryjnego nauczania biochemii studentów medycyny wywołało wśród zgromadzonych bardzo żywą dyskusję. Wśród przedstawicieli większości krajów europejskich przeważał pogląd, że należy stanowczo utrzymać zajęcia praktyczne z biochemii, która jest nauką doświadczalną podobnie jak fizjologia, biofizyka i inne dyscypliny podstawowe nauczane na studiach lekarskich. Pozbawienie studentów możliwości wykonywania chociażby najprostszyc doświadczeń odbiłoby się niekorzystnie nie tylko na laboratoryjnym, ale także ogólno-medycznym wykształceniu przyszłych lekarzy. Taki pogląd reprezentowali również w dyskusji delegaci polscy.

Następnym referatem pierwszego dnia obrad była prelekcja prof. D. N. Barona z *Royal Free Hospital School of Medicine*, na temat wartości praktycznej biochemii w medycynie klinicznej. Z tego referatu — jak i z wielu wypowiedzi dyskusyjnych — wynikało wyraźnie, że obecny rozwój medycyny klinicznej coraz bardziej opiera się na biochemicznych metodach badania i rozumowania. W tym także kierunku zmierzają tendencje reform nauczania medycyny w Europie. W ramach studiów klinicznych coraz więcej i częściej naucza się podstaw patologii biochemicznej i laboratoryjnych metod diagnostycznych.

Prof. P. N. Campbell z Uniwersytetu w Leeds przedstawił w dalszym ciągu obrad projekt budowy nowego Wydziału Lekarskiego w jego Uniwersytecie, w którym przewidziano studenckie laboratoria wielopredmiotowe (MDL — *multidisciplinary laboratories*). System nauczania w takich laboratoriach polegałby na tym, że student miałby swoje miejsce w ciągu całego roku tylko w jednym laboratorium, gdzie istniałyby możliwości wykonywania ćwiczeń zarówno np. z biochemii, jak i histologii, biofizyki, fizjologii itd. Miały to być oszczędniejszy system budowania, a równocześnie system, w którym integracja poszczególnych przedmiotów mogłaby iść bardzo daleko. Oczywiście stwarza to szereg niedogodności organizacyjnych i kłopotów osobowych. W dyskusji podnoszono, że szereg takich laboratoriów istnieje w niektórych medycznych szkołach amerykańskich i kanadyjskich, jednakże niektóre szkoły po kilkuletnich próbach tego rodzaju wróciły do tradycyjnego systemu laboratoryjnego.

Na zakończenie pierwszego dnia obrad architekt z londyńskiego urzędu architektonicznego przedstawił referat na temat projektowania i kosztów budynków laboratoryjnych przeznaczonych dla szkół wyższych. Z wielu ciekawych zestawień jakie podano w tym referacie warto — dla porównania — wspomnieć o rozdziale kosztów budowy tego rodzaju budynków w Wielkiej Brytanii. Dla całego budynku koszt wynosi (bez wyposażenia) 101 £/m²; z tego 44 £ przypada na sam budynek, 34 £ na instalacje i 23 £ na meble. Koszt wyposażenia ruchomego waha się w niewielkich granicach, sięgając (podobnie jak w Szwecji — co było przedmiotem późniejszego referatu) 30% całego budynku. Jest to znaczne przesunięcie kosztów na korzyść wyposażenia w porównaniu z praktyką wyposażania nowych budynków stosowaną w Polsce. Także i normy przestrzeni przewidziane na jednego studenta w laboratorium wyliczone przez brytyjskich architektów są wyższe aniżeli to stosuje się u nas w Kraju. Na jednego studenta w laboratorium przewiduje się tam 5 m².

W drugim dniu obrad przedstawiciele krajów kontynentu europejskiego przedstawiali problemy nauczania biochemii w swoich szkołach medycznych. Prelekcje

wyglaszali: Dr O. Zetterqvist z Uniwersytetu Uppsala w Szwecji i Prof. G. Seidelin z Uniwersytetu w Kopenhadze w Danii. Prof. dr J. Leonis z Brukseli mówił m.in. o stosowaniu filmów do instruowania studentów o wykonywaniu praktycznych zajęć, a prof. H. Hers z Uniwersytetu w Louvain ogólnie o nauczaniu biochemii studentów medycyny w Belgii. Następnie Dr H. G. Pandit-Hovenkamp z Amsterdamu mówiła o nauczaniu biochemii na Wydziałach Lekarskich w Holandii, Dr F. W. Brugman o reformie studiów lekarskich wprowadzanych obecnie w Rotterdamie, a prof. M. Żydowo o nauczaniu biochemii na Wydziałach Lekarskich w Polsce. Nie odbyła się — przewidziana programem — prelekcja biochemików czechosłowackich, gdyż delegacja z Czechosłowacji nie przyjechała do Londynu.

Porównanie różnych systemów nauczania i problemów, z którymi spotykają się nauczyciele biochemii na Wydziałach Lekarskich w różnych krajach europejskich, było bardzo interesujące. Odbywała się również bardzo ożywiona dyskusja niemal po wszystkich wystąpieniach. Przedstawiciele wszystkich reprezentowanych krajów z wyjątkiem Szwecji uskarżali się, że kandydaci na studia lekarskie stoją ogólnie na niższym poziomie aniżeli kandydaci na inne kierunki studiów. System rekrutacji na studia jest bardzo różny w różnych krajach. O ile np. w Wielkiej Brytanii odbywa się egzamin wstępny przed przyjęciem na studia lekarskie, to w Belgii i w Danii nie ma żadnej selekcji przy przyjmowaniu, a w Szwecji odbywa się konkurs matur, przy czym nie ma znaczenia jakie przedmioty kandydat studiował w szkole średniej. Fakt, że jedynie w Szwecji najlepsi kandydaci ubiegają się o przyjęcie na studia lekarskie, próbowano tłumaczyć perspektywami ekonomicznymi zawodu lekarza w tym kraju.

W wielu krajach europejskich została przeprowadzona, lub jest w trakcie przeprowadzania reforma nauczania medycyny. Wszyscy poszukują nowych skuteczniejszych metod nauczania oraz programów jak najbardziej dostosowanych do potrzeb wykonywania zawodu lekarza. Wszyscy uczestnicy byli zgodni co do tego, że wielki postęp w dziedzinie nauk biomedycznych dokonany w ostatnich latach stwarza konieczność gruntowniejszego przygotowania teoretycznego lekarzy, ale stwarza również trudny problem selekcji materiału z dziedziny biochemii, który przyszły lekarz winien sobie przyswoić. Sporo uwagi poświęcono audiowizualnym metodom nauczania. M.in. prof. Seidelin z Kopenhagi demonstrowała aparat zastępujący asystenta w objaśnieniu sposobu wykonywania ćwiczeń, a będący połączeniem magnetofonu z automatycznie zmieniającym przeźroczka wizjerem. W czasie trwania konferencji urządzono wystawę przyrządów przydatnych w praktycznym nauczaniu biochemii a produkowanych przez niektóre firmy brytyjskie. Wyposażenie studenckich laboratoriów biochemicznych zarówno w Wielkiej Brytanii jak i w krajach kontynentu europejskiego wydaje się być znacznie bogatsze aniżeli w Polsce. Studenci medycyny prawie we wszystkich krajach robią własnoręcznie ćwiczenia na aparatach Warburga — niektórzy próbują zastąpić to wprowadzeniem do ćwiczeń studenckich elektrody tlenowej Clarka; w wielu szkołach medycznych studenci posługują się na ćwiczeniach tak kosztownymi przyrządami jak spektrofotometry do ultrafioletu, a nawet automatyczne liczniki scyntylicyjne typu Packarda. W związku z tym warto wspomnieć o dyskusji, jaka wywiązała się na temat celowości stosowania złożonej aparatury do ćwiczeń; niektórzy uczestnicy byli zdania, że jest lepiej polecać wykonywać ćwiczenia studentom na prostych zestawach aparaturowych, których działanie łatwiej objaśnić, np. do badania radioaktywności związku znaczonego węglem promieniotwórczym lepiej (ze względów dydaktycznych) dać zestaw złożony z licznika Geigera, przelicznika i zasilacza wysokiego napięcia, aniżeli automatyczny licznik scyntylicyjny Packarda. Nie wszyscy uczestnicy konferencji byli tego zdania; można bowiem argumentować, że istotną korzyścią, jaką student ma wynieść z wykonywanego ćwiczenia jest zrozumienie jakiegoś procesu fizjologicznego czy biochemicznego, a nie — szczególne działania aparatury służącej do przeprowadzenia pomiaru. Oczywiście w końcu

wym efekcie o użyciu takiego czy innego zestawu aparatury doświadczalnej dla studentów decydują względy ekonomiczne.

Niemają wpływ na ekonomikę nauczania i na możliwości stosowania różnych technik w tym nauczaniu ma liczba studentów. Polska stoi pod względem liczby studentów przypadających na jeden Wydział Lekarski na jednym z pierwszych miejsc w Europie. Spośród krajów europejskich reprezentowanych na konferencji jedynie w Belgii i Danii liczby studentów przyjmowanych na pierwszy rok studiów są porównywalne z naszymi, jednakże w ciągu pierwszego i drugiego roku studiów bardzo znaczny procent studentów odpada. W Wielkiej Brytanii np. przeciętna liczba studentów przyjmowana rocznie na Wydział Lekarski wynosi ok. 80 osób. Dzięki temu niektóre szkoły mogły wprowadzić zwyczaj włączania studentów — w ramach ich zajęć praktycznych — do niektórych prac badawczych prowadzonych przez pracowników Katedry.

Dyskusje i wymiana poglądów na temat nauczania trwały także i w czasie wspólnych posiłków zorganizowanych dla uczestników konferencji; zarówno prelekcje jak i dyskusje pozwalają na wyciągnięcie konkluzji, że kierunek rozwoju nauczania biochemii studentów medycyny w Polsce jest słuszny i zgodny z tendencjami w innych krajach europejskich. Wiele szczegółów tej konferencji będzie można w przyszłości wykorzystać w pracy Komisji Programowej i przy układaniu konkretnych programów i metod nauczania. Organizatorzy zamierzają wydrukować materiały z konferencji, co ułatwi szersze wykorzystanie jej wyników.

*W. Ostrowski
M. Żydowo*

SPIS TREŚCI

P. Mastalerz — Biochemia wiązania fosfor-węgiel	151
B. Filipowicz — Enzymy nukleolityczne w analityce	175
H. Sierakowska — Rozmieszczenie specyficznych nukleaz i ich rola w metabolizmie kwasów nukleinowych	193
J. Malec — Rola jąderka komórkowego w metabolizmie kwasów nukleinowych i białka	215
J. Passent — Działanie antybiotyków na biosyntezę białka	227
A. Putrament, R. Lorenc — Mutanty oddechowe drożdży	247
T. Mikulski — Elektronowy rezonans paramagnetyczny i jego zastosowanie w biochemii	267
W. Ostrowski — Michał S. Cwiet — twórca chromatografii kolumnowej (W 65-lecie pierwszego wykładu na temat techniki chromatografii kolumnowej)	295
Recenzje książek (<i>H. Dominas i S. Dryl, B. Filipowicz, M. Kański, M. Nikonorow, P. Szafrąński, L. Tomaszewski</i>)	303
Letnia Szkoła FEBS w Londynie na temat praktycznego nauczania biochemii studentów medycyny (<i>W. Ostrowski i M. Żydowo</i>)	315

W 3-cim zeszycie tego tomu ukaza się:

1. Biochemia powstawania i rozwoju mitochondriów — *T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski, M. Rytel*
2. Utlenianie bursztynianu w mitochondriach — *A. B. Wojtczak*
3. Mechanizm utleniania tiosiarczanu w tkankach zwierzęcych — *A. Koj*
4. Żelazo niehemowo związane w enzymach oksydoredukcyjnych — *A. Gardas*
5. Własności i biologiczna rola izoenzymów — *J. Skangiel-Kramska*
6. Biosynteza ubichinonu w tkankach zwierzęcych — *A. K. Drabikowska*
7. Enzymatyczna aktywacja kwasów tłuszczowych — *W. H. Trzeciak*
8. Flawonoidy głogu — *S. Lewak*
9. Struktura a aktywność cytokinin — *J. H. Rogozińska*
10. Mechanizmy reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami A. Podstawy teoretyczne — *J. Sliwowski*

POSTĘPY BIOCHEMII

April 1969

ARTICLES IN POLISH

Volume 15	Number 2
P. Mastalerz — The Biochemistry of Carbon-Phosphorus Bond (Dep. Org. Chem. I. Polytechnique, Wrocław)	151
B. Filipowicz — Nucleolytic Enzymes in Analytics (Dep. Chem. Gen. and Physiol. Med. School, Łódź)	175
H. Sierakowska — Localization of Specific Nucleases and Their Role in Nucleic Acid Metabolism (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	193
J. Malec — The Role of Cell Nucleolus in Nucleic Acids and Protein Metabolism (Dep. Biochem. Inst. Hematol., Warszawa)	215
J. Passent — The Effect of Antibiotics on Protein Synthesis (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	227
A. Putrament, R. Lorenc — Respiratory Yeast Mutants (Dep. Genetics Univ., Warszawa)	247
T. Mikulski — Electron Spin Resonance and Its Application in Biochemistry ⁴ (Dep. Med. Physics Med. School, Szczecin)	267
W. Ostrowski — Michał S. Cwiet (Dep. Physiol. Chem. Med. School, Kraków)	295
Chronicle	

Od Redakcji

W indeksie autorów do XIV tomu *Postępów Biochemii* przy pozycji „Piechowska M., Transformacja bakterii” podano str. 573 zamiast 561 i omyłkowo zamieszczono nazwiska: Buchowicz J., Cieślak J., i Erecińska M. — autorów recenzji wycofanych ze składu z przyczyn technicznych. Za wprowadzenie w błąd przepraszamy naszych Czytelników.

Należy podawać kolejno: L. p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginalnej), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202, 793 (1953). Wykaz skrótów tytułów czasopism podają *Post. Biochem.* 7, 601 (1961). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, 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

P. Mastalerz — Biochemia wiązania fosfor-węgiel	151
B. Filipowicz — Enzymy nukleolityczne w analityce	175
H. Sierakowska — Rozmieszczenie specyficznych nukleaz i ich rola w metabolizmie kwasów nukleinowych	193
J. Malec — Rola jąderka komórkowego w metabolizmie kwasów nukleinowych i białka	217
J. Passent — Działanie antybiotyków na biosyntezę białka	229
A. Putrament, R. Lorenc — Mutanty oddechowe drożdży	251
T. Mikulski — Elektronowy rezonans paramagnetyczny i jego zastosowanie w biochemii	271
W. Ostrowski — Michał S. Cwiet — twórca chromatografii kolumnowej (W 65-lecie pierwszego wykładu na temat techniki chromatografii kolumnowej)	299
Recenzje książek (<i>H. Dominas i S. Dryl, B. Filipowicz, M. Kański, M. Nikonorow, P. Szafrąński, L. Tomaszewski</i>)	309
Letnia Szkoła FEBS w Londynie na temat praktycznego nauczania biochemii studentów medycyny (<i>W. Ostrowski i M. Zydowo</i>)	317