

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

PSTBAH 22 (1)
1-120 (1976)

Postępy Biochemii

1976

tom 22 nr 1



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły przeglądowe z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

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

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

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), jego (ich) stanowisko(a) i miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

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

Dla przejrzystości tekstu korzystny jest często podział na rozdziały oznaczone liczbami rzymskimi. Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin, schematów, reakcji czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku np. kwas glutaminowy (I).

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

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

Dr. Wojciech Rode

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1976 TOM 22 ZESZYT 1

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Psiboh 22(1)
(1-120) (1976)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Członkowie: M. Bagdasarian (Warszawa), M. Chorąży (Gliwice),

J. Gregorczyk (Szczecin), W. Mejbaum-Katzenellebogen (Wrocław),

A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawelkiewicz (Poznań)

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Landman

KOMITET REDAKCYJNY

W. Ardelt (Warszawa), B. Czartoryska (Warszawa), M. Fikus (Warszawa),

B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa),

S. Lewak (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa),

I. Szumiel (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PANSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1975

Nakład 2 170 (2 043+127)

Ark. wyd. 8,75, ark. druk. 7,5

Pap. druk. sat. kl. V, 70 g 70×100

Zam. nr 1358/75

B-34

Oddano do składania 20.X.75 r.

Podpisano do druku w styczniu 1976 r.

Druk ukończono w lutym 1976 r.

Cena zł 20.—

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

PROFESOR WŁODZIMIERZ MOZOŁOWSKI

W dniu 6 maja 1975 roku, dwa dni przed ukończeniem osiemdziesiątego roku życia zmarł członek honorowy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Profesor zwyczajny chemii fizjologicznej, doktor wszechnauk lekarskich Włodzimierz Stanisław Mozołowski, senior polskiej społeczności biochemicznej, powszechnie lubiany i poważany nauczyciel wielu pokoleń biochemików i lekarzy.

Urodził się W. Mozołowski 8 maja 1895 roku w Sanoku. W okresie wczesnego dzieciństwa utracił matkę; wychowywał się wśród liczego przyrodniego rodzeństwa i kuzynowstwa, w atmosferze rodzinnej żałyłości, patriotyzmu i dążeń niepodległościowych odzywających wówczas bardzo silnie na terenie zaboru austriackiego. W Sanoku także uczył Włodzimierz Mozołowski do Gimnazjum Klasycznego, które ukończył w 1913 roku z wyróżnieniem. W tym samym roku wstąpił na Wydział Lekarski Uniwersytetu Jana Kazimierza we Lwowie. Jednakże, gdy ukończył pierwszy zaledwie rok studiów wybuchła pierwsza wojna światowa, w której młody student widział — podobnie jak większość ówczesnego patriotycznego społeczeństwa polskiego — szansę na odzyskanie niepodległości.

Wstępuje do legionów organizowanych przez Józefa Piłsudskiego, aby z entuzjazmem oddać się walce zbrojnej. Walczy na wielu frontach, otrzymuje oficerskie wykształcenie wojskowe, jest ranny na włoskim froncie. W czasie krótkiej rekonwalescencji w Wiedniu podejmuje ponownie studia lekarskie, wkrótce jednak wraca do czynnej działalności wojskowej, wojna bowiem trwa a niepodległa Polska jeszcze nie istnieje. Pod koniec wojny jest w najbliższym otoczeniu naczelnego wodza. W roku 1921 opuszcza definitywnie wojsko w randze kapitana, odznaczony krzyżem *Virtuti Militari*, dwukrotnie Krzyżem Walecznych, Krzyżem Niepodległości i innymi odznaczeniami wojskowymi.

Studia lekarskie kończy Włodzimierz Mozołowski w roku 1922 uzyskując w Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie stopień doktora wszechnauk lekarskich. W tym samym roku podejmuje pracę w Zakładzie Chemii Lekarskiej we Lwowie, kierowanym wówczas przez Jakuba Karola



Parnasa. Pod jego kierownictwem stawia pierwsze kroki swojej biochemicznej działalności, walczy o zdobycie głębokiej i rzetelnej wiedzy o chemicznych podstawach funkcjonowania żywego organizmu. W roku 1926 ogłasza swoją pierwszą publikację naukową (poz. A 1 wykazu), która dotyczy form glukozy występującej w krwi. Istniały wówczas podejrzenia, że glukoza krwi występuje w jakiejś specjalnej formie odmiennej od α - i β -glukozy. Badania Mozołowskiego wykazały, że glukoza krwi występuje w zupełnie tych samych formach, jak glukoza rozpuszczona w wodzie. W następnych latach staje się W. Mozołowski entuzjastycznym współuczestnikiem badań J. K. Parnasa nad metabolizmem związków fosforowych w mięśniu, nad amoniogenezą pracującego mięśnia i nad powstawaniem kwasu mlekowego (poz. A 9—15,20,23 wykazu). Jak wiadomo te badania szkoły Parnasa oraz badania Embdena i Meyerhofa w Niemczech doprowadziły do opisanego pośrednich etapów procesu glikolizy, znanego dzisiaj pod nazwą ciągu Embdena-Meyerhofa-Parnasa. W. Mozołowski przebywał zresztą przez okres kilku miesięcy w pracowni Embdena we Frankfurcie, pracując tam nad niektórymi zagadnieniami przemiany fosforanów w mięśniu.

Zagadnieniem, którym samodzielnie i szczególnie żywo zajmował się W. Mozołowski w latach 1927—1933 w czasie swojej lwowskiej działalności było poszukiwanie źródła amoniaku powstającego w wynaczonej krwi. W serii prac (pozycje A 8, A 18, A 21, A 22, A 23 wykazu) opisuje doświadczenia nad warunkami powstawania amoniaku, nad izolowaniem substratów i produktów amoniogenezy, ażeby w końcu udowodnić, że źródłem amoniaku w wynaczonej krwi jest kwas 5'-adenylowy. Doświadczenia te są przykładem sumienności i precyzji analitycznej, świadczą o ostrożności wnioskowania ich autora i o ciągłej jego samokontroli. Była to zresztą jedna z cech charakteru profesora Mozołowskiego, że wciąż sam siebie usiłował kontrolować i poddawać ostrej krytyce swoje postępowanie.

Na podstawie wspomnianej pracy o amoniogenezie krwi W. Mozołowski habilituje się w roku 1933 na Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie, uzyskując *veniam legendi* z chemii fizjologicznej. Wkrótce potem rozpoczyna samodzielne wykłady w Akademii Medycyny Weterynaryjnej we Lwowie, które prowadził do czasu powołania go na Katedrę Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu Stefana Batorego w Wilnie w roku 1935. Wykładał zaś i nauczał znakomicie, z pasją i zamiłowaniem, przywiązując wielką wagę przez cały okres swej nauczycielskiej działalności do ciągłego unowocześniania treści i formy nauczania, do przekazywania swym uczniom wszystkiego co najlepsze i najbardziej wartościowe, do kształcenia młodej kadry biochemicznej. Na stanowisku kierownika Katedry Chemii Fizjologicznej w Wilnie danym było pozostać profesorowi Mozołowskiemu jedynie przez 4 lata do roku 1939, kiedy to po wybuchu drugiej wojny światowej Uniwersytet tamtejszy został przejęty przez władze litewskie. Ten czteroletni przedwojenny okres wileńskiej działalności W. Mozołowskiego

wskiego to organizowanie pracy dydaktycznej i naukowej w nowym otoczeniu. Zainteresowania naukowe zwraca ku tzw. detoksykacjom ustrojowym, opracowując metodę oznaczania glukuronianu (poz. A 32, A 33 wykazu), a owocem przemyśleń na temat mechanizmów detoksykacyjnych są publikacje o dynamicznym stanie detoksykacji ustrojowych (poz. A 35, A 36 wykazu).

Wojna i okupacja pozbawiły prof. Mozołowskiego możliwości pracy badawczej, nie zdołały jednak całkowicie oderwać go od działalności nauczycielskiej. Cały okres okupacji do roku 1945 przetrwał w Wilnie pracując w laboratorium szpitalnym, ale równocześnie organizując tajne polskie nauczanie uniwersyteckie. Wykłada chemię i biochemię na tajnych kompletach, zbiera materiały do podręcznika, który zostanie wydany niemal zaraz po wojnie. W stanie ciągłego zagrożenia wolności i utraty życia pamięta o tym, aby uratować wiele książek i dokumentów uniwersyteckich, które przywozi ze sobą do Gdańska i które po zawierusze wojennej umożliwiają wielu powracającym studentom udokumentowanie i zweryfikowanie przebiegu ich studiów.

W roku 1945 profesor Mozołowski wraz z grupą kilku innych profesorów Uniwersytetu Stefana Batorego zostaje repatriowany i zgłasza się natychmiast do pracy w odbudowującym się szkolnictwie wyższym. Z polecenia ówczesnych władz centralnych przyjeżdża do Gdańska, gdzie na gruzach dawnej niemieckiej „Akademie für praktische Medizin” ma powstać Akademia Lekarska w Gdańsku. Z ogromną energią i zapałem przystępuje do organizowania Zakładu Chemii Lekarskiej, do wskrzeszenia życia naukowego i nauczania w dymiącym jeszcze od pożarów, zniszczonym w znacznym procencie mieście.

To właśnie dzięki profesorowi Mozołowskiemu i nielicznej grupce Jemu podobnych zapaleńców zajęcia studenckie na Wydziale Lekarskim w Gdańsku rozpoczęły się w niespełna 6 miesięcy po zakończeniu działań wojennych w spalonym mieście. Znow walczy, tym razem o zdobycie najpotrzebniejszego sprzętu laboratoryjnego, zabezpieczenie prowizorycznego lokalu dla potrzeb pracowni studenckich i naukowych, o przyciągnięcie i utrzymanie przy sobie grupy młodych współpracowników, o powrót do pracy naukowej, o postawienie akademickiego nauczania na najwyższym poziomie natychmiast po jego wskrzeszeniu po wojnie.

Mimo całego ogromu zajęć organizacyjnych i dydaktycznych, nie zanedbuje Profesor działalności naukowej, której tematyka jest tym razem ograniczona nadzwyczaj skromnymi możliwościami technicznymi jakie były do dyspozycji w zdewastowanym kraju, a zwłaszcza w barbarzyńsko zniszczonym Gdańsku. Opracowuje sposób charakteryzowania białek surowicy krwi przy pomocy wskaźników uzyskanych z oznaczeń prostych właściwości fizyko-chemicznych surowicy (poz. A 37—40 wykazu). Wyniki tych badań stały się punktem wyjścia dla prac uczniów i współpracowników Profesora nad naturalną ultrafiltracją krwi, nad formami zjonizowa-

nego wapnia w surowicy krwi, nad zawartością cholesterolu we frakcjach białek osocza. Potrafił zachęcać swych uczniów do pracy badawczej, rozbudzać w nich własne, samodzielne zainteresowania naukowe, a równocześnie uczył surowej kontroli postępowania doświadczalnego.

W pierwszym powojennym okresie Profesor Mozołowski nie tylko wykładał chemię ogólną i chemię fizjologiczną (potem — biochemię), pisał i wydawał znakomite skrypty i podręczniki dla studentów, organizował zajęcia laboratoryjne z tych przedmiotów, walczył o odrodzenie i rozwój biochemicznych badań naukowych w Gdańsku i w Polsce, ale także zabiegał energicznie o utworzenie szerokich kontaktów naukowych. Był organizatorem i pierwszym prezesem Gdańskiego Towarzystwa Lekarskiego (przekształconego potem w Gdański Oddział Towarzystwa Lekarskiego), aktywnie działał w Polskim Towarzystwie Chemicznym, Polskim Towarzystwie Fizjologicznym, Gdańskim Towarzystwie Naukowym, był jednym z członków założycieli Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, pierwszym redaktorem *Acta Biochimica Polonica*.

Równocześnie rozwijał nader żywą działalność publicystyczną. Niektóre Jego artykuły, jak np. o znaczeniu nauczania chemii i biochemii studentów medycyny (poz. D 17, D 19 wykazu), czy też o relacji biochemii i medycyny (poz. D 30 wykazu) do dzisiaj nie straciły niemal nic na swej aktualności.

Przez 20 lat aktywnej akademickiej działalności w Gdańsku (do roku 1965 kiedy przeszedł na emeryturę) w swoich przepojonych szlachetnością poczynaniach doznawał zarówno porażek jak i odnosił zwycięstwa. Trochę może wbrew znanemu powiedzeniu Profesora: „każdy dobry uczynek musi ponieść zasłużoną karę”, spotykał się z powszechnym szacunkiem i uznaniem. W roku 1948 został wybrany członkiem Polskiej Akademii Umiejętności, był powołany na członka Warszawskiego Towarzystwa Naukowego i Towarzystwa Naukowego Toruńskiego. Polskie Towarzystwo Biochemiczne nadało Mu godność członka honorowego, podobnie postąpiło Polskie Towarzystwo Lekarskie. Odznaczony był Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski, dwukrotnie Złotym Krzyżem Zasługi i dwukrotnie Medalem Zasłużonych Ziemi Gdańskiej. W roku 1973 Akademia Medyczna w Gdańsku nadała Profesorowi Mozołowskiemu godność doktora honoris causa.

Był profesor Mozołowski nauczycielem o oryginalnej i silnej osobowości, z której coś pozostało w każdym z licznych Jego uczniów i, z której czerpał każdy kto miał okazję bliżej z Nim się zetknąć. Był nauczycielem z zamiłowania, który był przekonany o tym, że relacja nauczyciel — uczeń jest niemal jedynym związkiem dwóch ludzi, w którym dający nic nie traci, a otrzymujący zyskuje. Dawał też wyraz przekonaniu, że prawdziwie dobrym nauczycielem jest tylko ten, kto ma uczniów lepszych od siebie samego.

Należał do pokolenia Polaków, którym przyszło kilkakrotnie w ciągu

życia budować od nowa zniszczone dobra i zniszczone wartości. Czynił to za każdym razem z wielkim poświęceniem i głęboką wiarą w zwycięstwo prawdy i godności ludzkiej.

Mariusz Żydowo
Leon Żelewski

SPIS PRAC PROF. WŁODZIMIERZA MOZOŁOWSKIEGO

Prace doświadczalne

1. Mozołowski W. (1924) *C. r. d. Soc. Biol.* **90**, 311. Sur la nature du sucre sanguin.
2. Mozołowski W., Hilarowicz H., (1925) *Biochem. Z.* **164**, 295—311. Über das Wesen des sogenannten Serumantipepsins.
3. Hilarowicz H., Mozołowski W., (1925) *Zentralblatt für Chirurgie* **52**, 2410—2413. Über das Wesen des sogenannten Antipepsins des Blutes und über den diagnostischen Wert der Antipepsinuntersuchungen bei peptischen Magengeschwür.
4. Mozołowski W., Hilarowicz H., (1926) *Polski Przegląd Chirurgiczny* **5**, 27—47., O istocie tzw. antypepsyny w surowicy krwi.
5. Hilarowicz H., Mozołowski W., (1926) *Zentralblatt für Chirurgie* **53**, 2649—2651. Zur Antipepsinfrage.
6. Mozołowski W., Parnas J. K., (1926) *Biochem. Z.* **169**, 352—354. Über eine neue Form der Chinhydronelektrode.
7. Klisiecki A., Mozołowski W., Taubenhaus M., (1927) *Biochem. Z.* **181**, 80—84. Über die Ammoniakbildung im physiologisch stagnierendem Blute.
8. Mozołowski W., Taubenhaus M., (1927) *Biochem. Z.* **181**, 85—95. Hängt die Ammoniakbildung im Blute mit der Anwesenheit von Cyanaten zusammen.
9. Parnas J. K., Mozołowski W., (1927) *Biochem. Z.* **184**, 399—441. Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung I.
10. Parnas J. K., Mozołowski W., (1927) *Klinische Wochenschrift* **6**, 998—999. Über die Ammoniakbildung im Muskel und ihren Zusammenhang mit Tätigkeit und Zustandsänderung.
11. Parnas J. K., Mozołowski W., Lewinski W., (1927) *Klinische Wochenschrift* **6**, 1710—1711. Über die Ammoniakbildung im isolierten Muskel und ihren Zusammenhang mit der Muskelarbeit.
12. Parnas J. K., Mozołowski W., Lewinski W., (1927) *Biochem. Z.* **188**, 15—23. Der Zusammenhang des Blutammoniaks mit der Muskelarbeit.
13. Mozołowski W., Lewinski W., (1927) *Biochem. Z.* **190**, 388—398. Über den Ammoniakgehalt und die Ammoniakbildung im Muskel und deren Zusammenhang mit Funktion und Zustandsänderung IV.
14. Chrzęszczewski S., Mozołowski W., (1928) *Acta Biol. Exp.* **2**, 47—60. Badania nad wzajemną zależnością powstawania kwasu mlekowego i amoniaku w mięśniach płazów.
15. Chrzęszczewski S., Mozołowski W., (1928) *Biochem. Z.* **194**, 233—243. Der Verlauf der traumatischen Milchsäure und Ammoniakbildung und ihre Abhängigkeit von hemmenden Faktoren.
16. Mozołowski W., Hilarowicz H., (1928) *Polska Gazeta Lekarska* **7**, 409. Uwagi o rzekomych własnościach antypeptycznych surowicy krwi.

17. Mozołowski W., (1928) *Lekarz Wojskowy* **12**, 41—57. O źródle amoniaku krwi.
18. Mozołowski W., (1928) *Klinische Wochenschrift* **7**, 2202—2203, Über die Quelle des im Blute entstehenden Ammoniaks.
19. Mozołowski W., (1929) *Biochem. Z.*, **206**, 150—157. Über den Ursprung des Blutammoniaks.
20. Mozołowski W., Mann T., Lutwak C., (1931) *Biochem. Z.* **231**, 290—305. Die Stellung der Ammoniakbildung in der Reihenfolge der chemischen Vorgänge im tätigen Muskel.
21. Mozołowski W., Mann T., (1932) *Biochem. Z.* **249**, 161—175. Die Ammoniakbildung im Schildkrötenblut.
22. Mozołowski W., Mann T., (1932) *Biochem. Z.* **250**, 487—488. Die Bildung eines phenolartigen Körpers, welche die Ammoniakbildung im hämolysierten Schildkrötenblut begleitet.
23. Mozołowski W., Reis J., Sobczuk B., (1932) *Biochem. Z.* **249**, 157—160. Ammoniakbildung und Pyrophosphatzerfall im Muskel.
24. Mozołowski W., Heller J., (1932) *Wiadomości lekarskie* **12**, 3—12. O rozmieszczeniu kwasu moczowego pomiędzy krwinki, a osocze.
25. Mozołowski W., Sobczuk B., (1933) *Biochem. Z.* **265**, 41—49. Ammoniakbildung und Pyrophosphatzerfall im Muskel II.
26. Lutwakówna C., Mozołowski W., (1933) *Przegląd Fizjologii Ruchu*, Warszawa. Zmiany chemiczne w mięśniach znużonych w różnych temperaturach.
27. Mozołowski W., Sobczuk B., (1934) *Przegląd Fizjologii Ruchu*, Warszawa. Rozpad kwasu adenylotryfosforowego w mięśniu.
28. Baranowski T., Mozołowski W., (1934) *Klinische Wochenschrift* **13**, 955—956. Die Saccharose im Harn bei einen Falle von Pankreaserkrankung.
29. Lutwak C., Mozołowski W., (1934) *Biochem. Z.* **272**, 157—166. Der Einfluss der Temperatur auf die chemische Zusammensetzung der anaerob ermüdeten Muskeln.
30. Mozołowski W., (1937) *Acta Biol. Exp.* **11**, 348—356. Sprzężone związki kwasu glukuronowego w ustroju zwierzęcym.
31. Mozołowski W., (1938) *Polska Gazeta Lekarska* **17**, 161—162. Skład ilościowy normalnego moczu.
32. Mozołowski W., Rogowski P., (1939) *Acta Biol. Exp.* **13**, 139—142. Über die Anwendung der Naphtoresorcinprobe für die quantitative Bestimmung der Glukuronsäure.
33. Mozołowski W., (1940) *Biochem. J.* **34**, 823—828. The quantitative estimation of glycuronic acid and its conjugated compounds by means of naphtoresorcinol test of Tollens.*
34. Mozołowski W., (1948) *Lancet*, **3**, 423. Chemical composition of normal urine.
35. Mozołowski W., (1948) *Chemia i Technika* **2**, 81—103. Mechanizm detoksykacji ustrojowych.
36. Mozołowski W., (1949) *Acta Biol. Exp.* **15**, 44—45. Stan równowagi dynamicznej w detoksykacjach ustrojowych.
37. Mozołowski W., Żydowo M., Kalinowski J., Moszczyńska Z., (1950) *Bull. Acad. Polon. Sciences et Lettr. Classe de Medicine* str. 65—78. A characterization of the blood-serum in the newborn child, in the parturient woman, and in the healthy non-pregnant woman by means of refraction, viscosity and specific gravity.
38. Mozołowski W. Żydowo M., Kalinowski J., Moszczyńska Z., (1950) *Sprawozdania P. A. U.* **51**, 392. Charakterystyka surowicy krwi noworodka, rodzącej kobiety i zdrowej kobiety nie w ciąży przy pomocy refrakcji, lepkości i ciężaru właściwego.

39. Mozołowski W., (1951) Sprawozdania P. A. U. 52, 356—359. Charakterystyka surowicy krwi przy pomocy zawartości azotu, refrakcji, ciężaru właściwego i lepkości. Doniesienie III: Próba interpretacji.
40. Mozołowski W., (1954) *Acta Biochim. Polon.* 1, 59—71. Charakterystyka białek surowicy krwi człowieka przy pomocy zawartości azotu i niektórych właściwości fizycznych.

Podręczniki i rozdziały podręcznikowe.

1. Parnas J. K., Mozołowski W., (1934) *Dietetyka* str. 3—64, Wyd. Delta, Warszawa. Rozdział pt. „Podstawy chemiczne i fizjologiczne dietetyki”.
2. Mozołowski W., (1937) *Podręcznik Chemii Fizjologicznej*, red. Parnas J. K., t. 2, str. 99—144, Wyd. Delta, Warszawa. Rozdział pt. „Mocz”.
3. Mozołowski W., (1937) *Podręcznik Chemii Fizjologicznej*, Red. Parnas J. K., t. 2, str. 481—503, Wyd. Delta, Warszawa. Rozdział pt. „Fizjologia ilościowa Przemiany i Odżywiania”.
4. Mozołowski W., (1946) *Ćwiczenia z Chemii Nieorganicznej*. Sekcja wydawnicza Bratniej Pomocy Studentów Akademii Lekarskiej w Gdańsku.
5. Mozołowski W., (1948) *Podręcznik Chemii Fizjologicznej*, red. Przyłęcki S., str. 535—560, Wyd. Lemanski, Łódź. Rozdział pt. „Mocz”.
6. Mozołowski W., (1949) *Ćwiczenia z Chemii Nieorganicznej*. Lekarski Instytut Naukowo-Wydawniczy. Warszawa.
7. Mozołowski W., (1948) *Wstępne wiadomości z Chemii Fizycznej dla Studentów Medycyny*. Lekarski Instytut Naukowo Wydawniczy. Warszawa.
8. Mozołowski W., Żydowo M., (1959) *Ćwiczenia z Chemii Fizjologicznej*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe. Warszawa.
9. Mozołowski W., Żydowo M., Niemiro R., Rzeczycki W., Żelewski L., (1968) *Ćwiczenia z Chemii Ogólnej i Biochemii*. Akademia Medyczna w Gdańsku.

Prace z zakresu historii medycyny i biochemii

1. Mozołowski W., (1938) *Polska Gazeta Lekarska* 17, 954—955. Jędrzej Śniadecki, chemik, fizjolog i lekarz.
2. Mozołowski W., (1938) *Acta Biol. Exp.* 12, 49—57. Jędrzej Śniadecki jako fizjolog.
3. Mozołowski W., (1939) *Nature* 143, 121. Jędrzej Śniadecki (1768—1838) on the cure of rickets.
4. Mozołowski W., (1946) *Pol. Tyg. Lek.* 1, 1241—1243. Sylwetki Lekarzy Polskich. Jędrzej Śniadecki.
5. Mozołowski W., (1949) *Pol. Tyg. Lek.* 4, 885—886. Zdobycze naukowe i organizacyjne w dziedzinie chemii fizjologicznej w Polsce w okresie powojennym.
6. Mozołowski W., (1950) *Pol. Tyg. Lek.* 5, 1633—1635. Działalność naukowa Ernesta Aleksandra Syma.
7. Heller J., Mozołowski W., (1958) *Post. Bioch.* 4, 5—16. Jakub Parnas. Działalność nauczycielska w latach 1916—1939.
8. Mozołowski W., (1964) *Nauka Polska*. Bolesław Skarżyński 1901—1963.
9. Mozołowski W., (1966) *Post. Bioch.* 12, 587—596. Wincenty Arnold, biochemik i lekarz.

Prace przeglądowe, popularyzatorskie; wykłady i artykuły dyskusyjne

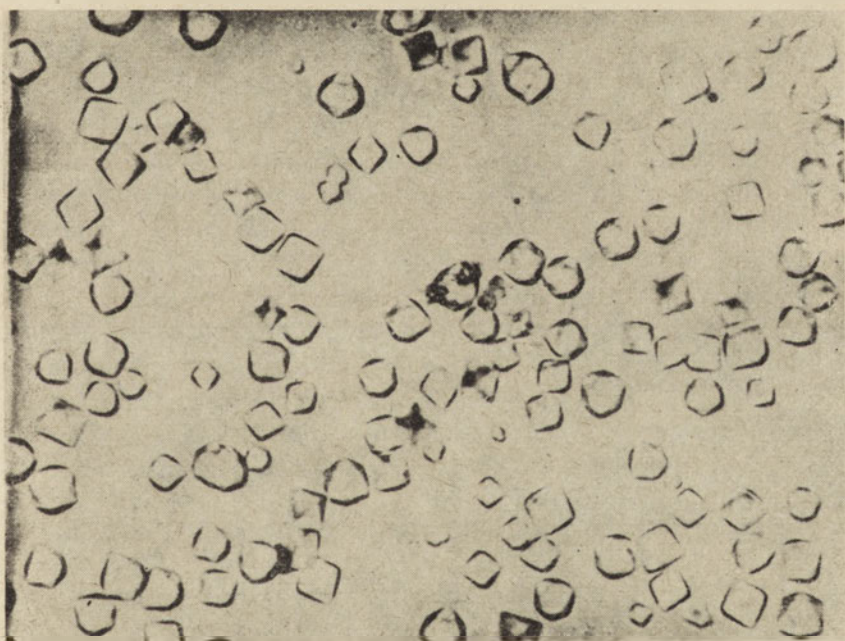
1. Mozołowski W., (1925) *Przyroda i Technika*, 4, 114—117. Insulina.
2. Mozołowski W., (1926) *Przyroda i Technika*, 5, 535—537, 411—417. O stężeniu jonów wodorowych.
3. Mozołowski W., (1927) *Przyroda i Technika*, 6, 433—442. O zaczynach.

4. Mozołowski W., (1929) *Przyroda i Technika*, 8, 49—51. O budowie chemicznej hormonów.
5. Mozołowski W., (1929) *Przegląd Sportowo-Lekarski*, Warszawa. W sprawie udziału lekarzy w zawodach sportowych ze szczególnym uwzględnieniem lekarza chemika.
6. Mozołowski W., (1929) *Lekarz Wojskowy* 13, 573—580. O zaczynach proteolitycznych ustroju zwierzęcego.
7. Mozołowski W., (1930) *Wiadomości Lekarskie* 3, 420—441. Fizjologia zmęczenia przemysłowego.
8. Mozołowski W., (1932) *Praktyka Lekarska* 6, 1—4. Uwagi w sprawie wykrywania cukru gronowego w moczu.
9. Mozołowski W., (1932) *Polska Gazeta Lekarska* 11, 75—76. Nowe badania doświadczalne nad wydzielaniem moczu w nerce.
10. Mozołowski W., (1933) *Lekarz Wojskowy* 21, 193—204, 297—302. Przemiany chemiczne w mięśni pracującym.
11. Mozołowski W., (1933) *Słowo Polskie*. Kapitał serc. Uwagi o wiecu ligi ochrony zwierząt.
12. Mozołowski W., (1934) *Praktyka Lekarska*. Ogólne wiadomości o chemii gazów bojowych.
13. Mozołowski W., (1938) Zakłady Graficzne „Znic”. Wilno. O fizjologicznych podstawach odżywiania.
14. Mozołowski W., (1938) *Wszechświat* 5, 131—137. Budowa Chemiczna Fermentów.
15. Mozołowski W., (1938) *Polska Zbrojna*. Dar rodziny wojskowej ku uczczeniu Józefa Piłsudskiego.
16. Mozołowski W., (1947) *Pol. Tyg. Lek.* 2, 969—972. Stan dynamiczny żywej substancji.
17. Mozołowski W., (1947) *Pol. Tyg. Lek.* 2, 1193—1196. Znaczenie nauk teoretycznych w wykształceniu lekarza.
18. Mozołowski W., (1947) *Tygodnik Powszechny*. Pochodzenie człowieka w poglądach biochemika.
19. Mozołowski W., (1948) *Pol. Tyg. Lek.* 3, 26—32. Program nauczania Chemii Lekarskiej.
20. Mozołowski W., (1937) *Wszechświat* 4, 1—10. Chemia hormonów płciowych i substancji rakotwórczych.
21. Mozołowski W., (1953) *Wiadomości chemiczne* 7, 9—22. Ogólny pogląd na przemianę pośrednią żywych ustrojów.
22. Mozołowski W., (1952) *Pamiętnik II Zjazdu Hematologów*, Gdańsk. Chemia białek osocza.
23. Mozołowski W., (1952) *Pamiętnik II Zjazdu Hematologów*, Gdańsk. Jakościowa ocena białek surowicy za pomocą niektórych właściwości fizycznych.
24. Mozołowski W., (1954) *Post. Bioch.* 2, 8—20. Pojęcie normy i liczbowe ujęcie wyników w biochemii klinicznej.
25. Mozołowski W., (1955) *Wiadomości Chemiczne* 9, 165—174. Powstawanie kwasu askorbinowego w żywych ustrojach.
26. Mozołowski W., (1956) *Wiadomości Chemiczne* 10, 353—363. Cykl pentozowy węglowodanów.
27. Mozołowski W., (1956) *Polski Przegląd Chirurg.* 28, 779—807. Fizjologiczne podstawy gospodarki wodnej i mineralnej jako wstęp do rozważania tych spraw u chorych operowanych.
28. Mozołowski W., (1959) *Pol. Tyg. Lek.* 14, 609—612. Biochemiczna indywidualność, a struktura białek.
29. Mozołowski W., (1960) *Roczniki Filozofii* 7, 113—122. Jedność świata żywego w poglądach biochemika.
30. Mozołowski W., (1961) *Post. Bioch.* 7, 199—205. Biochemia, a medycyna.

WŁODZIMIERZ OSTROWSKI *

**Kataliza biologiczna —
w 50-lecie krystalizacji ureazy przez J. B. Sumnera**

„Po prawie dziewięciu latach pracy prowadzonej przeze mnie we współpracy z dr V. A. Grahamem i dr C. V. Nobackiem, 29 kwietnia odkryłem sposób otrzymywania z fasoli „Jasiek” (*jack bean*) nowego białka, które pięknie krystalizuje i w roztworach wykazuje wprost niezwykłą zdolność rozkładu mocznika na węglan amonu. Kryształy białka (pokazane na ryc. 1) zostały poddane analizie dzięki uprzejmości dr A. C. Gilla, który je określił, jako bezbarwne, ostro ukształtowane, izomorficzne oktahedry. Kryształy nie wykazują podwójnej refrakcji i posiadają średnicę 4 do 5 μ ”.



Ryc. 1. Fotomikrografia kryształów ureazy powiększonych 728-krotnie. (z pracy J. B. Sumnera)

* Prof. dr, Instytut Biochemii Lekarskiej Akademii Medycznej, ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków.

Ta powściągliwa relacja Sumnera anonsująca o otrzymaniu pierwszego enzymu w stanie krystalicznym — ureazy (J. B. Sumner, (1926), *J. Biol. Chem.*, **69**, 435—441) stała się prawdziwą sensacją w świecie naukowym drugiej połowy lat 20-tych. Niezwykle prosta metoda, pozwalająca w ciągu 24 godzin z mączki *Canavalia ensiformis* wyekstrahować acetonem i otrzymać kryształy enzymu kilkaset bardziej aktywnego niż surowy produkt, spotkała się z niedowierzaniem i wyraźnym sceptycyzmem ze strony wielu wysokiej rangi uczonych. Jeszcze przez kilka następnych lat utrzymywał się dawny pogląd, że białko jest tylko nośnikiem nieokreślonego chemicznie enzymu, a nie samym enzymem. Dopiero J. H. Northrop przez krystalizację pepsyny z soku żołądkowego w 1930 r. oraz trypsyny i chymotrypsyny z soku trzustkowego w 1932 r. dostarczył konkretnych i przekonujących dowodów świadczących o białkowej naturze enzymów. Na IV Kongresie Chemii Biologicznej w Paryżu w 1933 r. ostatecznie zwyciężył duch realizmu i naukowego dowodu nad antysubstancjalną koncepcją enzymu. „Za odkrycie, że enzymy można krystalizować” J. B. Sumner otrzymał w 1946 r. nagrodę Nobla, wespół z J. H. Northropem i W. M. Stanleyem, którym przyznano ją „za uzyskanie enzymów i białek wirusowych w czystej postaci”.

Nauka o katalizie enzymatycznej rozwijała się już ponad 100 lat zanim enzymy uznano za określone chemicznie substancje białkowe. Pojęcie biokatalizy wiąże się ściśle z rozwojem wiadomości o reakcjach katalitycznych w ogóle. W 1812 r. F. C. Vogel opisał pierwszą reakcję katalityczną, w której w obecności węgla aktywowanego, tlen i wodór reagują ze sobą w niskiej temperaturze. W następnych latach H. i E. Davy, P. L. Dulong, L. J. Thenard i inni opisali reakcje przebiegające tylko w obecności rozdrobnionej platyny. Wykazywano również sporadycznie przyspieszenie reakcji chemicznych przez ekstrakty z materiałów biologicznych, jak na przykład utlenianie gwajakolu w obecności korzeni roślinnych (L. A. Planche, 1810) lub powstawanie cukru w zawiesinie mąki z kiełkującego ziarna (G. S. C. Kirchoff, 1816). W 1833 roku A. Payen i J. F. Persos z alkoholowego ekstraktu słodu jęczmiennego wyodrębnili biały, rozpuszczalny w wodzie proszek powodujący szybką solubilizację skrobi. Tę aktywną substancję odkrywcy nazwali diastazą. W trzy lata później T. Schwann otrzymał pepsynę z żołądka świni, a F. Wöhler i J. Liebig wyodrębnili emulsynę z gorzkich migdałów. Mimo to nie znane było jeszcze pojęcie enzymu ani katalizy.

Termin kataliza wprowadził po raz pierwszy J. J. Berzelius w 1837 r. postulując równocześnie, że substancje obdarzone właściwościami katalitycznymi nie wykazują powinowactwa lecz wzbudzają w różnych związkach nieujawnione dotychczas właściwości zwane siłami katalitycznymi. Berzelius utrzymywał również, że w organizmach roślin i zwierząt zachodzi tysiące reakcji katalitycznych, dzięki którym powstają różnorodne związki chemiczne. Choć nie miał wielu dowodów na poparcie swej

hipotezy to jednak w drugiej połowie XIX wieku faktów przemawiających za jego sugestią rejestrowano coraz więcej. Tak więc Claude Bernard otrzymał lipazę z trzustki (1849), M. Berthelot zaś inwertazę z drożdży (1860), a W. Kühne trypsynę z soku jelitowego (1877). W rok później ten sam badacz wprowadził termin **enzym**. Wkrótce zaczęto rozróżniać enzymy poza- i wewnątrzkomórkowe, czyli „uorganizowane” (L. Pasteur) i „nieuorganizowane” (J. Liebig), głównie w oparciu o badania nad fermentacją alkoholową. Z kolei w 1888 r. W. Ostwald stwierdził, że zarówno katalizatory nieorganiczne, jak i enzymy nie inicjują reakcji ani nie zmieniają końcowego stanu równowagi, zmieniają natomiast szybkość reakcji chemicznej. Ostwald utrzymywał również, że w reakcjach odwracalnych enzymy powinny działać w obu kierunkach, co w 1898 r. eksperymentalnie udowodnił Croft-Hill wykazując, że maltaza taki sam cukier syntetyzuje jak i rozkłada.

Następnym ważnym krokiem na drodze poznania natury enzymów, które w dalszym ciągu uważano za czynniki niesubstancjalne, działające jedynie poprzez zagadkowe nieuchwytnie siły, było wykazanie przez E. Buchnera (1897), że sok wyciśnięty z drożdży powoduje fermentację alkoholową. Tak więc wieloletni spór pomiędzy Pasteurem i Liebigiem został zakończony, gdyż okazało się, że postulowany przez Liebiga ferment istnieje w drożdżach (zymaza) i proces fermentacji cukrów można przeprowadzić przy jego pomocy z takim samym efektem, jak i przez użycie całych komórek drożdżowych.

Odkrycie dokonane przez Buchnera miało istotne znaczenie dla dalszych badań w dziedzinie enzymologii. W następnych latach rozwinięto swoiste metody biochemiczne analizy aktywności enzymów, ich izolowania, lokalizacji w komórkach, jak również badanie ich funkcji i mechanizmu działania. Jeszcze przed upływem XIX wieku G. Bertrand wprowadził pojęcie koenzymu (1897), A. Harden i W. J. Young w 1906 r. wykazali obecność kozymazy (obecnie NAD) w drożdżach, której strukturę ustalili O. Warburg i H. Euler w połowie lat 30-tych. Powyższe osiągnięcia biochemii sprawiły, że oprócz badań nad hydrolazami zwrócono większą uwagę na oksydoreduktazy, inicjując badania nad ich strukturą, mechanizmem działania i funkcją biologiczną. Dziś znamy kilka tysięcy enzymów, wiele z nich otrzymano w stanie krystalicznym, usystematyzowano w sześć podstawowych grup uwzględniających sposób działania na swoiste substraty.

Z początkiem naszego stulecia rozwijała się równocześnie teoria o fundamentalnym znaczeniu dla enzymologii — teoria przejściowego kompleksu enzym-substrat (V. Henri i A. J. Brown, 1902). Rozwinięta dalej przez L. Michaelisa i M. L. Menten (1913) doprowadziła do ustalenia wyrażenia dla początkowej szybkości reakcji enzymatycznej oraz pojęcia wartości stałych tej szybkości, K_m i V_{max} . Dało to teoretyczne podstawy współczesnej kinetyce reakcji enzymatycznych opartej na koncepcji dynamicz-

nej równowagi pomiędzy enzymem, substratem i kompleksem E—S. Poznanie tych zależności umożliwiło z kolei śledzenie wpływu aktywatorów, inhibitorów, pH, siły jonowej, temperatury i innych czynników na przebieg reakcji enzymatycznych łącznie z badaniem tak złożonych procesów, jakie obserwujemy przy działaniu enzymów regulacyjnych czy też kompleksów multienzymatycznych.

Otrzymanie licznych enzymów w stanie czystym, krystalicznym umożliwiło poznanie ich struktury chemicznej i przestrzennej głównie przez zastosowanie krystalografii rentgenowskiej, co łącznie z poznaniem swoistości reakcji enzymatycznych doprowadziło do koncepcji aktywnego centrum jako miejsca w łańcuchu polipeptydowym o określonej konfiguracji, odpowiedzialnego za interakcję enzymu z substratem i przetwarzanie tego ostatniego na stosowny produkt. Hipoteza „zamka i klucza” została sformułowana przez E. Fischera w 1894 r. dla wyjaśnienia mechanizmu dopasowywania się enzymu do cząsteczki substratu i przez dziesiątki lat tłumaczono przy jej pomocy wiele zjawisk z zakresu swoistości enzymów. W ciągu tego czasu nagromadzono jednak sporo faktów, których ona nie wyjaśniała. W szczególności interakcja substratów o różnej strukturze z tym samym enzymem, sugerowała, że enzym nie występuje w formie komplementarnej do struktury substratu, lecz że strukturę jego indukuje substrat. Tak więc powstała nowa koncepcja, teoria indukowanego dopasowywania się enzymów zaproponowana przez D. E. Koshlanda i wsp. (1959), która zakłada zmianę konformacji enzymu pod wpływem małych cząsteczek substratu lub innego efektora. Doprowadza to następnie do pojęcia enzymów allosterycznych (J. Monod, 1965), regulacyjnych — problemu o kluczowym znaczeniu dla wyjaśniania zawitych dróg tysięcy reakcji metabolicznych zachodzących w każdej żywej komórce.

Rozwój nowoczesnych metod frakcjonowania białek pozwolił ujawnić subtelne różnice w strukturze populacji cząsteczek poszczególnych enzymów i doprowadził do wykrycia zjawiska izoenzymii. Ponieważ poziom poszczególnych izoenzymów danego enzymu zmienia się pod wpływem określonych czynników hormonalnych, żywieniowych, stanów patologicznych itp., stwarza to możliwości śledzenia zmian procesów regulacyjnych w różnych tkankach i narządach w warunkach prawidłowych i w chorobie.

Do niedawna większość badań nad przebiegiem procesów enzymatycznych przeprowadzano w układach homogenicznych, tj. kiedy enzym i substrat znajdują się w stanie rozpuszczalnym. Tymczasem znaczna część reakcji enzymatycznych w komórkach roślinnych, zwierzęcych, w membranach komórkowych, w przewodzie pokarmowym czy w glebie odbywa się w układach heterogenicznych (np. amylaza — skrobia, celulozy — celuloza, lipazy — tłuszczoce, kolagenaza — kolagen, itd.). Dlatego w ostatnich latach poświęca się wiele uwagi otrzymywaniu i badaniu tzw. enzymów nierozpuszczalnych, które na ogół cechuje wyższa stabilność, od-

porność na działanie inhibitorów, łatwiej osiągają szybkość maksymalną reakcji, a nieraz i wyższą aktywność niż preparaty rozpuszczalne odpowiednich enzymów. Cząsteczki enzymów uwięzione w sieci nierozpuszczalnych polimerów, powiązane za pomocą dwufunkcyjnych odczynników lub przyłączone do reaktywnych grup substancji wysoko spolimeryzowanych, znalazły szerokie zastosowanie w pracowniach biochemicznych, w diagnostyce lekarskiej, w leczeniu schorzeń układu pokarmowego i oddechowego oraz już na wielką skalę w przemyśle. Zastosowanie praktyczne enzymów nierozpuszczalnych będzie z roku na rok wzrastać z uwagi na dużą wydajność procesów enzymatycznych w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i chemicznym, przy równocześnie niewielkim zużyciu energii. Tak więc w 50 lat po otrzymaniu pierwszego enzymu w stanie krystalicznym, rysują się coraz szersze horyzonty badań w dziedzinie enzymologii i biologii molekularnej, a równocześnie wzrasta zastosowanie biokatalizatorów w życiu praktycznym, głównie w postaci reaktorów enzymatycznych usprawniających i obniżających kosztów produkcji różnych związków organicznych i produktów spożywczych.

KOMUNIKAT

ZARZĄDU GŁÓWNEGO POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na posiedzeniu w dniu 3 września 1975 r. przyznał następujące doroczne nagrody Towarzystwa:

Nagrodę im. Jakuba Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną wykonaną w kraju i opublikowaną w roku 1974 Elżbiecie Romanowskiej i Czesławowi Ługowskiemu z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu za zespół prac: „Biochemical properties of lipid A from *Shigella sonnei*”, (1974), *Eur. J. Biochem.* **48**, 81—87 i „Chemical studies on *Shigella sonnei* lipid A”, (1974), *Eur. J. Biochem.* **48**, 319—323.

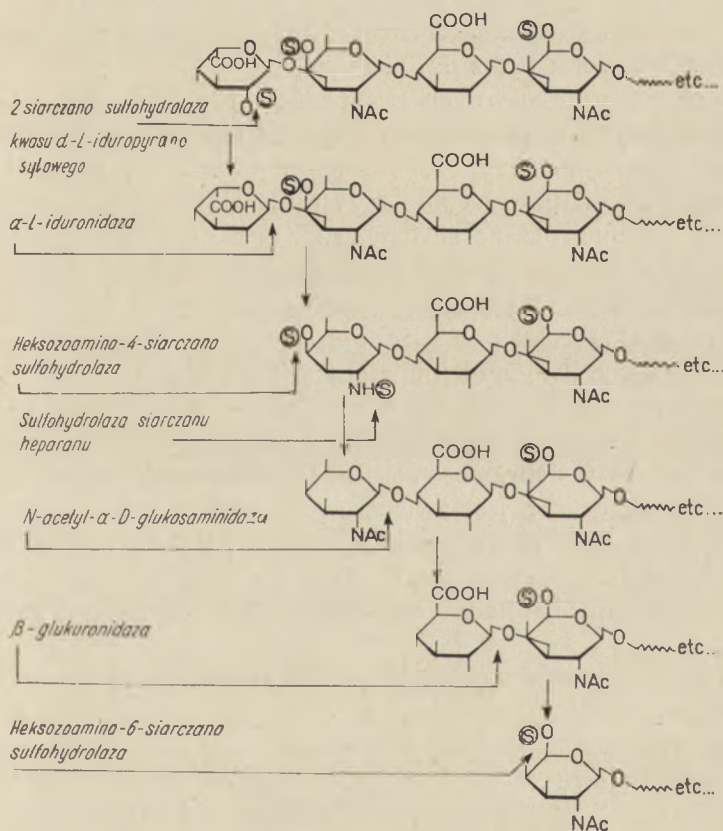
Nagrodę im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł przeglądowy opublikowany w kwartalniku Postępy Biochemii w 1974 r. Gabrieli M. Sarzale-Drabikowskiej za artykuł nt. „Struktura i funkcja błon sarkoplazmatycznego retikulum (mięśni szkieletowych)”, (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 403—423.

JADWIGA GNIOT-SZULŻYCKA *

Niedobory enzymatyczne leżące u podstaw mukopolisacharydoz

Mucopolisaccharidoses, Enzyme deficiencies

Mianem mukopolisacharydoz określa się grupę genetycznie uwarunkowanych schorzeń charakteryzujących się niedoborem lizosomalnych enzymów odpowiedzialnych za prawidłową degradację glikozoaminoglikanów



Ryc. 1. Proces degradacji siarczanu dermatanu i siarczanu heparanu

* Dr, Zakład Biochemii Instytutu Biologii Uniwersytetu M. Kopernika, ul. Sienkiewicza 30/32, 87-100 Toruń

(mukopolisacharydów). W wyniku czego następuje ich akumulacja w tkankach i wzmożone wydalanie wraz z moczem (1, 2).

Glikoaminoglikany (mukopolisacharydy) są polimerami zbudowanymi z powtarzających się podjednostek acetylowanej i siarczanowej heksozoaminy (glukozoaminy lub galaktozoaminy) związanej wiązaniem glikozydowym z kwasem glukuronowym lub iduronowym (ten ostatni może być również siarczanowany). Aktualne dane dotyczące budowy glikoaminoglikanów przedstawił w swej przeglądowej pracy Tomaszewski (3).

Pierwsze kliniczne przypadki mukopolisacharydoz opisane zostały przez Huntera i Hurler odpowiednio w 1917 i 1919 roku (1, 2). Obydwa zespoły charakteryzuje odrębność fenotypowa, różnorodny stopień upośledzenia umysłowego oraz odrębny mechanizm dziedziczenia: autosomalno-recesywny w przypadku zespołu Hurler i recesywny lecz związany z chromosomem X w przypadku zespołu Huntera.

Większość przypadków opisanych później około 1960 roku określano mianem gargoylizmu (maszkaronizm); termin ten został wprowadzony do literatury w 1936 roku przez Ellisa (4).

Z czasem jednakże pewnych przypadków nie udało się zaklasyfikować do klasycznych form zespołów Huntera i Hurler a określenie gargoylizm stało się zbyt szerokie i nieadekwatne (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

W obecnej chwili powszechnie przyjmuje się podany w tabeli 1 podział mukopolisacharydoz na siedem grup. Sześć z nich obejmuje mukopolisacharydozy sklasyfikowane przez Kusicka, siódma, (MPS) opisana później charakteryzuje się brakiem β -glukuronidazy.

Wykryta w 1971 roku przez Sprangera (12) chondroitynosulfatyduria być może poszerzy listę mukopolisacharydoz. Przekazywanie mukopolisacharydoz typu III—IV odbywa się w sposób autosomalno recesywny, przekazywanie zaś mukopolisacharydoz typu II również w sposób recesywny lecz związany z chromosomem X. Charakterystyczną cechą wszystkich mukopolisacharydoz jest zwiększone w porównaniu z normą wydalanie z moczem kwaśnych mukopolisacharydów, jak również gromadzenie się ich w wielu tkankach jak nerki, gruczoły limfatyczne, zastawki sercowe, śledziona, wątroba, nadnercza, chrząstka, rogówka i centralny układ nerwowy.

Brante jako pierwszy w 1952 roku (6) wykazał, że metachromazja, stwierdzona w tkankach chorych jest wynikiem gromadzenia się mukopolisacharydów oraz stwierdził, iż 10% masy ich wątroby stanowią mukopolisacharydy zawierające 27% heksozoaminy, 26% kwasów uronowych i 3,9% siarki. W przypadku zespołu Hurler i Huntera oraz Scheie, stwierdzono wydalanie z moczem i gromadzenie w tkankach siarczanu dermatanu i siarczanu heparanu; W przypadku zespołu Sanfilippo siarczanu heparanu, a w przypadkach zespołów Morquio i Maroteaux-Lamy odpowiednio siarczanu keratanu i siarczanu dermatanu (13, 2). W przy-

Tabela 1

Klasyfikacja mukopolisacharydoz

Typ	Symptomy	Sposób dziedziczenia	Mukopolisacharydy nieprawidłowo metabolizowane
I Pflaunder-Hurler	Typowe zmiany wyrazu twarzy (gargoylne), zmętnienie rogówki, upośledzenie umysłowe	autosomalno-recesywny	Siarczan dermatanu Siarczan heparytyny
II Hunter	Niewielkie zmiany wyrazu twarzy, brak zmętnienia rogówki, niedorozwój umysłowy wczesny	X-recesywny	Siarczan dermatu Siarczan heparytyny
III Sanfilippo	Niewielkie zmiany wyrazu twarzy, zmętnienie rogówki, niedorozwój umysłowy wczesny	autosomalno-recesywny	Siarczan heparytyny
IV Morquio	Duże zmiany w układzie kostnym, brak zmętnienia rogówki, intelekt normalny	autosomalno-recesywny	Keratosiarczan
V Scheie	Łagodne zmiany w układzie kostnym, zmętnienie rogówki, niedorozwój umysłowy łagodny	autosomalny-recesywny	Siarczan dermatanu Siarczan heparytyny
VI Maroteaux-Lamy	Zmiany w układzie kostnym, zmętnienie rogówki, intelekt normalny	autosomalny-recesywny	Siarczan dermatanu
VII Obniżonej aktywności β -glukuronidazy	Duże zmiany w układzie kostnym, zmętnienie rogówki, niedorozwój umysłowy	autosomalny-recesywny	Siarczan dermatanu chondroityno-4-, chondroityno-6-siarczan

padku mukopolisacharydozy VII, stwierdzono nadmierne wydalanie chondroityno 4- i 6-siarczanów (14) oraz nadmierne gromadzenie niezdegradowanego siarczanu dermatanu (15). Glikozoaminoglikany akumulowane i wydalane z ustroju w różnych typach mukopolisacharydoz wykazują zmienioną strukturę chemiczną. Chorzy z zespołem Huntera i Hurler wydalają z moczem siarczan dermatanu (16, 17) bogatszy w grupy siarczanowe, oraz jak wskazują niektórzy autorzy wydalają również dwusiarczanowany dwucukier (18).

Z badań (19) nad produktami degradacji znakowanego $^{35}\text{SO}_4$ -siarczanu dermatanu z fibroblastów osobników z zespołem Huntera wynika, że siarczanowana jest grupa hydroksylowa kwasu iduronowego a wydalany związek jest $\text{IdUA}-(\text{—SO}_4)-\text{GalNAc}-(\text{—SO}_4)$.

Z moczu osobników z zespołem Hurler (20) wyosobniono również dwie

frakcje siarczanu heparyny, jedna z frakcji wykazywała wysoki stopień N-acetylacji i niską zawartość siarczanu, druga frakcja wykazywała niską N-acetylację i wysoki stopień usiarczanowania.

Podobne frakcje siarczanu heparyny wyosobniono również z moczu osobników z zespołem Sanfilippo (21, 22). Poza tym wykazano, że siarczan heparyny (23) z wątroby, śledziony i moczu osób z zespołem Sanfilippo i Hurler jest heterogenny, o masie cząsteczkowej poniżej 5500, podczas gdy wielocukier wyosobniony z aort ma masę cząsteczkową w granicach 24 000 do 29 000. Siarczan dermatanu wyosobniony z moczu osobników z zespołem Hurler jest również niskopolimeryczną formą (24) podczas gdy wyosobniony z fibroblastów wykazuje normalny ciężar cząsteczkowy.

Badania histochemiczne szeregu tkanek chorych wykazują hipertrofię i przeładowanie lizosomów kwaśnymi mukopolisacharydami jak również lipidami. W zależności od typu schorzenia stwierdza się obecność różnych form wakuoli określanymi przez Van Hoof i Hersa jako A, B i C (25). Wakuole A zawierają materiał granularny i pozostałości matrix ciałek gęstych; występują głównie w narządach mięszowych i leukocytach. W zespole Morquio i Maroteaux-Lamy występują głównie w komórkach Kupffera i makrofagach. Wakuole C zawierają materiał granularny a także wykazują strukturę lamelarną; występują w komórkach wątroby i w fibroblastach. WzmóŜona akumulacja w tkankach i wydalanie z moczem kwaśnych mukopolisacharydów moŜe być wynikiem defektu na drodze biosyntezy lub teŜ degradacji.

Wnikliwa analiza ilości frakcji glikolipidów, glikoproteidów oraz mukopolisacharydów dokonana przez Clause'a i wsp. (30) pozwoliła na usunięcie wniosku, iż defekt metaboliczny leŜący u podstaw mukopolisacharydoz moŜna tłumaczyć brakiem β -galaktozaminidazy. W tym samym roku Van Hooff i Hers (25a) wykazali obniŜoną aktywność tego enzymu w tkankach chorych. Brak β -galaktozaminidazy okazał się jednak niespecyficzny, wspólny dla kilku form mukopolisacharydoz (2). Wprowadzenie do badań na szeroką skalę hodowli fibroblastów skóry przyczyniło się do poznania w ostatnich latach czynników swoistych, odpowiedzialnych za zaburzenia metabolizmu glikozoaminoglikanów w tych schorzeniach. Daines i Bearn (31, 32) wykazali po raz pierwszy, Ŝe hodowane *in vitro* fibroblasty skóry osobników z zespołem Hurler i Huntera wykazują podobną akumulację glikozoaminoglikanów jak tkanki tychŜe osobników. Z badań Matalon i Dorfman (24, 26) oraz Schafer i wsp. (27) wynikało, Ŝe inkorporacja $^{35}\text{SO}_4$ do glikozoaminoglikanów w hodowlach tkankowych fibroblastów, wyprowadzonych ze skóry osób chorych, jest podwyŜszona w zespołach Hurler, niemniej jednak późniejsze badania Frantantoni i wsp. (28, 29) nad włączaniem znakowanego $^{35}\text{SO}_4$ do kultur fibroblastów w zespołach Hurler wskazywała na zaburzenia w degradacji glikozoaminoglikanów.

Nieco późniejsze spostrzeŜenie Frantantoniego i wsp. (28, 33), iż

metabolizm mukopolisacharydów ulega normalizacji po połączeniu hodowli osobników z zespołem Huntera i Hurler, jest początkiem szeroko stosowanej w diagnostyce mukopolisacharydoz techniki *cross correction* i przyczyniło się do poznania specyficznych czynników korekcyjnych. Szereg z nich to zidentyfikowane w obecnej chwili enzymy. Techniki tej jednakże nie można stosować w przypadku zespołu Morquio, ponieważ fibroblasty nie syntetyzują siarczanu keratanu.

Proces sukcesywnej degradacji siarczanu dermatanu, głównego nieprawidłowo metabolizowanego mukopolisacharydu, wymaga współdziałania szeregu enzymów. Przyjmując za Fransonem i Rodenem (34), że siarczan dermatanu jest hybrydem zawierającym zarówno kwas iduronowy jak i kwas glukuronowy, degradację jego (nie zachowując kolejności) przedstawiono na rycinie 1 (str. 17).

Większość badań nad charakterystyką i izolacją czynników korekcyjnych przeprowadził zespół badawczy z Bethesda (Neufeld i wsp.) — źródłem enzymów był głównie mocz ludzki.

Przyjmując za jednostkę korekcyjną tę ilość, która wywołuje połowę maksymalnej korekcji, 1 mg białka moczu posiada 40 jednostek korekcyjnych dla zespołu Huntera, tyleż samo dla zespołu Sanfilippo A i B, 5 jednostek dla zespołu Hurler i 1 jednostkę dla zespołu Maroteaux-Lamy (35). Z nieopublikowanych danych wynika również, że łożysko ludzkie jest bogatym źródłem czynników korekcyjnych (Di Ferrante i wsp.).

Masy cząsteczkowe czynników korekcyjnych wyizolowanych z moczu chorych wynoszą w przypadku zespołu Huntera, 65 000 (36), w przypadku zespołu Sanfilippo A i B odpowiednio 186 000 i 171 000 (37), a w przypadku zespołów Hurler oraz Maroteaux-Lamy odpowiednio 87 000 i 72 000 (35). Preparat arylosulfatazy B z tkanki łożyska ludzkiego (38) o najwyższej aktywności korekcyjnej dla zespołu Maroteaux-Lamy wykazuje masę cząsteczkową 60 000.

Wyosobnione i częściowo oczyszczone czynniki korekcyjne przyspieszają degradację akumulowanych w fibroblastach mukopolisacharydów, co objawia się: wzrostem ilości produktów degradacji, znikaniem dodawanych mukopolisacharydów, zmianą chemicznych właściwości produktów degradacji przez co stają się one zbliżone w budowie do wydalanych w stanach fizjologicznych (35).

Doświadczenia ze znakowanymi $^{35}\text{SO}_4$ -mukopolisacharydami otrzymanymi z fibroblastów chorych wykazały, że w przypadku zespołu Sanfilippo A pod wpływem czynnika korekcyjnego następuje uwalnianie znakowanego siarczanu, co wskazywało, że czynnik ten jest specyficzną sulfohydrolazą (39). W obecnej chwili wiadomo, że czynnik korekcyjny w przypadku zespołu Sanfilippo A jest sulfaminidazą odszczepiającą grupę siarczanową z wiązania sulfaminowego w siarczanie heparanu (40). Enzym ten został wyizolowany z takich źródeł, jak: tkanka limfatyczna (41), mózg, wątroba, płuca, nerki, skóra, śledziona (42, 43). Optimum aktywności

enzymu przypada w pH 5.0, punkt izoelektryczny w pH 4.7. O braku aktywności sulfaminidazy w zespole Sanfilippo donieśli w 1967 roku K n e c h t i wsp. (20).

W przypadku zespołu Huntera dodanie czynnika korekcyjnego do znakowanych glikozoaminoglikanów wyizolowanych z fibroblastów nie wywołało uwalniania siarczanu (bardzo minimalne). Niemniej jednak czynnik ten działał jako specyficzna sulfohydrolaza, hydrolizująca ester siarczanowy kwasu iduronowego (T i m p l e i wsp., 44). W doświadczeniach z 4-O- α -L-sulfoiduronylo-D-sulfoanhydromannożą jako substratem stwierdzono, że ulegał on hydrolizie z uwolnieniem nieorganicznego siarczanu dopiero po dodaniu α -L-iduronidazy (40% hydrolizy) (19, 45). Specyficzną sulfohydrolazą okazał się również czynnik korekcyjny wyizolowany z moczu osób z tzw. zespołem Morquio, a jest nią glukozoamino-6-sulfohydrolaza (46, 47).

Z analizy produktów degradacji siarczanu dermatanu wyizolowanego z fibroblastów z zespołu Maroteaux-Lamy, O' B r i e n i wsp. (48, 49) wnosią, że enzym, którego brak jest specyficzną N-acetylogalaktozoamino-4-sulfatazą. W zespole tym wykazano obniżoną aktywność arylosulfatazy B (50, 51, 52, 53) a dodanie wysokooczyszczonego preparatu arylosulfatazy B do hodowli tkankowych fibroblastów znosi defekt metaboliczny (54, 55). Z ostatnich doniesień wydaje się wynikać, że arylosulfataza B uwalnia również siarczan z UDP-galaktozoamino-siarczanu (56), jak również w obecności dodatkowego czynnika białkowego z oktasacharydu uzyskanego poprzez degradację siarczanu dermatanu (55), co potwierdza przypuszczenia M a t a l o n i wsp. (49).

Czynnikami korekcyjnymi w zespołach Hurler i Scheie okazała się α -L-iduronidaza (33, 34, 45, 47); w zespole Sanfilippo B N-acetylo- α -D-glukozaaminidaza (48, 58, 59, 60).

W mukopolisacharydozie VII obniżona jest aktywność β -D-glukuronidazy (14, 15, 61, 62, 63). Zestawienie znanych braków enzymatycznych przedstawia tabela 2.

W obecnej chwili prowadzi się badania celem stwierdzenia, czy defekty genetyczne w mukopolisacharydozach są wynikiem braku molekuł białkowych, czy też enzymy występują w zmodyfikowanej formie; nie wyklucza się również obecności inhibitorów lub braku aktywatorów.

Wiadomo na przykład, że warunkiem wykorzystania egzogennej N-acetylo- α -heksozoaminidazy jest obecność w cząsteczce enzymu odpowiedniego markera węglowodanowego, umożliwiającego rozpoznanie enzymu przez błonę i zatrzymanie w obrębie lizosomów (64).

Dokładne poznanie mechanizmu defektów genetycznych pozwoli na właściwy wybór metody terapeutycznej.

Terapia enzymatyczna zapoczątkowana w 1964 roku przez B a u d h u i n (65), w leczeniu zespołu Pompe, jakkolwiek nieefektywna w pierw-

szej wersji, została z pozytywnym skutkiem przeprowadzona przez H u g i S c h u b e r t (66) w tym samym schorzeniu.

Pozytywne efekty w leczeniu zespołu Huntera i Sanfilippo B, uzyskali D i F e r r a n t e i wsp. (67, 68) oraz K n u d s o n i wsp. (69) przez infuzje surowicy krwi, frakcji γ -globulin lub też leukocytów.

Tabela 2

Klasyfikacja enzymologiczna mukopolisacharydoz

Typ	Nazwa enzymu	Skrótowa nazwa typu
I Pflaunder-Hurler	α -L-iduronidaza	MPS I H
IV Scheie	α -L-iduronidaza	MPS I S
II Hunter severe	2-siarczano sulfohydrolaza kwasu α -L-iduropyranosylurowego	MPS II A
II Hunter mild	2-siarczano sulfohydrolaza kwasu α -L-iduropyranosylurowego	MPS II B
III Sanfilippo A	heparytynosiarczano-N-sulfamino sulfohydrolaza	MPS III A
III Sanfilippo B	N-acetyl- α -D-glukozoaminidaza	MPS III B
IV Morquio	heksozamino-6-siarczano sulfohydrolaza	MPS IV
VI Maroteaux-Lamy severe	heksozamino-4-siarczano sulfohydrolaza	MPS VI A
VI Maroteaux-Lamy mild	heksozamino-4-siarczano sulfohydrolaza (arylosulfataza β)	MPS VI B
VII	β -D-glukuronidaza	MPS VII

Preparaty enzymatyczne, zwłaszcza w formie „encapsulowanej” będą niewątpliwie efektywniejszymi środkami terapii.

W pewnych przypadkach, pozytywne efekty, trwałe efekty, uzyskiwane będą przez stosowaną w leczeniu sfingolipidoz, allotransplantację nerki (70, 71, 72) lub transplantację skóry.

Metodą przyszłości w leczeniu chorób genetycznie uwarunkowanych będzie prawdopodobnie wprowadzenie molekuł DNA poprzez transdukcję wirusową. Za pierwszą udaną próbę w tym kierunku można uznać prace Merill i wsp. (73) nad włączaniem genomu faga do fibroblastów z genetycznie uwarunkowanym brakiem α -D-galaktozo-1-fosfourydylo-transferazy.

PIŚMIENNICTWO

1. Mc Kusick V. A., (1972), Hereditary disorders of connective tissue 52—686, C. V. Mosby Comp., Saint Louis.
2. Spranger J., (1972), *Ergebnisse der Inneren Medicine und Kinderheilkunde*, 166—265, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg, New York.
3. Tomaszewski J., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 446—469.
4. Ellis R. W. B., (1936), *Proc. Roy. Soc. Med.*, **30**, 158—162.
5. Morqui L., (1929), *Arch. Med. Enf.*, **32**, 129.
6. Brante G., (1952), *J. Clin. and Lab. Invest.*, **4**, 43—46.
7. Harris R. C., (1961), *Am. J. Dis. Child.*, **102**, 741—742.
8. Scheie H. G., Hambrick G. W., Barness L. A., (1963), *Am. J. Ophthal.*, **53**, 753—769.
9. Sanfilippo S. J., Junis J., Worthen H. G., (1962), *Am. J. Diseases Children*, **104**, 553.
10. Sanfilippo J. S., Podosin R., Langer L., Good R. A., (1930), *J. Pediat.*, **63**, 837—838.
11. Maroteaux P., Leveque B., Marie J., Lamy M., (1963), *Presse Med.*, **7**, 1849—1852.
12. Spranger J., Schuster W., and Freitig F., (1971), *Helv. Paediat. Acta*, **26**, 387—396.
13. Neufeld E. F., and Cantz M. J., (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **179**, 580—587.
14. Sly W. S., Quinton B. A., Mc Alister W. H., (1973), *J. Ped.*, **82**, 249—257.
15. Beaudet A. L., Di Ferrante N., Nichols B., (1972), *J. Am. Soc. Human Genet.*, **24**, 25a.
16. Terry K. and Linker A., (1964), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **115**, 394—402.
17. Calatroni A. and Di Ferrante N., (1968), *Anal. Biochem.*, **25**, 370—378.
18. Coppa G. V., Singh J., Nichols B. L., Di Ferrante N. M., (1973), *Anal. Letters*, **6**, 225—233.
19. Sjöberg I., Fransson L. K., Matalon R., Dorfman A., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1125—1132.
20. Knecht J., Cifonelli J. A., Dorfman A., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4652—4661.
21. Manley G. and Williams V., (1969), *J. Clin. Path.*, **22**, 67—75.
22. Gordon B. A., Haust M. D., (1970), *Clin. Biochem.*, **3**, 203—215.
23. Pedrini V., Lenzi I., Zambotti K., (1962), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **10**, 847—849.
24. Matalon R., Dorfman A., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash)*, **56**, 1310—1316.
25. Van Hoof F., Hers H. G., (1972), Sphingolipids, Sphingolipidoses and Allied Disorders, 211—223, B. V. Volk and H. M. Arnonson.
- 25a. Van Hoof F., Hers H. G., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **7**, 34—44.
26. Matalon R., Dorfman A., (1968), *Fed. Proc.*, **27**, 719 (Abstr. 2828).
27. Matalon R., Cifonelli J. A., Dorfman A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 340—345.
28. Fratantoni J. C., Hall C. W., Neufeld E. F., (1968), *Fed. Proc.*, **27**, 596 (Abstr. 2137).
29. Fratantoni J. C., Hall C. W., Neufeld E. F., (1968), *Science*, **162**, 570—572.
30. Clausen J., Dyggve H. V., Melchior J. C., Christensen Lou H. O., (1967), *Arch. Dis. Child.*, **42**, 62—69.
31. Danes B. S., Bearn A. G., (1965), *Science*, **149**, 987—989.

32. Danes B. S., Bearn A. G., (1966), *J. Exp. Med.*, **123**, 1—16.
33. Fratantoni J. C., Hall C. W., Neufeld E. F., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **64**, 360—366.
34. Weismann U., Neufeld E. F., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **169**, 72.
35. Neufeld E. F., Barton R. W., Cantz M., Dege J. G., Hall C. W., Kresse H., Scott J. F., (1972), *Sphingolipids, Sphingolipidoses and Allied Disorders*, 187—194, B. W. Volk and S. M. Arnson, Plenum Press, N. York, London.
36. Cantz M., Chrambach A., Bach G., Neufeld E. F., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5456—5462.
37. Kresse H., Weismann U., Cantz M., Hall C. W. and Neufeld E. F., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 892—898.
38. Gniot-Szulżycka J., (1972), *Acta Biochim. Polon.*, **19**, 181—189.
39. Kresse H., Neufeld E. F., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2164—2170.
40. Kresse H., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1111—1118.
41. Dietrich C. P., (1970), *Canad. J. Biochem.*, **48**, 725—733.
42. Fridman Y., Arsenis Ch., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1133—1139.
43. Friedman Y., Arsenis Ch., (1974), *Biochem J.*, **139**, 699—708.
44. Timple W. L., Leder I. G., Bach G., Neufeld E., (1974), *Carbohydr. Res.*, **37**, 103—109.
45. Bach G., Eisenberg F., Cantz M., Neufeld E., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 2134—2138.
46. Matalon R., Arbogast B., Dorfman A., (1974), *Ped. Res.*, **8**, 162.
47. Matalon R., Cifonelli J. A., Dorfman A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 709—715.
48. O'Brien J. S., Cantz M., Spranger J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1170—1176.
49. Matalon R., Arbogast B., Dorfman A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 1450—1457.
50. Kihara H., Fluharty A. L., Stevens R. L., (1973). *Abstr. Am. Soc. Human Genetics, Atlanta, Georgia, October 1973*, 24—27.
51. Fluharty A. L., Stevens R. L., Sanders D. L., Kihara H., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 455—461.
52. Stumpf D. A., Austin J. H., Crocker A. C., La France M., (1973), *Am. J. Div. Child.*, **126**, 747—755.
53. Barton R. W., Neufeld E. F., (1972), *J. Ped.*, **80**, 114—116.
54. Di Ferrante N., Hyman B. H., Klish W., Donnelly P. V., Nichols B. L., Dutton R. V., Gniot-Szulżycka J., (1974), *John Hopkins Med. J.*, **135**, 42—54.
55. Gniot-Szulżycka J., Donnelly P. V., (1975), *FEBS Letters* (w druku).
56. Stevens R. L., Fluharty A. L., Fugg G. D., Peak S., Kihara H., (1975), *Fed. Proc.*, **34**, 635 Abstr. 2360.
57. Barton R. W., Neufeld E. F., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7773—7779.
58. O'Brien J. S., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 1720—1722.
59. O'Brien J. S., (1973), *Science*, **181**, 753—755.
60. Von Figura K., Kresse H., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 262—269.
61. Glaser J. H., Sly W. S., (1973), *J. Lab. Clin. Med.*, **82**, 969—977.
62. Hall C. W., Cantz M., Neufeld E. F., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 32—38.

63. Brot F. E., Glaser J. H., Roozen K. J., Sly W. S., Stahl P. D., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 1—8.
64. Hickman S., Neufeld E. F., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 992—999.
65. Baudhuin P. H., Hers G., Loeb H., (1964), *Lab. Invest.*, **13**, 1139—1152.
66. Hug G., Schubert W. K., (1967), *J. Cell. Biol.*, **35**, C1—C6.
67. Di Ferrante N., Nichols B. L., Donnelly P. V., Neri G., Hergovic R., Berglund R. K., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **68**, 303—307.
68. Singh J., Donnelly P. V., Di Ferrante N., Nichols B. L., Niebes P., (1974), *J. Lab. and Clin. Med.*, **84**, 438—450.
69. Knudson A. G. jr., Di Ferrante N., Curtis J. E., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **68**, 1738—1741.
70. Philippart M., Franklin S. C., Gordon A., (1972). *Ann. Int. Med.*, **77**, 195—200.
71. Mahony C. P., Striker G. E., Hickman R., Manning B., Marchioro T. L., (1970), *N. Engl. J. Med.*, **283**, 397—402.
73. Merril C. R., Geier M. and Petriccioni J. C., (1971), *Nature*, **233**, 398—400.

TOMASZ GOŁASZEWSKI *

Kinaza tymidynowa

Thymidine Kinase

Kinaza tymidynowa (5'-fosfotransferaza ATP:tymidyna, E. C. 2.7.1.75 **) — zgodnie z opinią wyrażoną niedawno przez Kornberga (1) — wyróżnia się spośród kinaz nukleozydowych powszechnością występowania oraz rolą, jaką przypisuje się temu enzymowi w metabolizmie prekursorów DNA. Inne kinazy nukleozydowe, takie jak kinaza urydynowa (E. C. 2.7.1.48), kinaza inozynowa (E. C. 2.7.1.73), kinaza adenozynowa (E. C. 2.7.1.20), kinaza dezoksyadenozynowa (E. C. 2.7.1.76), czy kinaza dezoksytydynowa (E. C. 2.7.1.74) są stosunkowo mniej zbadane.

Kinaza tymidynowa katalizuje reakcję ufosforylowania tymidyny do kwasu tymidylowego (dTMP) w „szlaku odzyskiwania” tymidyny (ang. *salvage pathway*, franc. *voie de récupération*). Szlak ten stanowi uzupełnienie głównej drogi syntezy dTMP w komórce przy udziale tzw. syntetazy tymidyłanowej (metylenotransferaza metylenotetrahydrofolian: dezoksyurydino-5'-monofosforan ***), który to enzym katalizuje reakcję przekształcania dezoksyurydynomonofosforanu w dTMP. Proces syntezy dTMP z dUMP określa się umownie szlakiem syntezy dTMP *de novo*. O obu szlakach syntezy dTMP będzie jeszcze mowa w dalszym ciągu artykułu (por. też Schemat 1).

Kluczowe znaczenie kinazy tymidynowej w metabolizmie prekursorów DNA wynika między innymi z faktu, że jest ona pierwszym enzymem w zespole trzech kinaz (por. rozdz. IV), przy udziale których powstaje dTTP — swoisty, a zarazem bezpośredni substrat polimerazy DNA. Szcze-

* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

Wykaz skrótów stosowanych: XMP, XDP i XTP — mono-, dwu- i trójfosforany rybonukleozydów; dXMP, dXDP i dXTP — mono-, dwu- i trójfosforany dezoksyrybonukleozydów; X — zasady występujące w kwasach nukleinowych.

** uprzednio: E. C. 2.7.1.21; por. *Comp. Biochem.*, (1973) 13.

*** tymczasowa pozycja katalogowa: E. C. 2.1.1.b; por. artykuł dotyczący kinazy tymidyłanowej L. K. Smitha i R. E. Ekaina, (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, 167, 61—71.

gólnie ważną rolę — jak można sądzić — spełnia kinaza tymidynowa w układach zawierających podaną z zewnątrz (egzogeniczną) tymidynę znakowaną.

Kinazę tymidynową zaliczono do enzymów syntetyzujących DNA (3). Ze względu na swoje właściwości kinaza ta stanowi enzym modelowy w badaniach regulacji aktywności białek enzymatycznych wprzęgniętych w metabolizm kwasów dezoksyrybonukleinowych (4) i w badaniach ekspresji genów w różnych stanach metabolicznych komórki (por. rozdz. IV). Ponadto badania kinazy tymidynowej przyczyniły się znacznie do poznania rozmieszczenia genów w ludzkim garniturze chromosomowym (por. rozdz. I).

I. Występowanie i zmiany aktywności kinazy tymidynowej

W latach pięćdziesiątych Kornberg i wsp. (5, 6) stwierdzili, że włączanie znakowanej tymidyny do DNA zachodzi przy udziale zespołu enzymów katalizujących reakcje ufosforylowania tego prekursora do dTTP. Enzym przekształcający tymidynę w dTMP — nazwany kinazą tymidynową — wykryto po raz pierwszy w regenerującej wątrobie szczura (7). W latach 1959—1975 ustalono, że aktywność kinazy tymidynowej w różnych układach biologicznych zmienia się równolegle ze zmianami natężenia syntezy DNA i w wielu przypadkach — ze zmianami natężenia podziałów komórkowych.

I-1. Wątroba szczura

Bollum i Potter (7) stwierdzili, iż w regenerującej wątrobie szczura — w okresie między 18 i 72 godziną po dokonaniu częściowej hepatektomii — kinaza tymidynowa wykazuje podwyższoną aktywność właściwą; najwyższy poziom enzymu stwierdzono w okresie intensywnej syntezy DNA, tzn. w czasie między 24 i 30 godziną po operacji. Obserwację tę potwierdzono następnie w innych pracowniach (8—15).

W wątrobie normalnej kinaza tymidynowa wykazuje niską aktywność właściwą (14—17). Okazało się jednak, że aktywność enzymu podnosi się prawie 50-krotnie — osiągając poziom stwierdzany w wątrobie regenerującej — pod wpływem bliżej nie zidentyfikowanego czynnika białkowego zawartego w wyciągach z bakterii *Clostridium perfringens* (16), a także w obecności fosfolipazy C (13). Można więc sądzić, że w narządzie mitotycznie nieaktywnym występuje utajona (latentna) forma enzymu.

W wątrobie embrionalnej aktywność kinazy tymidynowej jest względnie wysoka. W miarę rozwoju zarodkowego narządu aktywność enzymu stopniowo obniża się, równolegle ze spadkiem natężenia syntezy DNA (17).

Dane porównawcze na temat względnej aktywności kinazy tymidynowej w wątrobie embrionalnej i postnatalnej szczura zestawiono w tabeli 1. Temat ten będzie jeszcze omawiany w rozdziale IV.

Tabela 1

Zmiany aktywności właściwej kinazy tymidynowej cytosolu w czasie rozwoju wątroby szczura (17)

Stadium rozwojowe szczura	Aktywność enzymu wyrażona w %
Plód	
17-dniowy	100,0
19-dniowy	60,0
21-dniowy	15,0
Organizm po urodzeniu:	
3-dniowy	15,0
7-dniowy	10,0
14-dniowy	4,0
35-dniowy	1,5
dorosły	0,8

I-2. Tkanki nieaktywne mitotycznie

Podobnie jak w normalnej wątrobie również i w innych tkankach nieaktywnych mitotycznie, jak na przykład w płucach, mięśniach szkieletowych, w sercu i w nerkach, poziom kinazy tymidynowej jest niski (14, 15).

I-3. Komórki i tkanki szybko dzielących się

Prócz komórek narządów embrionalnych (17) wysoką aktywność kinazy tymidynowej wykazuje szpik kostny (14) oraz komórki nowotworowe (18—20). Dane na ten temat zestawiono w tabeli 2.

I-4. Nerka szczura w stanie przerostu wyrównawczego (hipertrofii kompensacyjnej)

W nerce szczura pozostawionej w organizmie po jednostronnej nefrektomii stwierdzono niemal trzykrotne podwyższenie poziomu kinazy tymidynowej drugiego dnia po operacji, a więc w okresie wzmożonej syntezy DNA (21, 22).

I-5. Cykl podziałowy komórek

Poziom kinazy tymidynowej ulega zmianom w toku cyklu podziałowego w komórkach eukariotycznych różnego pochodzenia. Aktywność enzymu zwiększa się pod koniec okresu międzypodziałowego (interfazy) i osią-

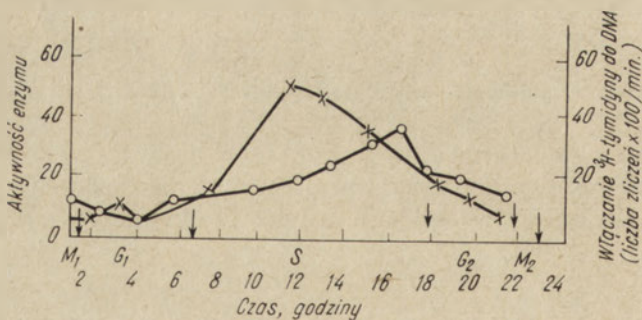
ga szczyt w fazie S, czyli w okresie syntezy DNA (23—39). Na rycinie 1 uwidoczniiono dla przykładu zmiany aktywności kinazy tymidynowej i natężenie syntezy DNA w poszczególnych fazach cyklu podziałowego komórek linii L (38).

Tabela 2

Aktywność kinazy tymidynowej w różnym materiale biologicznym (15, 69, 89)

Materiał badany	Aktywność kinazy tymidynowej (nmole dTMP/mg białka)	Odnosniki literaturowe
tkanki szczura:		
normalna wątroba	0,08	
wątroba regenerująca (24 godz. po operacji)	5,76	
nerka	0,10	
szpik kostny	13,70	
nowotwory:		
mięsak Yoshidy	37,00	
rak puchlinowy Ehrlicha	11,20	15
bakteria <i>Bacillus subtilis</i> :		
komórki wegetatywne	10,90	
zarodniki	0,10	89
jeżowiec <i>Paracentrotus lividus</i> :		
zygota	2,00	
zarodek 40-godzinny	30,00	69

Można przyjąć, że w fazie S kinaza tymidynowa ma najkorzystniejsze warunki działania (40). W tej fazie cyklu dTTP, silny inhibitor enzymu działający na zasadzie hamowania zwrotnego (41, 41a), ulega szybkiemu



Ryc. 1. Zmiany aktywności kinazy tymidynowej i intensywności włączania tyminy do DNA jądrowego w zsynchronizowanej hodowli komórek linii L (38).

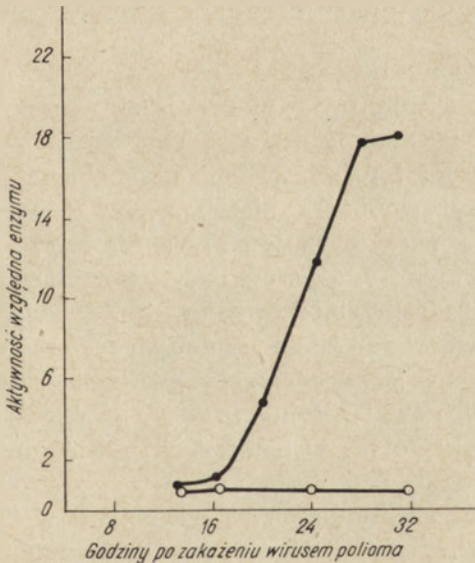
Aktywność cytosolowej kinazy tymidynowej wyrażono w pmolach dTMP w przeliczeniu na godzinę i jednostkę absorpcji mierzonej przy długości fali 280nm. M₁ i M₂ — kolejne podziały mitotyczne; G₁, G₂, S — fazy okresu międzypodziałowego. Strzałkami zaznaczono początek i koniec faz; —○— — aktywność kinazy tymidynowej, —x— — włączanie znakowanej tymidyny do DNA.

zużyciu w syntezie DNA, a równocześnie zwiększa się ilość białka enzymatycznego i ulega stabilizacji informacyjny RNA kodujący kinazę tymidynową (10, 42).

Wielokrotnie obserwowano, że zarówno w obecności inhibitorów translacji (takich, jak puromycyna i cykloheksomid), jak też inhibitorów transkrypcji (aktynomycyna) aktywność kinazy tymidynowej obniża się i w ciągu cyklu komórkowego nie podlega charakterystycznym zmianom (25, 25, 28, 37, 38). Stabilność cząsteczek enzymu jest podobna we wszystkich fazach cyklu (4). Można stąd wnosić, że zmiany aktywności kinazy obserwowane w czasie cyklu podziałowego komórek nie wynikają ze zmian w strukturze cząsteczek tego enzymu. Fakty te mogą świadczyć, że kinaza tymidynowa jest syntetyzowana *de novo*, a szybkość syntezy enzymu w czasie cyklu podziałowego znajduje się pod kontrolą genomu komórki (por. rozdz. III i IV).

I-6. Komórki zakażone wirusami zawierającymi DNA

Znaczny wzrost aktywności kinazy tymidynowej obserwuje się w komórkach po zakażeniu ich wirusami zawierającymi DNA (3, 43—57). Wraz ze wzrostem aktywności tego enzymu następuje uaktywnienie polimerazy DNA (57). Zbieżność ta może świadczyć, iż kinaza tymidynowa jest wprężnięta w mechanizm(y) uruchamiania procesu replikacji kwasu dezoksyrybonukleinowego w zainfekowanych komórkach. Na rycinie 2 przedsta-



Ryc. 2. Wzrost aktywności kinazy tymidynowej w komórkach nerki myszy po zakażeniu wirusem polioma (46).

—○— aktywność kinazy tymidynowej w komórkach niezakażonych; —●— aktywność kinazy tymidynowej po infekcji komórek wirusem polioma.

wiono graficznie wzrost poziomu kinazy tymidynowej w komórkach myszy zakażonych wirusem polioma (46).

Aktywność kinazy tymidynowej badano w zmutowanych komórkach linii LM zakażonych wirusami zawierającymi DNA (44, 56). Mutacja, prowadząca do redukcji, względnie zaniku cytosolowej kinazy tymidynowej, ujawnia się w warunkach długotrwałej, 90 tygodniowej, hodowli komórek w obecności 5-bromodezoksyurydyny. Związek ten, podobnie jak tymidyna, może być substratem kinazy tymidynowej. Po ufosforylowaniu do nukleozydotrójfosforanu ulega on wbudowaniu przede wszystkim do DNA jądrowego; w wyniku inkorporacji tego analoga zmienia się struktura DNA i większość komórek ginie. Przy życiu pozostają jedynie te komórki, które w wyniku mutacji utraciły przeważającą część aktywności cytosolowej kinazy tymidynowej i stały się niezdolne do włączania 5-bromodezoksyurydyny do jądrowego DNA. Komórki te zachowują jednak mitochondrialną kinazę tymidynową (por. rozdz. II). Oznacza się je symbolem TK⁻. Po zakażeniu komórek linii LM(TK⁻) wirusami zawierającymi DNA aktywność kinazy tymidynowej w cytosolu wzrasta kilkakrotnie (44). W wyniku infekcji wirusowej może rozpocząć się wzmożona ekspresja genów kodujących kinazę w komórce, bądź też może nastąpić aktywacja odpowiednich genów wirusa. Tak na przykład wiadomo, iż komórki ludzkie zakażone adenowirusem wykazują liczne uszkodzenia w strukturze chromosomów, między innymi w chromosomie zawierającym geny kodujące kinazę tymidynową (por. rozdz. I-10.). W związku z tym wysunięto przypuszczenie, że wzrost aktywności enzymu po zakażeniu wirusowym jest rezultatem rozluźnienia struktury tego chromosomu przez atakujący wirus (47—49).

Po wnikięciu wirusa opryszczki (*Herpes simplex*) do komórek myszy LM (TK⁻) Cl 1D w cytosolu ujawnia swoją aktywność kinaza tymidynowa kodowana prawdopodobnie przez genom wirusa (50—53). Enzym powstający po infekcji ma inne właściwości niż kinaza obecna w komórkach niezakażonych. Enzym komórek niezakażonych jest mniej trwały termicznie (42, 45, 46), charakteryzuje się większą ruchliwością elektroforetyczną (51) i odmiennymi właściwościami immunologicznymi (50) niż kinaza obecna w komórkach zainfekowanych, która prawdopodobnie występuje w formie zagregowanej. Nie wyklucza się, że cząsteczki kinazy tymidynowej występujące w komórkach embrionalnych nerki człowieka i małpy ulegają agregacji po wnikięciu wirusa (51). Zagregowane formy kinazy tymidynowej wykryto też w komórkach nowotworowych (por. rozdz. IV.).

Wydaje się, że kinaza tymidynowa powstająca w komórkach zakażonych onkogennym wirusem SV 40 decyduje w pewnym stopniu o rozwoju nowotworu. Po naświetleniu zakażonych komórek promieniami nadfioletowymi stwierdzono obniżoną aktywność kinazy w tych komórkach i zauważono, że stają się one mniej złośliwe (54). Szersze omówienie zjawiska

wzmózonej aktywności kinazy tymidynowej w komórkach zakażonych wirusami DNA można znaleźć w licznych pracach doświadczalnych i przeglądowych (1, 3, 19, 56, 57).

I-7. Tkanki poddane działaniu hormonów

Wkrótce po wprowadzeniu bydłęcego hormonu wzrostowego do organizmu szczura pozbawionego uprzednio przysadki mózgowej stwierdzono znaczne podwyższenie aktywności kinazy tymidynowej w tkance tłuszczowej nadjądry. Efektu tego nie obserwowano, jeśli zwierzęciu wstrzyknięto jednocześnie hormon kortyzyonowy obniżający szybkość proliferacji komórek (58). Znaczny wzrost aktywności kinazy tymidynowej i syntezy DNA obserwowano w gruczole nadnerczy świnki morskiej po wstrzyknięciu zwierzętom hormonu adrenokortykotropowego. Enzym pojawiający się pod wpływem hormonu okazał się bardziej labilny niż kinaza tymidynowa obecna w analogicznych komórkach zwierząt kontrolnych (59, 60).

I-8. Komórki hodowane w pożywkach wzbogaconych

Ponad 100-krotny wzrost aktywności kinazy tymidynowej obserwowano w komórkach embrionów myszy przeniesionych z pożywki uboższej żywieniowo do pożywki wzbogaconej. Komórki te, hodowane w pożywce zawierającej 0,5% surowicy krwi, przestają być zdolne do syntezy DNA i charakteryzują się niską aktywnością kinazy tymidynowej; po dodaniu do pożywki 10% surowicy ten stan spoczynku metabolicznego komórek zostaje przerwany, czego wyrazem jest między innymi wzrost poziomu kinazy tymidynowej (61).

I-9. Limfocyty pobudzone substancjami mitogennymi

Wzrost aktywności kinazy tymidynowej i natężenia syntezy DNA obserwowano w limfocytach ludzkich, na które podziałano fitohemoaglutyniną (62) i w limfocytach wyizolowanych ze śledziony myszy potraktowanych konkanawaliną A (42). Obie wymienione substancje pobudzają aktywność mitotyczną komórek.

I-10. Hybrydy komórkowe

Dzięki badaniom aktywności kinazy tymidynowej w hybrydach komórkowych udało się po raz pierwszy zlokalizować geny o znanej funkcji w określonym chromosomie ludzkim i poznać zjawisko przemieszczania się (translokacji) odcinków chromosomu ludzkiego zawierającego geny kodujące kinazę do chromosomu myszy. Do badań użyto hybrydy powstała

przez zespolenie somatycznych komórek ludzkich zawierających cytosolową kinazę tymidynową i komórek myszy zmutowanych bromodezoksyurydyną, pozbawionych tego enzymu (por. wyżej). Stwierdzono, że hybrydy zawierające cytosolową kinazę tymidynową wykazują obecność ludzkiego chromosomu nr 17, względnie dłuższego ramienia tego chromosomu; przeciwnie, hybrydy komórkowe wykazujące delecję chromosomu nr 17 nie zawierają jednocześnie kinazy tymidynowej (47—49, 63—65).

Na uwagę zasługują badania Kita i wsp. (66) dotyczące aktywności kinazy tymidynowej w tzw. heterokarionach; są to dwujądrazte hybrydy utworzone z komórek LM(TK⁻) myszy i erytrocytów kurczęcia. Mimo że oba rodzaje komórek nie zawierają cytosolowej kinazy tymidynowej, jądra powstałych heterokarionów stają się zdolne do włączania znakowanej tymidyny do DNA. Obserwacja ta świadczy, że po fuzji komórek, w heterokarionach pojawia się cytosolowa kinaza tymidynowa; stwierdzono, że jest to enzym kurczęcia (por. rozdz. III.).

I-11. Komórki rozwijających się organizmów zwierzęcych

Poziom kinazy tymidynowej zmienia się znacznie w komórkach jeźowców, płazów i owadów w zależności od stadium rozwojowego. W niezaplodnionych komórkach jajowych jeźowca (*Hemicentrotus pulcherrimus*) (67) i ropuchy zwyczajnej (*Bufo bufo*) (68) stwierdzono wysoką aktywność enzymu. Bezpośrednio po zapłodnieniu, w zygotach, aktywność ta ulega obniżeniu (67, 68). W okresie bruzdkowania aktywność kinazy zmienia się cyklicznie podczas kolejnych podziałów komórkowych. W zarodkach jeźowca *Paracentrotus lividus* aktywność kinazy znacznie wzrasta w stadium blastuli (Tabela 2). Wydaje się, że właśnie wówczas ważną rolę zaczyna odgrywać „szlak odzyskiwania” tymidyny (69, 69a) i że dostępność dTMP jest czynnikiem regulującym natężenie syntezy DNA w zarodku (70). Zwrócono uwagę na ścisłą zbieżność między wysoką aktywnością kinazy tymidynowej i dużą intensywnością podziałów komórkowych w zarodkach ropuchy w stadium blastuli. Po rozpoczęciu się gastrulacji i w stadium neuruli, gdy aktywność podziałowa komórek ulega obniżeniu, jednocześnie następuje spadek aktywności enzymu (68).

Ścisłą zależność między zmianami aktywności kinazy tymidynowej i natężenia syntezy DNA obserwowano również w rozwoju osobniczym owadów. Stwierdzono, że w komórkach nabłonka diapauzujących larw jedwabnika dębowego (*Antheraea pernyi*), charakteryzujących się stanem spoczynku metabolicznego, aktywność kinazy tymidynowej jest niewielka. Wkrótce po zakończeniu diapauzy, gdy przy udziale ekdysonu rozpoczyna się synteza DNA, zaobserwowano 20-krotny wzrost aktywności kinazy tymidynowej (71). Podobną zależność stwierdzono w komórkach rosnących gruczołów przednych jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*) w koń-

cowym stadium rozwojowym (72). Osiągnąwszy dojrzałość fizjologiczną, komórki tego gruczołu stają się zdolne do syntezy białek jedwabiu; nie syntetyzują wówczas DNA, a aktywność kinazy tymidynowej w tych komórkach zanika (73).

W przeciwieństwie do zacytowanych obserwacji (podrozdziały I-1.— I-11.) dotyczących dodatniej zależności między natężeniem syntezy DNA i poziomem kinazy tymidynowej, w rozwijającym się zarodku kurczenia aktywność tego enzymu jest względnie stała i niska, mimo dużego natężenia podziałów komórkowych i replikacji DNA. Wydaje się, iż w tym przypadku „droga odzyskiwania” tymidyny nie odgrywa poważniejszej roli, a ważnego znaczenia nabiera proces syntezy de novo dTMP. Sugerowano, że w czasie rozwoju zarodku kurczenia syntezę DNA reguluje reakcja ufosforylowania dTDP przy udziale kinazy tymidylanowej (74).

I-12. Komórki kiełkujących roślin wyższych

W dojrzałych, nie poddanych uprzednio napęcznieniu nasionach pszenicy, kukurydzy (75—77), orzeszka ziemnego (78) i w zarodkach żyta (79) nie stwierdza się obecności aktywnej kinazy tymidynowej. Aktywność enzymu pojawia się w roślinach dopiero po rozpoczęciu kiełkowania. W liściach żyta aktywność kinazy tymidynowej wykryto nie tylko w cytosolu, lecz również w plastydach i mitochondriach (79, 80). Pojawianie się aktywności kinazy w tych organellach zachodzi równolegle z inicjacją procesu włączania znakowanej tymidyny do DNA pozajądrowego (81, 82).

W kiełkach pszenicy i kukurydzy aktywna cząsteczka kinazy tymidynowej składa się z dwóch podjednostek: P i T. Obie podjednostki charakteryzują się podobnymi masami cząsteczkowymi (około 60 000), lecz wykazują zarazem odmienną ruchliwość elektroforetyczną i wytrącają się przy różnych stężeniach siarczanu amonu. Podjednostka T jest bardziej stabilna niż podjednostka P; ta ostatnia występuje w roślinie już we wczesnym okresie kiełkowania, jednakże pozostaje nieaktywna aż do momentu zespolenia się z podjednostką T. W komórkach korzenia kukurydzy aktywna forma enzymu pojawia się po 36 godzinach kiełkowania (76, 77).

W późniejszych badaniach sugerowano, że obie podjednostki są odmiennymi enzymami: nieswoistą nukleozydofosfotransferazą i ATP-azą (83, 84). Sugestie te zostały następnie poddane krytyce (por. rozdz. IV.).

I-13. Komórki glonów

Kinazę tymidynową wykryto w komórkach glonu *Chlorella* (28, 29), *Chlamydomonas* (patrz rozdz. IV.) i ostatnio — w plesze glonu wapiennego (*Acetabularia*). W tym ostatnim przypadku zaobserwowano, że kinaza tymidynowa, występująca głównie w chloroplastach i mitochon-

driach, zmienia swoją aktywność w czasie różnicowania plechy osiągając najwyższy poziom w okresie wykształcania się „organoidu” generatywnego, a mianowicie kapelusza (85, 86).

I-14. Komórki bakteryjne

Istnieją liczne dane dotyczące bakteryjnych kinaz tymidynowych. W pracowni Kornberga stwierdzono, że w komórkach pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) pozostających w wykładniczej fazie wzrostu, aktywność właściwa kinazy jest półtorakrotnie wyższa w porównaniu z aktywnością enzymu wykrywaną w komórkach znajdujących się w fazie stacjonarnej (87). Kinazę tymidynową *E. coli* oczyszczono w znacznym stopniu (około 1200 razy) i zbadano niektóre jej właściwości. Tak na przykład stwierdzono, że substratem tej kinazy, prócz tymidyny, mogą być również pochodne dezoksyurydyny zawierające atom chlorowca (bromu, jodu, fluoru i chloru) dołączonego do 5 atomu węgla. Okazało się ponadto, że dawcą grupy fosforanowej w reakcji ufosforylowania tymidyny może być nie tylko ATP, lecz również dGTP. Silnym inhibitorem kinazy tymidynowej jest dTTP (87), który wpływa na zmianę konformacji cząsteczek enzymu bakteryjnego (88, 88a).

Badano również kinazę tymidynową w komórkach *Bacillus subtilis*. Zaobserwowano, iż wkrótce po rozpoczęciu kiełkowania zarodników bakteryjnych, aktywność kinazy wzrasta ponad stukrotnie (Tabela 2), a wzrost ten rozpoczyna się jednocześnie z inicjacją syntezy DNA (89).

Wśród bakteryjnych kinaz tymidynowych na specjalną uwagę zasługuje enzym komórek *Bacillus stearothermophilus*. Kinaza tymidynowa tych bakterii charakteryzuje się dużą odpornością cieplną: nie zmienia aktywności po 60 minutowej inkubacji w temperaturze 75°C przy pH 7,6. Cecha ta odróżnia ten enzym od innych kinaz tymidynowych. Kinaza *B. stearothermophilus* składa się z kilku podjednostek polipeptydowych (por. Tabela 7) połączonych mostkami dwusiarczkowymi (90).

W komórkach bakteryjnych (87, 89), podobnie jak w większości organizmów eukariotycznych, poziom aktywności kinazy tymidynowej jest ściśle związany z aktywnością replikacyjną i podziałową. W tabeli 3 zestawiono wszystkie dotychczas poznane procesy biologiczne, w toku których uwidacznia się ta zależność.

II. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie kinazy tymidynowej

W komórkach eukariotycznych przeważająca część aktywności kinazy tymidynowej występuje zwykle w supernatancie pozostającym po odwirowaniu rybosomów cytoplazmatycznych, czyli w cytosolu. Z tego względu większość badań dotyczyła cytosolowych kinaz tymidynowych.

Jednakże, jak już wspomniano (rozdz. I-6; I-12.), obecnie znane są również kinazy pozacytosolowe.

Badania nad rozmieszczeniem kinazy tymidynowej w poszczególnych strukturach podkomórkowych rozpoczęto w roku 1968. Stwierdzono wówczas, że w regenerującej wątrobie szczura (por. rozdz. I-6.), prócz enzymu cytosolowego, kinaza tymidynowa występuje również we frakcji jądrowej, mitochondrialnej, a także w lisosomach i mikrosomach. Zauważono, że w okresie między 16 i 46 godziną po dokonaniu częściowej hepatektomii względna aktywność enzymu w poszczególnych frakcjach podkomórkowych ulega wyraźnym zmianom. Po 16 godzinach od operacji enzym cytosolowy stanowi około 40% ogólnej aktywności kinazy w komórce, enzym jądrowy — około 20%, a kinaza mitochondrialna — około 15%; natomiast po 46 godzinach cytosolowa kinaza tymidynowa stanowi 70% aktywności ogólnej, enzym jądrowy — 10%, a enzym mitochondrialny — zaledwie 1% (11).

Podobne zmiany w aktywności kinazy tymidynowej zaobserwowano także w komórkach gruczołu nadnerczy świnki morskiej poddanej dzia-

Tabela 3

Wzrost aktywności kinazy tymidynowej w powiązaniu ze wzmożoną syntezą DNA

Proces biologiczny	Odnosińki literaturowe
Regeneracja wątroby szczura	1, 7—14, 102, 108, 128;*)
Przerost wyrównawczy nerki szczura	20, 21;
Faza S w cyklu komórkowym	23—40
Zakażenie komórek wirusami DNA	3, 43—48, 50—57, 115, 116;
Pobudzenie metabolizmu komórek myszy przez zmianę pożywki	61;
Pobudzenie hormonalne komórek <i>in vivo</i> :	
hormonem wzrostowym przysadki	58;
hormonem adrenokortykotropowym	60,
Pobudzenie limfocytów mitogenami:	
fitohemoaglutyniną	62;
konkanawaliną A	42;
Powstawanie hybrydów komórkowych	66,94 a-e;
Rozwój larw owadzi	71—73;
Rozwój zarodków jeźowców	67, 69;
Rozwój oocytów ropuchy, wykształcanie komórek jajowych	124;
Rozwój zarodków ropuchy zwyczajnej	68;
Embriogeneza narządów	17, 114—116, 127;
Procesy nowotworowe	15, 18, 20, 54, 114;
Morfogeneza plechy glonu <i>Acetabularia</i>	85, 86;
Kielkowanie zygoty glonu <i>Chlamydomonas</i>	122;
Kielkowanie nasion i zarodków roślin wyższych	75—80;
Namnażanie komórek bakteryjnych	87, 88;
Kielkowanie zarodników bakteryjnych	89;

*) pierwsze doniesienie o rytmie dobowym aktywności kinazy tymidynowej i natężenia syntezy DNA w regenerującej wątrobie szczura.

łaniu hormonu adrenokortykotropowego (por. rozdz. I-7.). Podczas gdy w komórkach nadnerczy zwierząt kontrolnych nie traktowanych hormonem, 80% całkowitej aktywności enzymu wykryto w mitochondriach, to w komórkach nadnerczy zwierząt poddanych działaniu hormonu około 70% aktywności kinazy stwierdzono w cytosolu. Uzyskane wyniki tłumaczono zmianami zachodzącymi pod wpływem hormonu w błonach mitochondrialnych. Kinaza tymidynowa występuje w mitochondriach w formie zespolonej z błonami tej organelli; świadczy o tym zjawisko uwalniania się enzymu pod wpływem detergentu Triton X-100 (60). Działanie hormonu adrenokortykotropowego doprowadza do uwalniania się cząsteczek enzymu z błon mitochondrialnych; jednocześnie może zwiększać się przepuszczalność tych błon, dzięki czemu kinaza mitochondrialna ma możliwość przenikania do cytosolu.

Badania porównawcze kinazy tymidynowej wykrytej w mitochondriach i w cytosolu komórek wątroby myszy wykazały, że oba enzymy są odmiennymi białkami. Charakteryzują się one odmienną stabilnością cieplną i różnymi wartościami stałej Michaelisa K_m tymidyny. Kinaza mitochondrialna okazała się bardziej odporna na hamujący wpływ puromycyny niż enzym cytosolowy. Zauważono jednocześnie, że jeżeli myszy poddaje się głodzeniu przez 16 godzin, to aktywność kinazy cytosolowej zanika, natomiast aktywność enzymu mitochondrialnego pozostaje bez zmian. W przeciwieństwie do kinazy cytosolowej, enzym mitochondrialny wykazuje jednakową aktywność w ciągu całego cyklu podziałowego komórek (por. rozdz. I-5.). Może to być wskazówką, że istnieją niezależne mechanizmy regulacji aktywności każdej z kinaz tymidynowych obecnych w komórkach wątroby myszy (91).

Jak już podkreślono w rozdziale I-6., komórki myszy LM(TK⁻) zmutowane pod wpływem bromodezoksyurydyny charakteryzują się brakiem cytosolowej kinazy tymidynowej. Blisko 100% aktywności enzymu tych komórek wykrywa się w mitochondriach (92, 93). Natomiast w niezmutowanych komórkach LA 9, w mitochondriach wykryto zaledwie 1% aktywności całkowitej tego enzymu, w jądrach — 3%, a w cytosolu — 96% (92).

Szczegółowe badania porównawcze nad właściwościami kinazy mitochondrialnej i cytosolowej w różnych komórkach i w hybrydach komórkowych (por. rozdz. I-10.) przeprowadzili Kit i wsp. (94a, b, c, d, e). W komórkach HeLa linii Bu 25 zmutowanych pod wpływem bromodezoksyurydyny, mitochondrialna kinaza tymidynowa stanowi 95% aktywności całkowitej. Kinaza ta wykazuje mniejszą swoistość względem źródła grup fosforanowych niż enzym cytosolowy; przyjmując za 100% aktywność przejawianą w obecności ATP, przy użyciu UTP jako dawcy grup fosforanowych kinaza mitochondrialna zachowuje 80% aktywności, a enzym cytosolowy — zaledwie 4% (94 a). W komórkach tych aktywność właściwa mitochondrialnej kinazy jest 25-krotnie wyższa od aktyw-

ności właściwej enzymu cytosolowego. Przeciwnie, w komórkach HeLa linii S 3, z której wywodzą się komórki Bu 25, aktywność właściwa enzymu cytosolowego jest 7-krotnie wyższa niż aktywność enzymu mitochondrialnego. Masa cząsteczkowa kinazy mitochondrialnej w obu typach komórek jest zbliżona (70 000—74 000), a zarazem różna od masy cząsteczkowej enzymu cytosolowego komórek S 3 (wynoszącej 86 000). Wyizolowana z tych komórek mitochondrialna kinaza tymidynowa rozdziela się elektroforetycznie na 3 frakcje białkowe (94 a). Odmiennymi właściwościami cechują się również cytosolowa kinaza komórek macierzystych mKS—A i mitochondrialna kinaza zmutowanych bromodezoksyurydyną komórek mKS (Bu 100) nerki myszy (94 b). Mitochondrialne kinazy tymidynowe wykryte w embrionalnych komórkach płuca ludzkiego (transformowanych wirusem SV 40) linii WI 38 Va13A, w komórkach nerki zielonej małpy afrykańskiej CV-1 oraz w komórkach myszy różnią się od kinaz cytosolowych względną ruchliwością elektroforetyczną. Analiza elektroforetyczna kinaz tymidynowych wydzielonych z hybrydów komórkowych powstałych z somatycznych komórek człowieka i myszy oraz z somatycznych komórek małpy i myszy wykazała, że mitochondria tych hybrydów zawierają swoistą kinazę mitochondrialną myszy, lecz nie zawierają specyficznych enzymów mitochondrialnych komórek małpy względnie komórek ludzkich. Jednocześnie w hybrydach komórek ludzkich i komórek myszy wykryto kinazę, która swoją ruchliwością elektroforetyczną przypomina cytosolową kinazę ludzką, a w hybrydach komórek małpy i myszy obserwowano enzym podobny do kinazy cytosolowej małpy (94 c).

W pracowni Kita (94 d) badano niedawno fizykochemiczne właściwości kinaz tymidynowych wykrytych w hybrydach uzyskanych z komórek zarodków kurczęcia (zawierających cytosolową kinazę tymidynową określoną mianem enzymu F i mitochondrialną kinazę oznaczoną jako kinaza A) i komórek myszy LM(TK⁻) zawierających jedynie kinazę mitochondrialną. Stwierdzono, że w hybrydach tych występuje jedynie kinaza F kurczęcia (94 d). Przytoczone wyniki (94 b — 94 d) mogą świadczyć, że kinaza cytosolowa i kinaza mitochondrialna są kodowane przez inne zespoły genów i że w hybrydach komórkowych ekspresji ulegają tylko niektóre z tych genów.

Kinazy tymidynowe występujące w mitochondriach komórek ssaków wykazują istotne różnice aktywności właściwej (95). Dane porównawcze na ten temat zestawiono w tabeli 4. Kinazy mitochondrialne biorą prawdopodobnie udział w syntezie dTMP niezbędnego w replikacji DNA mitochondrialnego, kinazy cytosolowe natomiast są wprzęgnięte w syntezę DNA jądrowego. Świadczą o tym na przykład obserwacje, że w zmutowanych komórkach zawierających jedynie kinazę mitochondrialną zachodzi uprzywilejowane włączanie znakowanej tymidyny do DNA mitochondrialnego (92, 93, 96—99).

Rozmieszczenie kinazy tymidynowej w komórkach roślinnych jest, jak dotychczas, mało poznane. Wiadomo, że w komórkach glonu *Acetabularia* około 80% ogólnej aktywności enzymu występuje we frakcji podkomórkowej obejmującej chloroplasty i mitochondria (85). Enzym ten powstaje przy udziale organellowych rybosomów o stałej sedimentacji 70S (86).

Tabela 4

Aktywność kinazy tymidynowej w mitochondriach niektórych komórek (95)

Komórki	Aktywność enzymu (pmole dTMP/mg białka)
LA 9	300
LM(TK ⁻)	160
LD	120
LD(TK ⁻)	80
KB	1400
3 T3(TK ⁻)	320
SV 3 TS	950
wątroba myszy	90

(TK⁻) oznacza brak, lub znaczną redukcję cytosolowej kinazy tymidynowej w danych komórkach (por. rozdz. I.6.).

Mitochondria drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) nie są zdolne do włączania znakowanej tymidyny do DNA *in vitro* i nie zawierają kinazy tymidynowej, jednakże mogą one włączać dTDP i dTTP (100). Szerszą dyskusję na temat wykorzystywania prekursorów tyminowych w procesie replikacji DNA i jego naprawy można znaleźć między innymi w artykule HARRISA (101).

Dotychczas nie wiadomo, czy cytosolowa kinaza tymidynowa i enzym wykryty we frakcji jądrowej w niektórych komórkach są odmiennymi białkami. Sugerowano, iż wiązanie się cytosolowej kinazy tymidynowej z błoną jądrową jest wyrazem działania mechanizmu regulującego aktywność enzymu (35, 91). Tak na przykład stwierdzono, że w fibroblastach myszy (linia komórek L 929) przeważająca część aktywności enzymu występuje we frakcji jądrowej; w fazie S cyklu komórkowego, w jądrach wykryto aż 90% całkowitej aktywności kinazy obecnej w fibroblastach (40). Dane na temat rozmieszczenia aktywności kinazy tymidynowej w różnych komórkach zestawiono w tabeli 5.

Na oddzielną uwagę zasługują dane dotyczące kompleksów wieloenzymatycznych zawierających, między innymi, kinazę tymidynową cytosolu komórek aktywnych mitotycznie (regenerującej wątroby szczura). W kompleksach tych, prócz kinazy tymidynowej, wykryto inne enzymy wprężnięte w anabolizm DNA, takie jak: polimeraza II DNA, reduktaza rybo-

nukleozydodwufosforanów i dezaminaza dCMP (por. rozdz. IV. i Schemat 1). Wymienione enzymy są zespolone z błonami gładkimi i dają się odwirować z supernatantu porybosomowego (przy 78 000 g w ciągu 15—20 godzin) w postaci cząstek o średnicy 85—120 Å. Kompleksy te są tak trwałe, że nie ulegają rozpadowi ani pod wpływem soli, ani też w obecności detergentów uszkadzających strukturę błon. Mogą to być kompleksy replikacyjne biorące udział w syntezie DNA, porównywalne z kompleksami translacyjnymi — rybosomami (1, 102, 104).

Tabela 5

Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie aktywności kinazy tymidynowej

Komórki badane	% aktywności enzymu w całej komórce			Oдноśniki literaturowe
	jądro	mitochondria	cytosol	
LA 9	3	1	96	92
L 929*)	ok. 85		12	40
LM(TK ⁻)	—	ok. 100	—	92,97
LM(TK ⁻) Cl 1D	—	ok. 100	—	93
HeLa S 3	—	3	97	94 a
HeLa Bu 25	—	ok. 95	4	94 a, c
WI 38	3	3	94	94
Limfocyty ludzkie**)	10	—	ok. 90	62
Regenerująca wątroba szczura:				
po 16 godz.	20	16	42	
po 24 godz.	7	0,5	60	
po 46 godz.	12	1,2	70	11
Wątroba myszy C-3 H	—	50	50	92
Nadnercze świnki morskiej:				
po ACTH***)	—	30	70	
kontrolne	—	80	20	60
Wątroba płodu ludzkiego	0,1	6	92	114
Plecha glonu <i>Acetabularia</i>		ok. 80 ⁺)		86

*) w fazie S cyklu komórkowego; ** 24—60 godz. po pobudzeniu hemaglutyniną;

***) hormon adrenokortykotropowy wstrzykiwano zwierzęciu 2 dni przed wycięciem gruczołu nadnerczy; ⁺) łącznie z chloroplastami.

Nie wiadomo, czy w określonych stanach metabolicznych komórki, na przykład przed rozpoczęciem syntezy DNA jądrowego w fazie S, wieloenzymatyczne kompleksy replikacyjne wnikają do jądra komórkowego. Stwierdzono jednak, że polimeraza II DNA, będąca składnikiem kompleksów replikacyjnych, występuje wówczas w jądrze (1). Cytosolowa kinaza tymidynowa, wykrywana również w tych kompleksach, być może oddziaływać zarówno w jądrze, jak i w cytosolu.

III. Regulacja aktywności kinazy tymidynowej

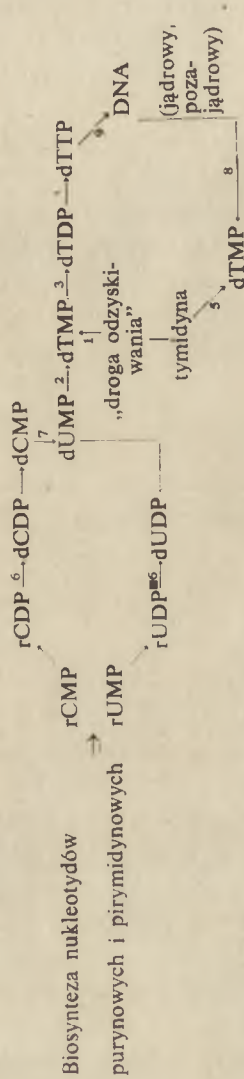
Jak wynika z danych przytoczonych w rozdziale I, aktywność kinazy tymidynowej w różnych komórkach wzrasta w okresie wzmożonej syntezy DNA i nasilonych podziałów komórkowych (Tabela 3). Jednakże znane są również przypadki, w których aktywność enzymu zwiększa się wraz z obniżeniem szybkości podziałów komórkowych i zmniejszeniem natężenia replikacji DNA. Zjawisko to daje się wywołać sztucznie w obecności ametoptyeryny lub hydroksymocznika.

Ametoptyeryna jest aminoanalogiem kwasu foliowego (kwas 4-amino-N¹⁰-metylopteroilglutaminowy) i blokuje aktywność reduktazy dwuhydrofolianowej (oksyreduktaza tetrahydrofolian: NADP, E.C. 1.5.1.3.). Reduktaza ta umożliwia powstanie tetrahydrofolianu, ważnego intermediatu w syntezie de novo dTMP z dezoksyurydynomonofosforanu (por. rozdz. IV.). W obecności ametoptyeryny następuje w komórce zablokowanie głównej drogi syntezy dTMP i nabiera znaczenia „szlak odzyskiwania” tymidyny; aktywność kinazy tymidynowej wydatnie wzrasta, dzięki czemu ograniczona przez ametoptyerynę pula dTMP zwiększa się i w konsekwencji może ulec wznowieniu synteza DNA (105, 106). Można stąd wnosić, iż poziom kinazy tymidynowej w komórce jest w pewnym stopniu regulowany poprzez zmiany stężenia prekursorów tyminowych. Zwiększoną aktywność kinazy tymidynowej pod wpływem ametoptyeryny zaobserwowano w komórkach HeLa (107), w fibroblastach chomika (39) oraz w komórkach Changa (105).

Hydroksymocznik jest silnym inhibitorem syntezy DNA. Działanie tego związku polega najprawdopodobniej na blokowaniu aktywności rybonukleozydodwufosforeduktaz regulujących wielkość puli dezoksyrybonukleozydów w komórce (por. rozdz. IV.). W obecności hydroksymocznika, podobnie jak pod wpływem ametoptyeryny, nabiera znaczenia „szlak odzyskiwania” tymidyny. Zjawisko takie obserwowano w komórkach Changa (106), komórkach KB (4), w komórce śluzowca *Physarum polycephalum* (27) i w tkankach gorczycy białej (32).

Niedawno stwierdzono, że przerwanie syntezy kinazy tymidynowej w komórkach KB wkraczających w fazę podziałową jest spowodowane przez zablokowanie aktywności mRNA kodującego to białko enzymatyczne. Blok potranskrypcyjny jest wywołany prawdopodobnie przez cząsteczki represora białkowego; zauważono bowiem, że ustanie syntezy enzymu poprzedzone jest syntezą RNA, który, być może, jest informacyjnym kwasem rybonukleinowym odpowiedzialnym za syntezę represora (4).

Pewne światło na mechanizmy regulujące aktywność kinazy tymidynowej rzucają badania nad trwałością mRNA kodującego ten enzym. Półokres rozpadu ($t_{1/2}$) mRNA cytosolowej kinazy tymidynowej jest różny w różnych komórkach. Tak na przykład $t_{1/2}$ kinazy mRNA w komór-



Schemat 1. Współdziałanie kinazy tymidynowej z innymi enzymami w metabolizmie prekursorów DNA i jego syntezie

Objaśnienia:

1. kinaza tymidynowa;
2. syntetaza tymidylowa;
3. kinaza tymidylowa;
4. kinaza dTDP, dTTP;
5. nukleotydaza dTMP;
6. rybonukleozydodwufosforeduktazy;
7. dezaminaza dCMP;
8. dezoksyrybonukleaza;
9. polimeraza DNA;

Schemat (opracowany) na podstawie danych literaturowych (1, 2, 17, 67, 74, 87, 111 i in.)

kach regenerującej wątroby szczura wynosi 7,5 godziny, a w komórkach wątroby normalnej — tylko 3 godziny (10, 108). Częsteczki mRNA kodującego cytosolową kinazę w limfocytach śledziony myszy ulegają stabilizacji po pobudzeniu metabolicznym tych komórek konkanawaliną A (42). Wydaje się, iż w komórkach aktywnych mitotycznie stabilizacja mRNA kodującego kinazę tymidynową zachodzi przy udziale substancji unieczyniającej katabolizm cząsteczek tego RNA (10, 12). Dzięki temu w szybko dzielących się komórkach utrzymuje się wyższy poziom kinazy niż w komórkach słabo aktywnych mitotycznie. Pewną rolę może tu odgrywać również większa stabilność cząsteczek enzymu w komórkach szybko dzielących się. Okazało się bowiem, że półokres rozpadu kinazy tymidynowej w normalnej wątrobie szczura wynosi 2,6 godziny, a w wątrobie regenerującej — 3,7 godziny (108). Przytoczone wartości wskazują, że trwałość cząsteczek enzymu oraz cząsteczek mRNA kodującego kinazę tymidynową jest stosunkowo niewielka i oba typy makrocząsteczek nie mogą przetrwać dłużej niż przez okres jednego cyklu komórkowego (10, 11). Zapewne więc najistotniejszym mechanizmem regulującym aktywność kinazy tymidynowej w różnych stanach metabolicznych komórek jest kontrola genetyczna. Temat ten zostanie omówiony w rozdziale IV.

IV. Uwagi końcowe

Kinaza tymidynowa współdziała w komórce z innymi enzymami wrzęgniętymi w proces syntezy prekursorów DNA i replikacji polimeru. Wymienimy tu kinazę tymidylanową (fosfotransferaza ATP:tymidynofosforan, E.C. 2.7.4.9) syntetyzującą dTDP oraz kinazę, która katalizuje syntezę dTTP (brak oddzielnej pozycji katalogowej). W komórkach wkraczających w fazę szybkich podziałów mitotycznych obserwowano kolejne pojawianie enzymów: najwcześniej ujawnia się aktywność kinazy tymidynowej, nieco później — kinazy tymidylianowej i wreszcie — aktywność kinazy dTDP (109—111).

Niewyjaśniona jest rola biologiczna nieswoistej nukleozydofosfotransferazy (E.C. 2.7.1.76), która katalizuje reakcję ufosforylowania tymidyny do dTMP; dawcą grupy fosforanowej w reakcji katalizowanej przez nukleozydofosfotransferazę niespecyficzną może być AMP (83, 84). Ostatnio stwierdzono, że nukleozydofosfotransferaza niespecyficzna występująca w cytosolu komórek kurczenia może wykorzystywać jako donory grup fosforanowych takie związki, jak UMP, dCMP, dGMP i dCDP (94 d). Nie wiadomo, czy dCDP musi być uprzednio przekształcony przez odpowiednią fosfatazę do nukleozydomonofosforanu (94 d); uprzednio sugerowano, że nieswoista nukleozydofosfotransferaza komórek roślinnych wymaga współdziałania z ATP-azą (83, 84). Wysłunięto pogląd, iż w komórkach

roślin wyższych występuje nukleozydofosfotransferaza, która zastępuje działanie kinazy tymidynowej (83, 84); niedawno wykazano jednak, że większość dotychczas badanych roślin wyższych zawiera kinazę tymidynową, a jedynie bulwy ziemniaka wykazują obecność nieswoistej nukleozydofosfotransferazy, jako głównego enzymu katalizującego reakcję ufosforylowania tymidyny (112).

Nukleotydaza hydrolizująca dTMP (E.C. 3.1.3.35) działa antagonistycznie w stosunku do kinazy tymidynowej. Zaobserwowano, że w regenerującej wątrobie szczura aktywność tej nukleotydazy wzrasta równoległe ze wzrostem poziomu kinazy tymidynowej (15); równoczesne działanie obu enzymów reguluje, być może, pulę dTMP w komórce (11, 15).

Ważne znaczenie w metabolizmie prekursorów DNA ma współdziałanie kinazy tymidynowej z innymi enzymami wprzęgniętymi w syntezę dTMP. Należy tu wymienić tzw. syntetazę tymidylanową (por. Wstęp) przekształcającą dUMP w dTMP (2), reduktazę dihydrofoliową (por. rozdz. III.), dezaminazę dCMP (aminohydrolaza: dCMP, E.C. 3.5.4.12) syntetyzującą dUMP oraz rybonukleozydodwufosforeduktazy (por. Schemat 1). Wielokrotnie obserwowano, iż wzrostowi aktywności kinazy tymidynowej w komórkach towarzyszy zwiększenie poziomu niektórych spośród wymienionych tu enzymów, jak też polimerazy DNA (1, 4, 15, 29, 46, 67, 102, 109). Niektóre z nich — jak wspomniano w rozdziale II. — występują we wspólnym kompleksie replikacyjnym (102—104).

W badaniach nad reduktazami rybonukleozydodwufosforanów w komórkach guza Novikoffa zwrócono uwagę, iż redukcja ADP i GDP do odpowiednich dezoksyrybukleozydów zależy od obecności w układzie odpowiednio dużej puli dTTP; związek ten wpływa więc regulująco na stężenie innych prekursorów DNA (113).

Stężenie komórkowe dTTP i dCTP wywiera wpływ na aktywność kinazy tymidynowej; dTTP jest silnym inhibitorem enzymu (40, 41, 87, 88, 114). W komórkach bakterii *E. coli* zarówno dTTP, jak też dCTP są efektorami regulującymi allosterycznie aktywność kinazy tymidynowej (88).

W komórkach wątroby płodu ludzkiego i wątroby dojrzałej (postnatalnej) występują odmienne formy kinazy tymidynowej, które różnią się wieloma właściwościami (Tabela 6). Wykazują one, między innymi, różną odporność na hamujący wpływ dCTP. Związek ten, w stężeniu 1mM, hamuje znacznie kinazę tymidynową z komórek wątroby dojrzałej, natomiast nie wywiera istotnego wpływu na aktywność kinazy występującej w wątrobie płodowej, a także z komórek nowotworowych; związek ten, w tym samym stężeniu, stymuluje zarazem aktywność dezaminazy dCMP — enzymu syntetyzującego dTMP *de novo* (por. Schemat 1). W komórkach szybko dzielących się przebiegają więc najprawdopodobniej obie drogi syntezy dTMP: „szlak odzyskiwania” tymidyny z udziałem kinazy tymidynowej i synteza dTMP *de novo*; zjawisko to obser-

wowano na przykład w komórkach płodowych (115, 116) i w leukocytach białaczkowych (117). Kinaza tymidynowa zbliżona właściwościami do enzymu występującego w komórkach wątroby płodowej pojawia się w fibroblastach po zakażeniu ich onkogennym wirusem SV 40 (115).

Tabela 6

Porównanie właściwości kinazy tymidynowej występującej w ludzkiej wątrobie płodowej i postnatalnej oraz w komórkach nowotworowych KB i HeLa (114)

Właściwości enzymu	Wątroba		Komórki	
	płodowa	postnatalna	KB	HeLa
Zdolność wykorzystywania źródła grupy PO_4''' (aktywność wyrażona w %)+)				
ATP	100	100		
CTP	10	70		
UTP	11	42		
GTP	19	39		
Wrażliwość na hamujący wpływ dCTP*) (aktywność wyrażona w %)				
próbę kontrolną, bez dCTP	100	100	100	100
próbę badaną, z 1 mM dCTP	95	33	96	75
Odporność cieplna (aktywność wyrażona w %)				
bez podgrzania preparatu	100	100		
po podgrzaniu przez 5 min., 45° (pH 8,0)	50	90		
Zakres optymalnego pH	7,0—7,2	7,0 i 8,5		
Homogenność elektroforetyczna**)	3 frakcje	1 frakcja	3 frakcje	
Względna ruchliwość elektroforetyczna frakcji (mm)	główna:10 szybka:22 wolna:0	22	10	23—26 0

Dane zaczerpnięte z pracy Taylor i wsp. (114).

+) stężenie końcowe poszczególnych nukleozydotrójfosforanów — 1 mM;

*) w próbie badanej i kontrolnej dawcą grupy fosforanowej był CTP w stężeniu końcowym 1 mM.

**) elektroforezę preparatów enzymatycznych prowadzono w 7% żelu poliakrylamidowym, pH 8,6; frakcja główna enzymu — ilościowo przeważająca w wątrobie płodowej i w komórkach nowotworowych charakteryzuje się średnią ruchliwością elektroforetyczną.

Tak więc w komórkach eukariotycznych można wyróżnić dwie odmienne formy kinazy tymidynowej. Jedna z form tego enzymu, jak można sądzić, jest charakterystyczna dla normalnych komórek płodowych, komórek nowotworowych i komórek zakażonych określonymi wirusami zawierającymi DNA. Forma druga kinazy tymidynowej jest charakterystyczna dla komórek zdrowych (tzn. nie nowotworowych) dojrzałych narządów (114—121). Obie formy różnią się masami cząsteczkowymi

i ruchliwością elektroforetyczną (Tabela 6 i 7) oraz odpornością cieplną. Tak na przykład forma zagregowana (o masie cząsteczkowej 600 000) kinazy z guza Walkera, powstająca w warunkach niskiej siły jonowej środowiska, jest mniej wrażliwa na hamujący wpływ dTTP i charakteryzuje się dwukrotnie niższą stałą Michaelisa tymidyny ($K_m = 3,3 \mu\text{M}$) niż forma monomeryczna (120). Różnica ta zapewne implikuje wydatniejszy przebieg syntezy dTMP przy udziale zagregowanej formy enzymu.

Tabela 7

Masy cząsteczkowe kinazy tymidynowej wyizolowanej z różnych komórek

Komórki	Frakcja enzymu	Masa cząsteczkowa	Oдноniki
HeLa S 3	cytosolowa	86 000	
	mitochondrialna	74 000	
HeLa Bu 25	mitochondrialna	70 000	94;
guz Walkera	cytosolowa	110 000 600 000*)	120, 121;
guz Novikoffa	cytosolowa	670 000	121;
regenerująca wątroba szczura	cytosolowa	700 000	12;
grasica cielęca	cytosolowa	55 000	119;
pałeczka okrężnicy (<i>E. coli</i>)		42 000 91 000+)	88;
<i>Bacillus</i> <i>stearothermo-</i> <i>philus</i>		28 000 52 000 108 000*)	90;

*) powstaje w środowisku o niskiej sile jonowej;

+*) dimeryzacja jako wyraz regulacji aktywności enzymu pod wpływem dezoksyrybonukleotydów aktywujących (dCTP) i hamujących (dTTP).

Jakkolwiek środowisko wewnętrzne może wpływać na powstawanie zagregowanych form kinazy tymidynowej, to jednak wykształcanie odpowiednich form cząsteczki enzymu znajduje się przede wszystkim pod kontrolą genetyczną. Geny kodujące formę enzymu obecną w komórkach płodowych mogą ulegać więc represji po zakończeniu okresu życia płodowego. Występowanie zaś podobnej formy enzymu w komórkach nowotworowych może świadczyć o derepresji tych genów (114—116).

Ostatnio wysunięto hipotezę, zgodnie z którą jest możliwa wybiórcza regulacja genów kodujących kinazę tymidynową w poszczególnych frakcjach podkomórkowych. Sugerowano mianowicie, że w komórkach glonu

Chlamydomonas reinhardtii pozostających w fazie wzrostu wegetatywnego jedynie kinaza tymidynowa chloroplastów wykazuje aktywność; zachodzi wówczas uprzywilejowane znakowanie tymidyną chloroplastowego DNA. W czasie kiełkowania zygoty glonu rozpoczyna się synteza DNA jądrowego i prawdopodobnie wówczas pojawia się cytosolowa kinaza tymidynowa (122).

Wydaje się, że cytosolowa kinaza tymidynowa i kinaza wykrywana we frakcji jądrowej niektórych komórek (por. Tabela 5) są białkami różniącymi się stopniem agregacji cząsteczek (42). Sugestia ta została wysunięta w związku z obserwacją, że cytoplazmatyczna polimeraza II DNA („duża”) i polimeraza DNA wykrywana w jądrze komórkowym są formami enzymu mogącymi przekształcać się jedna w drugą (123).

Cytosolowa kinaza tymidynowa pozostaje pod ścisłą kontrolą genetyczną. Ekspresja genów kodujących ten enzym ściśle zależy od stanu metabolicznego komórki i wzmacnia się w okresie intensywnej syntezy DNA jądrowego oraz zwiększonej aktywności podziałowej komórki (Tabela 3). Nie należy wykluczać możliwości, że regulacja pozacytosolowych kinaz tymidynowych, takich jak enzym chloroplastów i kinaza mitochondrialna, odbywa się we współzależności z podziałami tych organelli i replikacją zawartego w nich DNA. Liczni autorzy sugerowali, że cytosolowa kinaza tymidynowa jest wprzęgnięta w mechanizm regulujący szybkość syntezy DNA jądrowego (16, 42, 72, 124) i decydujący o rozpoczęciu podziałów komórkowych (125). Pozacytosolowe kinazy tymidynowe mogłyby więc spełniać podobną rolę w procesie organellogenezy.

Jak wynika z danych przedstawionych w tym artykule, kinaza tymidynowa może odgrywać rolę ważniejszą niż wynikałoby to z założenia o udziale tego enzymu jedynie w „szlaku odzyskiwania” tymidyny (17, 58, 78). Znaczenie tego szlaku, jak pamiętamy, staje się szczególnie ważne w stanach wzmożonej aktywności replikacyjnej i podziałowej komórek, tkanek oraz narządów (14, 67, 78, 105, 124, 126—128).

Artykuł nadszedł 17.2.1975; po rewizji autorskiej otrzymano 24.9.1975

PIŚMIENNICTWO

1. Kornberg A., (1974), DNA Synthesis, Ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
2. Friedkin M., (1973), *Adv. Enzymol.*, **38**, 235—292.
3. Green M., Piña M., Chagoya V., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 1188—1197.
4. Bello L. J., (1974), *Exp. Cell Res.*, **89**, 263—274.
5. Kornberg A., Lehman I. R., Simms E. S., (1956), *Fed. Proc.*, **15**, 291.
6. Kornberg A., Lehman I. R., Bessman M. J., Simms E. S., (1956), *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 197—198.
7. Bollum F. J., Potter V. R., (1959), *Canc. Res.*, **19**, 561—565.
8. Beltz R., (1962), *Arch. Biochem. Biophys.*, **99**, 304—312.

9. Bianchi P. A., Crathorn A. R., Shooter K. V., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 728—735.
10. Bresnick E., Williams S. S., Mossé H., (1967), *Canc. Res.*, **27**, 469—475.
11. Bagnat-Mahieu L., Gouthir R., Semal M., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 323—328.
12. Bresnick E., Mainigi K. D., Buccino R., Burleson S. S., (1970), *Canc. Res.*, **30**, 2502—2506.
13. Stirpe F., La Placa M., (1971), *Biochem. J.*, **122**, 347—351.
14. Machowich R., Greengard O., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **286**, 375—381.
15. Arima T., Shirasaka T., Okuda H., Fujii S., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **277**, 15—24.
16. Shiosaka T., Omura Y., Okuda H., Fujii S., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **204**, 352—358.
17. Klemperer H. G., Haynes G. R., (1968), *Biochem. J.*, **108**, 541—546.
18. Weber G., Lea M. A., (1966), *Adv. Enzym. Reg.*, **4**, 115—145.
19. Kit S., Leung W. C., Trkula D., (1974), w *Control Processes in Neoplasia*, Red. M. A. Mehlman i R. W. Hanson, Acad. Press Inc., Nowy Jork, str. 103—145; cyt. za (66).
20. Gordon H. L., Bardos T. J., Chmielewicz Z. F., Ambrus J. L., (1968), *Canc. Res.*, **28**, 2068—2077.
21. Mayfield E. D., jr., Liebelt R. A., Bresnick E., (1967), *Canc. Res.*, **27**, 1653—1657.
22. Main R. K., Cole L. J., Walwick E. R., (1963), *Internat. J. Rad. Biol.*, **7**, 45—51.
23. Sachsenmaier W., Ives D. H., (1965), *Biochem. Z.*, **343**, 399—406.
24. Sachsenmaier W., Fournier D. v., Gürtler K. F., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 655—660.
25. Wolf H., Finkenstedt G., Wörtz G., Sachsenmaier W., (1973), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **354**, 1260—1261.
26. Hildebrandt A., Sauer H. W., (1972), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 715—716.
27. Madreiter H., Linser W., Sachsenmaier W., (1973), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **354**, 1221—1221.
28. Johnson R. A., Schmidt R. R., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **129**, 140—144.
29. Shen R., Schmidt R. R., (1966), *Arch. Biochem. Biophys.*, **115**, 13—20.
30. Knoop B., (1974), *Planta*, **121**, 75—80.
31. Capesius I., (1973), *Z. Pflanzenphysiol.*, **69**, 483—446.
32. Capesius I., Bopp M., (1974), *Planta*, **118**, 171—181.
33. Hotta Y., Stern H., (1961), *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**, 311—319.
34. Hotta Y., Stern H., (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **49**, 648—654.
35. Brent T. P., Butler J. A. V., Crathorn A. R., (1965), *Nature*, **207**, 176—177.
36. Stubblefield E., Müller G. C., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 535—538.
37. Littlefield J. W., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 398—403.
38. Mittermayer C. M., Bosselmann R., Bremerskov V., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 487—489.
39. Stubblefield E., Murphree S., (1967), *Exptl. Cell Res.*, **48**, 652—656.
40. Adams R. L. P., (1969), *Exp. Cell Res.*, **56**, 49—54.

41. Ives D. H., Morse P. A. V. R., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 1467—1472;
- 41a. Breitman T. T., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 153—155.
42. Olsen I., Harris G., (1975), *Biochem. J.*, **146**, 489—496.
43. McAuslan B. R., Joklik W. K., (1962), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **8**, 486—491.
- 43a. Cheng Y. C., Goz B., Prusoff W. H., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **390**, 253—263.
44. Kit S., Dubbs D. R., (1963), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **11**, 55—59.
- 44a. Kit S., Dubbs D. R., Piekarski L. J., Hsu T. C., (1963), *Exptl. Cell Res.*, **31**, 297—312.
45. Nohara H., Kaplan A. S., (1963), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 189—193.
46. Dulbecco R., Hartwell L. H., Vogt M., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **53**, 403—410.
47. McDougall J. K., (1974), *Sci. American*, **231**, 36—44.
48. McDougall J. K., (1971), *J. Gen. Virol.*, **12**, 43—49.
49. McDougall J. K., Kucherlapati R., Ruddle F. H., (1973), *Nature, New Biology.*, **245**, 172—175.
50. Keir H. M., (1968), *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, **18**, 67—72; cyt. za (1).
51. Hatanaka M. M., Twiddy E., Gilden R., (1969), *J. Virol.*, **7**, 801—813.
52. Hatanaka M. M., Dulbecco R., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **58**, 1888—1894.
53. Davidson R. L., Adelstein S. J., Oxman M. N., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 1912—1916.
54. Rothschild H., Black P. H., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **67**, 1042—1049.
55. Munyon W., Kraiselbud E., Davis D., Zeigel R., Buschsbaum R., Paoletti E., (1972), *Fed. Proc.*, **31**, 1669—1673.
56. Kit S., Nakajima K., Dubbs D. R., (1970), *J. Virol.*, **5**, 446—450.
57. Rawls W. E., Cashon G., Adam E., Ogino T., Duff R., Rapp F., (1974), *Canc. Res.*, **34**, 362—366.
58. Epstein S., Eşanu C., Raben M. S., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **186**, 280—285.
59. Masui H., Garren L. D., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2627—2633.
60. Masui H., Garren L. D., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5407—5413.
61. Nordenskjöld B. A., Skoog L., Brown N. C., Reichard P., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5360—5368.
62. Pegorano L., Bernego M. G., (1971), *Exptl. Cell Res.*, **68**, 283—290.
63. Weiss M. C., Green H., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **58**, 1104—1111.
- 63a. Matsuya H., Green H., Basilico C., (1968), *Nature*, **220**, 1199—1202.
64. Miller O. J., Allderdice P. W., Miller D. A., Berg W. R., Mi-geon B. R., (1971), *Science*, **173**, 244—245.
65. Boone C., Chen T.-R., Ruddle F. H., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 510—514.
66. Kit S., Leung W.-C., Jorgensen G., Trkula D., Dubbs D. R., (1974), *J. Cell Biol.*, **63**, 505—514.
67. Nagano H., Mano Y., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **157**, 546—557.
68. Duspiva F., Hansen-Delkeskamp E., (1965), *Z. Naturforsch.*, **20b**, 582—587.
69. Petrocellis B. de, Monroy A., (1974), *Endeavour*, **119**, 92—98.
- 69a. Petrocellis B., de, Rossi M., (1975), Abstr. 10 FEBS Meet., Paryż, Abstr. 294.

70. Tencer R., (1961), *Exptl. Cell Res.*, **23**, 418—425.
71. Brookes V. J., Williams C. M., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **53**, 770—777.
72. Moriuchi A., Koga K., Yamada Y., Akune S., (1972), *J. Insect Physiol.*, **18**, 1463—1476.
73. Turenne M. de, Daillie J., (1973), *Biochimie*, **55**, 1439—1447.
74. Roth J. S., Askew J., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 28—36.
75. Wanka F., Vasil I. K., Stern H., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 50—59.
76. Wanka F., Walboomers J. M., (1966), *Z. Pflanzenphysiol.*, **55**, 458—465.
77. Wanka F., (1967), *Z. Naturforsch.*, **22b**, 91—96.
78. Schwarz O. J., Fites R. C., (1970), *Phytochemistry*, **9**, 1899—1905.
79. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., (1974), *Internat. J. Biochem.*, **5**, 597—599.
80. Gołaszewski T., Rytel M., Rogoziński J., Szarkowski J. W., (1975), *FEBS Letters*, **58**, 370—373.
81. Gołaszewski T., Rytel M., Szarkowski J. W., (1972), *Acta Biochim. Polon.*, **19**, 201—205.
82. Gołaszewski T., Rytel M., Szarkowski J. W., (1973), *Acta Biochim. Polon.*, **20**, 217—221.
83. Arima T., Masaka H., Shiosaka T., Okuda H., Fujii S., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **246**, 184—193.
84. Deng Q., Ives D. H., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **277**, 235—243.
85. Bannwarth H., (1975), *Protoplasma*, **83**, 169—170.
86. Bannwarth H., (1975), *Protoplasma*, **83**, 170—170.
87. Okazaki R., Kornberg A., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 269—274; Okazaki R., Kornberg A., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 275—284.
88. Iwatsuki N., Okazaki R., (1967), *J. Mol. Biol.*, **29**, 139—154.
- 88a. Iwatsuki N., Okazaki R., (1967), *J. Mol. Biol.*, **29**, 155—165.
89. Tanooka H., Terano H., Otsuka H., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 26—37.
90. Kobayashi S. H., Hubbell H. R., Orenge A., (1974), *Biochemistry*, **13**, 4537—4542.
91. Adelstein S. J., Baldwin C., Kohn H. I., (1971), *Develop. Biol.*, **26**, 537—546.
92. Berk A. J., Clayton D. A., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2722—2729.
93. Attardi B., Attardi G., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 2874—2878.
- 94a. Kit S., Leung W.-C., Trkula D., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 503—513.
- 94b. Kit S., Leung W.-C., Trkula D., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 455—461.
- 94c. Kit S., Leung W.-C., (1974), *J. Cell Biol.*, **61**, 35—44.
- 94d. Kit S., Leung W.-C., Trkula D., Dubbs D. R., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 66—76.
- 94e. Kit S., Leung W.-C., Kaplan L. A., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **39**, 43—48.
95. Berk A. J., Meyer B. J., Clayton D. A., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 563—565.
96. Clayton D. A., Teplitz R. L., (1972), *J. Cell. Sci.*, **10**, 487—493.
97. Kit S., Minekawa Y., (1972), *Canc. Res.*, **32**, 2277—2288.
98. Robberson D. L., Clayton D. A., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3810—3814.
99. Bogenhagen D., Clayton D. A., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7991—7995.

100. Zeman L., Lusena C. V., (1974), *FEBS Lett.*, **40**, 84—87.
101. Harris W. J., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 315—325.
102. Baril E., Baril B., Elford H., (1973), *Canc. Res.*, **33**, 1187—1193.
103. Baril E., Baril B., Luftig R. B., Elford H. L., (1974), wyniki niepubl., cyt. za (1).
104. Elford H. L., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 537—543.
105. Ecker P., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 659—662.
106. Ecker P., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 1979—1984.
107. Kim J. H., Gelbard A. S., Perez A. G., (1967), *Canc. Res.*, **27**, 1301—1310.
108. Bresnick E., Burleson S. S., (1970), *Canc. Res.*, **30**, 1060—1063.
109. Weissman S. M., Smellie R. M. S., Paul J., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 101—110.
110. Gray E. D., Weissman S. M., Richards J., Bell D., Keir H. M., Smellie R. M. S., Davidson J. N., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 111—120.
111. Ecker P. J., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2607—2611.
112. Brunori A., Hoita Y., Stern H., (1974), *Plant Cell Physiol.*, **15**, 421—427.
113. Moore E. C., Hurlbert R. B., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 4802—4809.
114. Taylor A. T., Stafford M. A., Jones O. W., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1930—1935.
115. Stafford M. A., Jones O. W., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **277**, 439—442.
116. Bull D. L., Taylor A. T., Austin D. M., Jones O. W., (1974), *Virology*, **57**, 279—284.
117. Cooper R. A., Perry S., Breitman T. R., (1966), *Canc. Res.*, **26**, 2267—2275.
118. Hashimoto T., Shiosaka T., Okuda H., Fujii S., (1969), *Jap. Canc. Res. „Gann”*, **60**, 41—46; cyt. za (119).
119. Her M. O., Momparker R. L., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6152—6158.
120. Bresnick E., Thompson U. B., Lyman K., (1966), *Arch. Biochem. Biophys.*, **114**, 352—359.
121. Bresnick E., Thompson U. B., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 3967—3974.
122. Chiang K. S., Eves E., Swinton D., (1975), *Develop. Biol.*, **42**, 53—63.
123. Lazarus L. H., Kitron N., (1973), *J. Mol. Biol.*, **81**, 529—534.
124. Woodland H. R., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **186**, 1—12.
125. Howland J. L., (1973), w *Cell Physiology*, str. 361—362, The Macmillan Co, New York, London.
126. Williams A. F., (1972), *J. Cell Sci.*, **11**, 777—784.
127. Weinstock I. M., Dju M. Y., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **232**, 5—13.
128. Hopkins H. A., Campbell H. A., Barbiroli B., Potter V. R., (1973), *Biochem. J.*, **136**, 955—966.

ALINA GRZELIŃSKA *

Fitoaleksyny

Fitoalexins

Każda roślina w toku ontogenezy styka się nieustannie z czynnikami chorobotwórczymi. Mimo jednak tego ciągłego zagrożenia znaczna część roślin nie ulega chorobom wskutek funkcjonowania specyficznych i niespecyficznych mechanizmów obronnych. Ogólne wiadomości na temat funkcjonowania tych mechanizmów w tkankach rośliny opublikowano na łamach *Postępów Biochemii* już wcześniej (1). Przejawem aktywnego procesu obronnego jest biosynteza substancji wykorzystywanych w walce z mikroorganizmami patogenicznymi. I chociaż charakter chemiczny tych substancji jest różny zaproponowano dla nich wspólną nazwę fitoaleksyny.

Produkcja fitoaleksyn zostaje uruchomiona po pokonaniu przez patogen przeciwinwazyjnych barier anatomicznych, fizjologicznych i chemicznych, umownie określanych jako odporność bierna rośliny. Związki te powstają zatem w wyniku bezpośredniego kontaktu komórek rośliny z mikroorganizmami i jakkolwiek nie zapobiegają samej infekcji to hamują proces generalizacji choroby.

Doniesienia dotyczące mechanizmu biosyntezy i działania fitoaleksyn mimo szerokich badań w tym zakresie są jeszcze bardzo wycinkowe i skąpe. Pogląd o powstawaniu w roślinie wskutek kontaktu z mikroorganizmami grzybowymi związków działających jako fitoaleksyny wysunął Müller (2) jeszcze w latach trzydziestych opierając się na obserwacjach prowadzonych na ziemniakach porażonych różnymi rasami grzyba *Phytophthora infestans*. Główne założenia sformułowanej przez niego teorii, która następnie przez wiele lat ustępowała miejsca fenolowej teorii odporności (3), zostały już omówione w wielu referatach przeglądowych (1, 4, 5). Zdaniem Müllera wzmożona produkcja fitoaleksyn zachodzi w tkankach bezpośrednio porażonych i w najbliższym ich sąsiedztwie. Jest to więc proces typowo lokalny. Jako związki niespecyficzne fitoaleksyny wykazują dość szeroki zakres działania, a mikroorganizmy różnią się stopniem wrażliwości na określone fitoaleksyny. Patogenami roślin stają się te mi-

* Dr. Instytut Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza w Warszawie, ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa

kroorganizmy, które nie są wrażliwe na występującą w tkankach fitoaleksynę i jej stężenie. Mechanizm obronny polegający na produkcji fitoaleksyn jest zasadniczo wspólny roślinom wrażliwym i odpornym, różnica przejawia się jedynie w szybkości poinfekcyjnej biosyntezy fitoaleksyn. W tkankach roślin odpornych szybkość ta jest zdecydowanie większa i to warunkuje skuteczną obronę. Zdaniem Cruickshanka (4) szybkość reakcji jest cechą specyficzną roślin zdeterminowaną genetycznie.

Omówione wyżej zasadnicze postulaty teorii Müllera zachowały w ogólnym zarysie swą aktualność do dzisiaj, a modyfikacje jakie pojawiły się ostatnio wynikały z możliwości analizy tego procesu na poziomie molekularnym, a także z rozszerzenia badań na wiele gatunków roślin uprawnych. Doprowadziło to do stwierdzenia, że biosynteza fitoaleksyn ma związek nie tylko z reakcją nadwrażliwości lecz charakteryzuje także inne typy reakcji odpornościowych (6, 7). Ponadto produkcję fitoaleksyn mogą stymulować grzyby (8, 9, 10), bakterie (11, 12), wirusy (13, 14) a nawet czynniki niemikrobiologiczne (5).

Z chemicznego punktu widzenia wyizolowane dotychczas fotoaleksyny nie stanowią, jak już wspomniano wyżej, jednolitej grupy związków. Jednakże wszystkie zidentyfikowane chemicznie fitoaleksyny są związkami niskocząsteczkowymi, które w roślinach zdrowych nie występują wcale (14, 15) lub występują w ilościach śladowych (7), po infekcji zaś poziom ich znacznie wzrasta (16, 17, 7). Związki te powstają nie tylko w kombinacji niezgodnej*, ale także w wyniku kontaktu roślin wrażliwych z grzybami niepatogenicznymi wobec danego gatunku (12, 18, 19). Zjawisko to próbowano wykorzystać dla uodpornienia roślin wrażliwych w stosunku do grzybów patogenicznych. I rzeczywiście w badaniach nad soją (19, 20) i ziemniakiem (21) wykazano, że ilość fitoaleksyny wytworzonej po pierwotnej inokulacji grzybami ze szczepów niejadliwych była wystarczająca aby zahamować objawy chorobowe po wtórnej inokulacji grzybami zjadliwymi.

Wydaje się zatem, że nawet w roślinach całkowicie wrażliwych istnieją potencjalne możliwości indukowania uwarunkowanej genetycznie reakcji odpornościowej. Muszą jedynie zaistnieć warunki ujawnienia się tej możliwości przez ekspresję odpowiednich genów.

Wskazuje to na podobieństwo mechanizmu reakcji odpornościowej na choroby infekcyjne w tkankach roślin i zwierząt. Pogląd taki może doprowadzić do nieporozumień w genetyce odporności, ponieważ jest równoznaczny z tym, że zarówno rośliny odporne, jak i wrażliwe mają geny

* Kombinacja niezgodna — to określenie stosowane dla współdziałania żywicieli odporny — patogen. Kontakt ten jednakże wobec niezgodności genetycznej nie prowadzi do rozwoju choroby. Kombinacja zgodna natomiast obejmuje współdziałanie żywicieli wrażliwy — patogen, przy którym wzajemna tolerancja genetyczna umożliwia swobodny rozwój mikroorganizmów.

odporności, a odporność czy wrażliwość na poszczególne mikroorganizmy zależy jedynie od warunków ekspresji tych genów.

Jeżeli przyjąć, że fitoaleksyny uczestniczą w regulacji wzrostu patogenów *in vivo* to komórkowa odporność na choroby obejmowałaby syntezę fitoaleksyn w sensie jakościowym oraz zależność między ich poinfekcyjnym stężeniem a toksycznością w stosunku do mikroorganizmów (6). I o ile jakość wytwarzanych fitoaleksyn jest cechą gatunkową, a szybkość ich syntezy cechą odmianową rośliny żywiciela, to stopień toksyczności tych związków zależy od cech genetycznych mikroorganizmów (22).

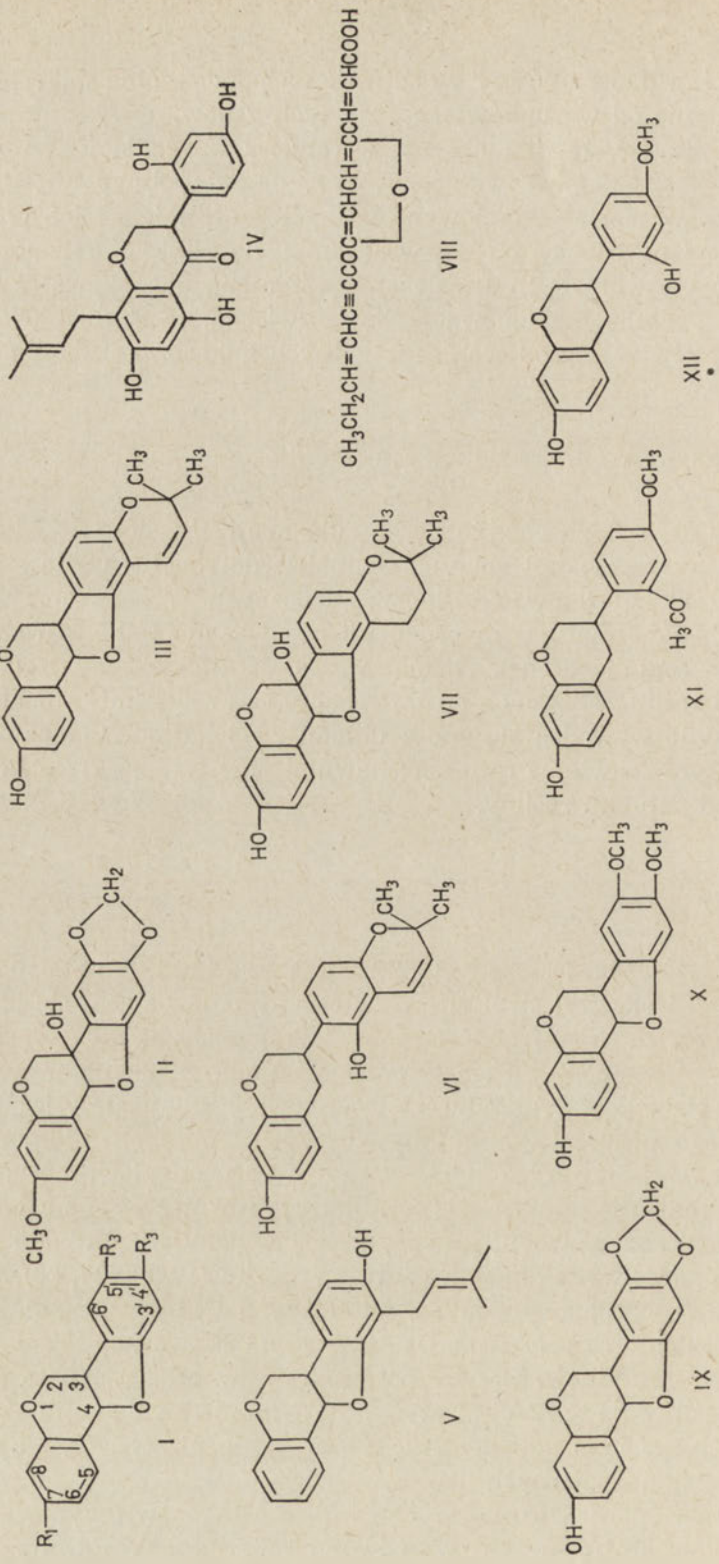
I. Fitoaleksyny roślin motylkowych (*Papilionaceae*)

Należy się spodziewać, że liczba substancji określonych jako fitoaleksyny w przyrodzie jest znaczna. Jednakże dotychczas udało się je wyizolować i zidentyfikować tylko w nielicznych wypadkach. Najpełniej obecnie zbadano pod kątem produkcji fitoaleksyn rośliny z rodziny motylkowych (*Papilionaceae*). Niemal wszystkie fitoaleksyny izolowane po inokulacji roślin należących do tej rodziny są związkami aromatycznymi. Strukturalnie wywodzą się one z układu zwanego chromanokumaranem (I), który może zawierać różne podstawniki przy węglu C₇, C_{4'} i C_{5'}, w zależności od gatunku rośliny.

I-1. Pizatyna

Najwcześniej bo jeszcze w 1962 roku Perrin i Bottomley (23) wyizolowali i określili strukturę fitoaleksyny pojawiającej się po infekcji grochu przez *Monilia fructicola*; nazwali ją pizatyną (II). Pizatyna jest 3-hydroksy-7-metoksy-4',5'-metylenodwuoksychromanokumaranem (23) o działaniu słabego antybiotyku i stosunkowo niskiej specyficzności (24). Syntezę tego związku stymulują grzyby wielu gatunków, nie powstaje on natomiast w wyniku infekcji bakteryjnej i po zranieniach mechanicznych (10, 25). Produkcję pizatyny zapoczątkowują również pewne czynniki niemikrobiologiczne, powodujące specyficzne zmiany konformacji DNA na odcinkach właściwych dla syntezy tego związku (17, 26, 27, 28), jak aktynomycyna D, chromomycyna A₃, mitomycyna C, nitrozoguanidyna, jony metali ciężkich oraz promienie UV, przy czym skuteczne są jedynie niskie dawki tych czynników. Grzyby patogeniczne wobec grochu są stosunkowo niewrażliwe na te ilości pizatyny, które gromadzą się po infekcji roślin wrażliwych, podczas gdy poinfekcyjne stężenie pizatyny hamuje rozwój grzybów niepatogenicznych (29).

A zatem odporność roślin grochu wobec patogenów grzybowych wynikać może ze zróżnicowanej wrażliwości mikroorganizmów na produkco-



wane przez rośliny poinfekcyjnie związki typu fitoaleksyn lub ze zróżnicowanej zdolności mikroorganizmów do degradacji pizatyiny, a nie z faktu istnienia odpowiednich genów odporności.

I-2. Fazeolina

Inną fitoaleksyną produkowaną przez rośliny fasoli po infekcji grzybami *Monilia fructicola*, *Rhizoctonia solani* i *Colletotrichum lindemuthianum* jest fazeolina (III). Strukturę tego związku określono jako 7-hydroksy-3',4'-dwumetylochromanokumaran (30, 31). W odróżnieniu od pizatyiny syntezę fazeoliny stymulują niektóre bakterie i zranienia mechaniczne (6), wirusy (32), a także aktynomycyna D (33). Ponadto okazało się, że inokulacja roślin fasoli różnymi mikroorganizmami zapoczątkowuje obok fazeoliny syntezę wielu innych związków o charakterze fenolowym (34). Kilka z tych związków udało się już zidentyfikować jako kewiton (IV) (35, 36), fazeolidynę (V) (37, 38) i fazeolinizoflawon (VI) (9, 35, 39, 40). Stosunek ilościowy tych związków po infekcji jest zmienny i zależy od odmiany rośliny, rodzaju grzyba i okresu inkubacji (41).

Syntezę fazeoliny stymuluje związek peptydowy wyizolowany z *Monilia fructicola*, który nazwano monilikuliną A (42). Jest to jedyny mykointygen, jaki udało się dotychczas zidentyfikować.

I-3. Hydroksyfazeolina

Jest to fitoaleksyna soi (VII) wytwarzana po inokulacji różnymi szczepami grzybów *Phytophthora megasperma*, *Helminthosporium carbonum*, *Monilia fructicola* i *Trichoderma viridiae* (43, 44), a także wirusem nekrozy tytoniowej (14) i bakteriami *Pseudomonas glycinea* (11). Syntezę hydroksyfazeoliny stymulują także promienie UV, czemu towarzyszy zwiększenie odporności soi na *Phytophthora megasperma* var. *sojae* (45). Związek ten ma dość silne właściwości fungitoksyczne, a w stężeniu w jakim gromadzi się po infekcji hamuje wzrost grzybów w 70—90% (46).

Odporność roślin soi przejawia się tym, że po inokulacji rasą niezgodną grzyba *P. megasperma* hydroksyfazeolina gromadzi się 20—50 razy szybciej niż po infekcji rasą zgodną, czyli zjadliwą tego grzyba (47—48). Okazało się także, iż w kombinacji niezgodnej poziom wytworzonej hydroksyfazeoliny przekracza kilkaset razy stężenie hamujące wzrost grzyba (ED_{50}), podczas gdy w kombinacji zgodnej ilość ta jest równa wartości ED_{50} lub niższa. Zmiany te są wynikiem ekspresji jednego z dwóch allolomorficznych genów odporności soi.

I-4. Kwas wieronowy

Sugeruje się, że związek ten, który z punktu widzenia chemicznego jest pochodną furanuacetyleny (VIII), stanowi fitoaleksynę bobu produkowaną po infekcji *Botrytis cinerea* i *Botrytis fabae* (49). Jest on silnie toksyczny w stosunku do mikroorganizmów niepatogenicznych wobec bobu, a mniej aktywny wobec *B. cinerea* (50). Stężenie kwasu wieronowego po infekcji roślin przez *B. fabae* wzrasta 400—500 razy. Różnice w patogeniczności *B. cinerea* i *B. fabae* wobec bobu zależą od zdolności tych grzybów do rozkładu fitoaleksyny; szybkość degradacji kwasu wieronowego przez *B. fabae* jest znacznie wyższa (51). Strukturalne pokrewieństwo kwasu wieronowego z jego estrem acetylowym, który jest naturalnym składnikiem rośliny, może wskazywać, że infekcja stanowi bodziec odblokowujący reakcję hydrolizy prowadzącą do powstania tego związku (52). Cruickshank (53) w badaniach nad bobem porażonym zawieszoną konidiów *M. fructicola* znalazł związek o charakterze izoflawonoidu, który określił jako fitoaleksynę bobu. Substancję tę, której struktura chemiczna nie została ustalona nazwano wicziatyną.

I-5. Inne fitoaleksyny roślin motylkowych

Fitoaleksyny zostały wyizolowane także z niektórych pastewnych roślin motylkowych. Tak na przykład rośliny koniczyny porażone grzybem *Helminthosporium turcicum* syntetyzują dwa związki pterokarpanoidowe; związek o strukturze 7-hydroksy-5',4'-metylenodwuoksypterokarpanu (IX) nazwano makainą, a o strukturze 7-hydroksy-4'-metoksypterokarpanu (X) medykarpiną (54).

Medykarpina występuje także w roślinach lucerny po inokulacji grzybami niepatogenicznymi *Helminthosporium turcicum* i *Colletotrichum phomoides* oraz słabym patogenem *Stemphylium loti*. Nie wykryto jej natomiast po infekcji *Stemphylium botryosum* (55, 56). Syntezę tej fitoaleksyny indukują przypuszczalnie wszystkie mikroorganizmy i to w równym stopniu, a jej stężenie w roślinie zależy wyłącznie od efektywności funkcjonowania mechanizmów degradacyjnych w komórkach grzybów. Genetycznie uwarunkowana zdolność do degradacji fitoaleksyn przejawia się znacznie silniej u grzybów patogenicznych.

Satiwina występuje po inokulacji roślin lucerny przez *Stemphylium botryosum* (XI). Strukturę chemiczną satiwiny ustalono jako 7-hydroksy-2',4'-dwumetoksychromanokumaran (57).

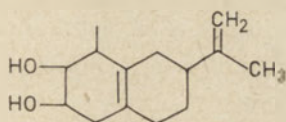
Fitoaleksyna występująca po infekcji seradeli grzybem *Stemphylium botryosum* (XII) jest związkiem określanym jako 7,2'-dwyhydroksy-4'-metoksyizoflavan. Grzyby z rodzaju *Stemphylium* wykazują zdolność do degradacji westitolu do dwóch związków fenolowych (58).

Jak już wspomniano niemal wszystkie fitoaleksyny roślin motylkowych strukturalnie wywodzą się z jednego układu przestrzennego. Wy-

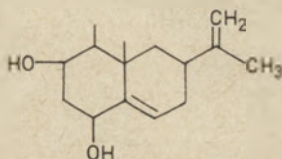
jątek stanowi jedna z fitoaleksyn bobu, która jest furanoacetylenem. Związek ten jednakże powstaje w wyniku jednoetapowej reakcji hydrolyzy z prekursora stanowiącego naturalny składnik rośliny. Zgodnie z teorią Müllera nie jest to zatem typowa fitoaleksyna, której syntezę indukuje kontakt z mikroorganizmami. Strukturalna analogia fitoaleksyn w obrębie jednej rodziny roślin dowodzi, że ewolucja procesów obronnych następowiała wskutek punktowych mutacji w obrębie genów odporności, ale z zachowaniem zasadniczego kierunku przemian. Wynika to z ogólnej efektywności, celowości i oszczędności procesów biologicznych.

II. Fitoaleksyny roślin psiankowatych (*Solanaceae*)

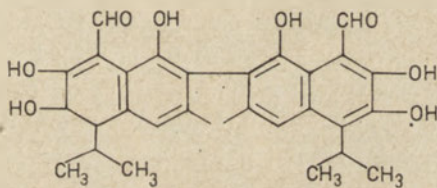
Obok roślin motylkowych fitoaleksyny znaleziono także w tkankach roślin psiankowatych. Fitoaleksyny wyizolowane z roślin tej rodziny należą do związków terpenowych.



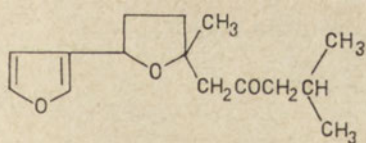
XIII



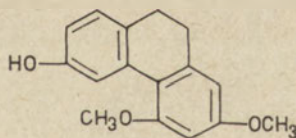
XIV



XV



XVI



XVII

II-1. Riszytyna

Związek ten wyizolowano z kłąbów ziemniaka porażonego grzybem *Phytophthora infestans* (15). Riszytyna jest bicyklicznym alkoholem nor-seskwiterpenowym (XIII). Nie występuje ona w zdrowych tkankach ziemniaka, niewielkie jej ilości gromadzą się po infekcji grzybem rasy zgodnej *Phytophthora*, natomiast jej ilość po inokulacji grzybem rasy niezgodnej wynosi 80—90 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy (15). Pojawienie się tego związku pozostaje w ścisłej korelacji z procesem brunatnienia tkanek i wiąże się z gromadzeniem innego terpenoidu — fituberyny. Fituberyną okre-

ślono jako nienasycony octan seskwiterpenowy o sumarycznym wzorze $C_{17}H_{26}O_4$ (59). Poinfekcyjne stężenie fituberyny w kłębach ziemniaka nie przekraczało 50% zawartości riszytyny. Syntezę riszytyny stymuluje chloramfenikol i streptomycyna w dawce 3—50 ppm (60), a także bezkomórkowe wyciągi z *Phytophthora infestans* zinaktywowane termicznie. Wydaje się zatem, że tak jak w przypadku fasoli, induktor reakcji odpornościowej ziemniaka jest związkiem niskocząsteczkowym i nie wykazuje cech białka. Przypuszczalnie wskutek infekcji przez *Phytophthora infestans*, w kłębach ziemniaka, w których występują glikoalkaloidy sterydowe solanina i chakonina, procesy biosyntezy zostają przesunięte w kierunku produkcji riszytyny (61).

Niezależnie od roli, jaką riszytyna spełnia w odporności ziemniaka, związek ten wyizolowano także z roślin pomidora po infekcji *Phytophthora infestans* i *Verticillium albo-atrum* (61, 62). Z nieopublikowanych danych autorki jednakże wynika, że jakkolwiek rośliny pomidora po infekcji *Verticillium* istotnie produkują jakiś związek o charakterze terpenowym, to właściwościami chemicznymi różni się on od riszytyny.

II-2. Kapsydol

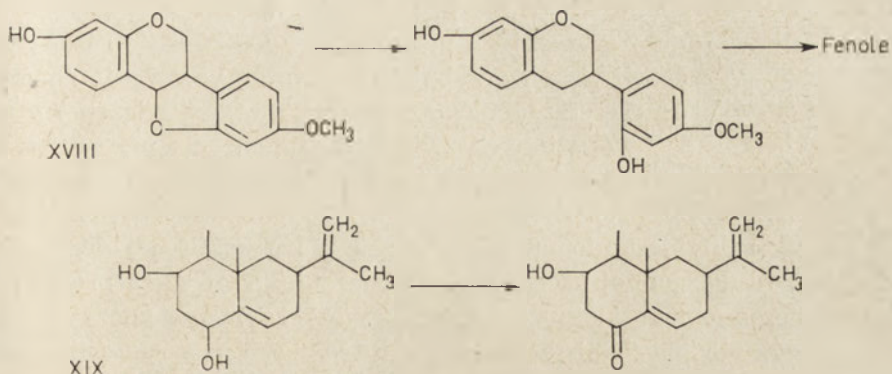
Owoce pieprzu po inokulacji grzybami *Monilia fructicola*, *Phytophthora capsici*, *Botritis cinerea*, *Fusarium oxysporum* i *Cladosporium herbarum*, wytwarzają związek nazwany kapsydolem (7, 12). Jest to norseskwiterpenowy diol o wzorze sumarycznym $C_{15}H_{24}O_2$, strukturalnie zbliżony do riszytyny (XIV). Syntezę kapsydolu indukuje również infekcja niektórymi grzybami niepatogenicznymi i bakteriami *Erwinia carotovora*. Kapsydol jest naturalnym metabolitem rośliny, a jego syntezę silnie stymuluje kontakt z mikroorganizmami, przy czym poinfekcyjne stężenie tej fitoaleksyny jest tym wyższe im niższy jest stopień patogeniczności grzybów. Kapsydol hamuje wzrost grzybni i kiełkowanie spor.

III. Fitoaleksyny innych roślin

III-1. Gosypol

W roślinach bawełny (*Malvaceae*) po infekcji *Verticillium albo-atrum* lub *Rhizopus nigricans* pojawia się związek fenolowy (XV) — gosypol (63). Związek ten, który w niewielkiej ilości jest naturalnym składnikiem roślin zdrowych nigdy nie występuje w tkankach naczyniowych. Po infekcji ilość tego związku znacznie wzrasta i gromadzi się on głównie w okolicy naczyń (64). Syntezę gosypolu stymulują także grzyby niejadliwe dla bawełny, a nawet konidia zinaktywowane termicznie. *Verticillium* indukuje ponadto syntezę trzech aldehydowych pochodnych gosypolu, które

w przeciwieństwie do gosypolu nie występują w tkankach zdrowych (16). Są to 6-metoksygosypol, 6,6'-dwumetoksygosypol i 6-metoksyhemigosypol.



III-2. Ipomeamaron

Sugerowano, że związek ten odgrywa rolę w odporności batata (*Convolvulaceae*) na *Ceratocystis fimbriata* (65). Z punktu widzenia chemicznego jest on furanoterpenoidem (XIV). Dokładne badania wykazały jednak, że jakkolwiek ipomeamaron pojawia się w dużych ilościach po infekcji grzybem (66) to nie wykryto go w tkankach poddanych uodpornieniu rasami niepatogenicznymi. Stąd jego rola jako fitoaleksyny wydaje się wątpliwa.

III-3. Orchinol

Jest to fitoaleksyna wytwarzana przez rośliny *Orchis militaris* po infekcji *Rhizoctonia repens* (67). Ma ona charakter fenolowy (XVII), a powstawaniu jej towarzyszy synteza trzech związków sterolowych, zidentyfikowanych także jako metabolity żywiciela.

Z przytoczonego przeglądu wyizolowanych dotychczas fitoaleksyn wynika, że substancje produkowane w aktywnej reakcji odpornościowej należą do dwóch grup związków, aromatycznych i terpenowych. Obie te grupy stanowią wtórne metabolity rośliny.

IV. Degradacja fitoaleksyn przez mikroorganizmy

Rozpatrując problem mechanizmu procesów odpornościowych na poziomie genetycznym Schwocha i Hadwiger (68) stwierdzili, że współdziałanie żywiciela — patogen obejmuje dominujący gen odporności żywiciela i dominujący gen braku wirulencji patogenu ujawniający się produkcją metabolitów aktywujących gen odporności żywiciela i produkcję fitoaleksyn. Natomiast gen zjadliwości patogenu uruchamiałby mechanizm zdolny do rozkładu lub przekształcenia substancji działających jako fitoaleksyny. Istnienie mechanizmów doprowadzających do degradacji fito-

aleksyn zdołano wykazać w wielu grzybach patogenicznych, z których najlepiej poznany jest mechanizm rozkładu medykarpiny przy udziale układu enzymatycznego *Stemphylium botryosum* (69, 58) — patogena lucerny (XVIII).

Pierwszym produktem rozkładu medykarpiny jest westitol, który hamuje kiełkowanie spor i wzrost grzybni *S. botryosum* w stężeniu znacznie wyższym od toksycznego stężenia związku wyjściowego. Związek ten jest dalej rozkładany do dwóch innych związków fenolowych, przy czym toksyczność jego produktów maleje w kolejnych etapach przekształceń. Ustalono, że w kombinacji zgodnej lucerna — *S. botryosum* szybkość syntezy medykarpiny jest niemal równoważna z szybkością jej degradacji; w kombinacji niezgodnej proces syntezy znacznie przewyższa proces rozkładu, podczas gdy po inokulacji roślin grzybami niepatogenicznymi wobec tego gatunku mechanizm degradacji fitoaleksyn jest całkowicie nieaktywny.

S. botryosum rozkłada także fazeolinę i pizatynę, jednakże maksymalna szybkość rozkładu jest niższa niż dla medykarpiny (70).

Zdolność do degradacji fitoaleksyn jest właściwa także grzybom *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* i *pisi*. Patogen fasoli rozkłada fazeolinę *in vitro*, czemu towarzyszy pojawienie się nowych substancji o malejących właściwościach toksycznych. Produkt powstały w pierwszym etapie degradacji zawiera grupę karbonylową, co przemawiałoby za oksydacyjnym charakterem reakcji. Przypuszcza się, że *F. solani* f. sp. *phaseoli* posiada system oksydacyjny indukowany przez niskie stężenie fazeoliny (71, 72). Podobnie patogeniczny wobec grochu klon *F. solani* f. sp. *pisi* przewyższał inne klony w szybkości rozkładu pizatyny, przy czym udowodniono, że wrażliwość na pizatynę była spowodowana zdolnością tego związku do hamowania biosyntezy białek w tkankach grzyba (73).

Grzyby z rodzaju *Fusarium oxysporum* f. *pisi* i *vasinfectum* oraz *Botrytis cinerea* wykazują zdolność oksydacyjnego przekształcenia kapsydolu (XIX). Produktem tego utlenienia jest znacznie mniej toksyczny od kapsydolu koton — kapsenon (74).

I wreszcie grzyby z rodzaju *Botrytis fabae* i *Botrytis cinerea*, a więc patogeny bobu metabolizują kwas wieronowy stanowiący fitoaleksynę tych roślin do związku o mniejszych właściwościach toksycznych wobec grzybów (75). Podobieństwo strukturalne kwasu wieronowego i powstającej substancji wskazuje, że przekształcenie jest redukcyjne, jednoetapowe. Ponieważ w dyfuzacji z roślin bobu nie znaleziono żadnych enzymów redukujących ten kwas, autorzy sugerują, że metabolizm fitoaleksyn ma miejsce w komórkach grzybni. Stanowiłoby to argument, że zdolność metabolizowania fitoaleksyn może być cechą charakterystyczną mikroorganizmów patogenicznych umożliwiającą adaptację do niekorzystnych warunków środowiska.

PIŚMIENNICTWO

1. Grzelińska A., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 141—158.
2. Müller K. O., Bürger H., (1940), *Arb. Biolog. Reichsanst. Land Forswirtschaft Berlin* **23**, 189—231.
3. Farkas G., Kiraly Z., (1962), *Phytopath. Z.*, **44**, 105—150.
4. Cruickshank I. A. M., (1963), *Ann. Rev. Phytopathol.*, **1**, 351—374.
5. Krzywański Z., (1970), *Wiad. Bot.*, **14**, 109—124.
6. Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., (1971), *Phytopath. Z.*, **70**, 209—229.
7. Stoessl A., Unwin C. H., Ward E. W. B., (1972), *Phytopath. Z.*, **74**, 141—152.
8. Paxton J., Goodchild D. J., Cruickshank I. A. M., (1974), *Physiol. Plant Pathol.*, **4**, 167—171.
9. Smith D. A., Van Etten H. D., Bateman D. F., (1973), *Physiol. Plant Pathol.*, **3**, 179—186.
10. Pueppke S. G., Van Etten H. D., (1974), *Phytopathology*, **64**, 1433—1440.
11. Keen N. T., Kennedy B. W., (1974), *Physiol. Plant Pathol.*, **4**, 173—185.
12. Ward E. W., Unwin C. H., Stoessl A., (1973), *Phytopathology*, **63**, 1537—1538.
13. Bailey J. A., Burden R. S., (1973), *Physiol. Plant Pathol.*, **3**, 171—177.
14. Klarman W. L., Hammerschlag F., (1972), *Phytopathology*, **62**, 719—721.
15. Tomiyama K., Sakuma T., Iskizaka N., Sato N., Katsui N., Takasugi M., Masamune T., (1968), *Phytopathology*, **58**, 115—116.
16. Mace M. E., Bell A. A., Stipanovic R. D., (1974), *Phytopathology*, **64**, 1297—1303.
17. Schwochau M. E., Hadwiger L. A., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**, 34—41.
18. Sinha A. K., Trivedi N., (1972), *Phytopath. Z.*, **74**, 182—191.
19. Svoboda W. E., Paxton J. D., (1972), *Phytopathology*, **62**, 1457—1460.
20. Chamberlain D. W., Paxton J. P., (1968), *Phytopathology*, **58**, 1349—1350.
21. Varna J. L., Currier W., Kuć J., (1971), *Phytopathology*, **61**, 968—971.
22. Cruickshank I. A. M., Biggs D. R., Perrin D. R., (1971), *J. Indian Bot. Soc. Golden Jubilee Volume*, **50A**, 1—11.
23. Perrin D. R., Bottomley W., (1962), *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1919—1922.
24. Cruickshank I. A. M., (1962), *Aust. J. Biol. Sci.*, **15**, 147—159.
25. Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., (1963), *Aust. J. Biol. Sci.*, **16**, 111—128.
26. Hadwiger L. A., (1972), *Phytopathology*, **62**, 761.
27. Hadwiger L. A., Schwochau M. E., (1971), *Plant Physiol.*, **47**, 588—590.
29. Van Etten H. D., (1973), *Phytopathology*, **63**, 1477—1482.
30. Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., (1963), *Life Sci.*, **2**, 680—682.
31. Perrin D. R., (1964), *Tetrahedron Letters*, **1**, 29—35.
32. Bailey J. A., Burden R. S., (1973), *Physiol. Plant Pathol.*, **3**, 171—177.
33. Biggs D. R., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 660—666.
34. Pierrie R. E., (1971), *Phytopathology*, **61**, 322—327.
35. Burden R. S., Bailey J. A., Dawson G. W., (1972), *Tetrahedron Letters*, **8**, 4175—4178.
36. Smith D. A., Van Etten H. D., Serum J. W., Jones T. M., (1973), *Physiol. Plant Pathol.*, **3**, 293—297.
37. Perrin D. R., Biggs D. R., Cruickshank I. A. M., (1974), *Aust. J. Chem.*, **27**, 1607—1611.
38. Perrin D. R., Whittle C. P., Batterham T. J., (1972), *Tetrahedron Letters*, **9**, 1673—1676.
39. Bailey J. A., (1974), *Physiol. Plant Pathol.*, **4**, 477—488.

40. Smith D. A., Van Etten H. D., Bateman D. F., (1975), *Physiol. Plant Pathol.*, **5**, 51—64.
41. Cruickshank I. A. M., Biggs D. R., Perrin D. R., (1974), *Physiol. Plant Pathol.*, **4**, 261—276.
42. Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., (1963), *Life Sci.*, **7**, 449—458.
43. Biehn W., Kuć J., Williams E., (1968), *Phytopathology*, **58**, 1255—1260.
44. Frank J. A., Paxton J. D., (1970), *Phytopathology*, **60**, 315—318.
45. Bridge M. A., Klarman W. L., (1971), *Phytopathology*, **63**, 606—609.
46. Biehn W., Williams E., Kuć J., (1968), *Phytopathology*, **58**, 1261—1264.
47. Keen N. T., (1971), *Physiol. Plant Pathol.*, **1**, 265—275.
48. Keen N. T., Sims J., Erwin D., Rice E., Partridge J., (1971), *Phytopathology*, **61**, 1084—1089.
49. Letcher R. M., Widdowson D. A., Deverall B. J., Mansfield J., (1970), *Phytochemistry*, **9**, 249—252.
50. Fawcett C., Spencer D., Wain R., (1969), *North. J. Plant Pathol.*, **75**, 72—81.
51. Deverall B. J., Vessey J. C., (1969), *Ann. Appl. Biol.*, **63**, 449—458.
52. Ingham J. L., (1973), *Phytopath. Z.*, **78**, 314—335.
53. Cruickshank I. A. M., (1966), *World Rev. Pest. Cont.*, **5**, 161—175.
54. Higgins V. J., Smith D. G., (1972), *Phytopathology*, **62**, 235—238.
55. Higgins V. J., Millar R., (1968), *Phytopathology*, **58**, 1377—1383.
56. Smith D. G., Mc. Innes A., Higgins V., Millar R., (1971), *Physiol. Plant Pathol.*, **1**, 41—44.
57. Ingham J. L., Millar R. L., (1973), *Nature*, **242**, 125—126.
58. Steiner P. W., Millar R. L., (1974), *Phytopathology*, **64**, 586.
59. Varns J., Kuć J., Williams E. B., (1971), *Phytopathology*, **61**, 174—177.
60. Ersek T., Barna R., Kiraly Z., (1973), *Acta Phytopathol. Acad. Sci Hung.*, **8**, 3—12.
61. Sato N., Tomiyama K., Katsui N., Masamune T., (1968), *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.*, **34**, 344—345.
62. Tjamos E. C., Smith M. J., (1974), *Physiol. Plant Pathol.*, **4**, 249—259.
63. Bell A. A., (1969), *Phytopathology*, **59**, 1119—1127.
64. Bell A. A., (1967), *Phytopathology*, **57**, 759—764.
65. Akazawa T., Wada K., (1961), *Plant Physiol.*, **36**, 139—144.
66. Hyodo H., Uritani I., Akai S., (1969), *Phytopath. Z.*, **65**, 332—340.
67. Fisch M., Arditti J., (1972), *Amer. J. Bot.*, **59**, 672.
68. Schwochau E. M., Hadwiger L. A., (1970), *Recent Advances Phytochem.*, **3**, 181—190.
69. Higgins V. J., Millar R. L., (1969), *Phytopathology*, **59**, 1500—1506.
70. Heath M. C., Higgins V. J., (1973), *Physiol. Plant Pathol.*, **3**, 107—120.
71. Van den Henvel J., Van Etten H. D., (1972), *Phytopathology*, **62**, 794.
72. Van den Henvel J., Van Etten H. D., (1973), *Physiol. Plant Pathol.*, **3**, 327—339.
73. Christenson J. A., Hadwiger L. A., (1973), *Phytopathology*, **63**, 784—790.
74. Stoessl A., Unwin C. H., Ward E. W. B., (1973), *Phytopathology*, **63**, 1225—1231.
75. Mansfield J. W., Widdowson D. A., (1973), *Physiol. Plant Pathol.*, **3**, 393—404.

MAREK KAJETAN JURKOWSKI *

Fosfolipazy zwierzęce

Animal Phospholipases

Wstęp

Fosfolipazy należą do ważniejszych enzymów katalizujących przemiany fosfolipidów w organizmach żywych. Pierwotna nazwa tych enzymów — lecytynazy wywodziła się od nazwy substratu na jaki działały, lecytyna bowiem była w owym czasie jedynym dostępnym fosfolipidem, którego czystą postać otrzymano w większych ilościach z żółtek jaj ptasich (1).

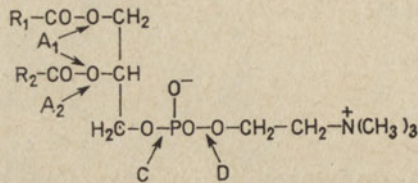
Ze względu na miejsce hydrolitycznego rozszczepienia wiązań estrowych wyróżniono lecytynazy: A, B, C, D. Późniejsze badania różnych substratów fosfolipidowych oraz udoskonalenie technik badawczych spowodowały zarzucenie terminu lecytynazy, a w powszechnym użyciu pozostała nazwa fosfolipazy z zachowaniem ich oznakowania literowego (Ryc. 1) (2). Następnie rozróżniono fosfolipazy A₁ i A₂ biorąc pod uwagę pozycje wiązań acyloestrowych hydrolizowanych przez te enzymy (Ryc. 2) (3). Fosfolipazy B katalizują całkowitą deacylację substratu, zaś lizofosfolipazy hydrolizują lizopochodne fosfolipidów powstałe w wyniku działania odpowiednich fosfolipaz A. Według nomenklatury systematycznej fosfolipazy A są fosfatydyloacylohydrolazami (E.C. 3.1.1.4), fosfolipazy B oraz lizofosfolipazy są lizofosfatydyloacylohydrolazami (E.C. 3.1.1.5.), fosfolipazy C są cholinofosfohydrolazami (E.C. 3.1.4.3.), a fosfolipazy D są fosfatydylohydrolazami (E.C. 3.1.4.4.).

Fosfolipazy A występują zarówno w tkankach roślinnych jak i zwierzęcych, fosfolipazy C i D wyłącznie w roślinach, fosfolipazy B oraz lizofosfolipazy w organizmach zwierzęcych i mikroorganizmach roślinnych.

* Mgr, Zakład Chemii Ogólnej, Akademia Medyczna w Gdańsku, Al. Zwycięstwa 42, 80-210 Gdańsk

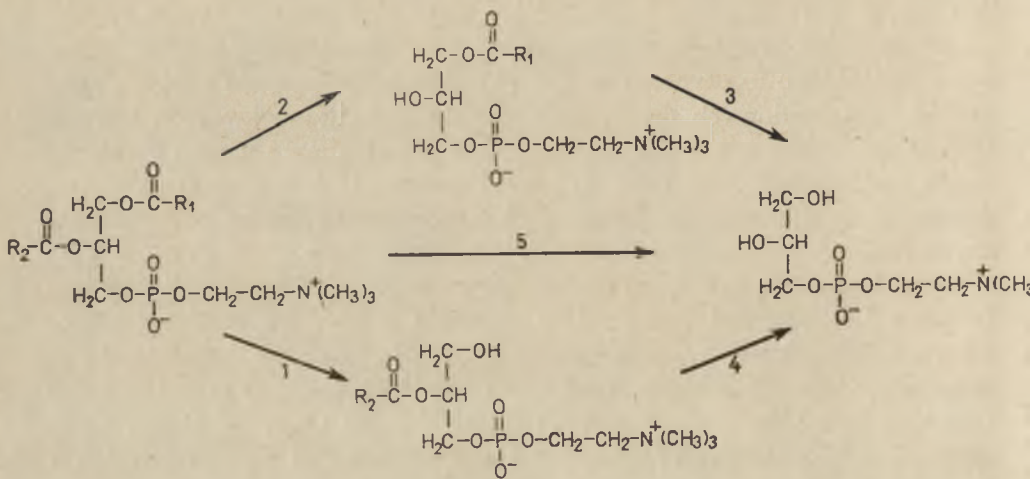
Wykaz stosowanych skrótów: GPC — dwuacylo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholina; GPE — dwuacylo-*sn*-glicero-3-fosfatydyloetanolamina; GPS — dwuacylo-*sn*-glicero-3-fosfatydyloseryna; GPI — dwuacylo-*sn*-glicero-3-fosfatydyloinozytol; lizoGPC — monoacylo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholina; lizoGPE — monoacylo-*sn*-glicero-3-fosfatydyloetanolamina; lizoGPS — monoacylo-*sn*-glicero-3-fosfatydyloseryna; lizoGPI — monoacylo-*sn*-glicero-3-fosfatydyloinozytol

Istnienie fosfolipazy B jako oddzielnego enzymu poddawane jest w wątpliwość. Stwierdzono bowiem, że fosfolipaza A₁ posiada zdolność całkowitej deacylacji fosfolipidów, a ponadto odszczepienie dwóch kwasów tłuszczowych może zachodzić także dzięki łącznemu działaniu fosfolipazy A₂ i lizofosfolipazy (Ryc. 2). Zarzucono przeto aktualnie stosowanie terminu fosfolipaza B dla enzymów zwierzęcych. W odniesieniu do enzymów bakteryjnych termin ten używany jest nadal.



Ryc. 1. Schemat działania hydrolitycznego fosfolipaz (2)

R₁ — kwas nasycony, R₂ — kwas nienasycony, strzałki oznaczają wiązania hydrolizowane przez odpowiednie enzymy oznaczone dużymi literami



Ryc. 2. Możliwe drogi enzymatycznej hydrolizy fosfolipidów (na przykładzie lecytyny) przez fosfolipazy zwierzęce (3)

1;4 — fosfolipaza A₁, 2 — fosfolipaza A₂, 3 — lizofosfolipaza, 5 — fosfolipaza A₂ + lizofosfolipaza

I. Fosfolipaza A₂

Fosfolipazę A₂ otrzymano w dość czystej postaci m. innymi z jadu węży: *Naja naja*, *Crotalus adamanteus*, *Agkistrodon piscivorus* (4), oraz jadu pszczoł *Apis mellifera* (5). Aktywność zaś fosfolipazy A₂ wykazano w wielu tkankach różnych gatunków zwierząt (6—18). W mitochondriach

fosfolipaza A_2 występuje sama (16—20) zaś w lizosomach i błonach cytoplazmatycznych równoległe z fosfolipazą A_1 (15—21).

Fosfolipaza A_2 jest enzymem specyficznie rozszczepiającym β wiązanie acyloestrowe fosfolipidów. Enzym ten nie posiada jednakże zdolności do całkowitej deacylacji substratu. W związku z występowaniem nienasyconych kwasów tłuszczowych w pozycji β w wielu fosfolipidach naturalnego pochodzenia (22) wiązano swoistość działania tej fosfolipazy ze stopniem nienasycenia kwasu tłuszczowego. Jednakże badania z zastosowaniem znakowanych substratów fosfolipazy A_2 nie potwierdziły tego przypuszczenia. Stopień nienasycenia kwasu obecnego w pozycji β fosfolipidu wpływał bowiem jedynie na szybkość reakcji enzymatycznej hydrolizy substratu (23). Fosfolipaza A_2 wykazuje wyraźne różnice powinowactwa w zależności od rodzaju substratu na jaki działa (Tabela 1) (17) niezależnie od pochodzenia enzymu.

Tabela 1

Wpływ rodzaju substratu na aktywność fosfolipazy A_2 z mózgu szczura (17)

Substrat	K_m (mM/l)	V (μ M/l/min)
dwuacylo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatydylocholina	0,98	2,8
dwuacylo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatydyloetanolamina	0,75	4,0
dwuacylo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatydyloseryna	1,42	2,2

Fosfolipazy endogenne (występujące i działające wewnątrztkankowo) wykazują największe powinowactwo w stosunku do GPE (20), natomiast enzymy egzogenne (występujące w jadach i sokach trawiennych) oraz fosfolipazy z błon erytrocytów owiec, kóz i wołów najszybciej hydrolizują GPC (12, 24). Poza działaniem na GPE, GPC, GPS, GPI enzym działa również na kwas fosfatydowy, kardiolipidy i plazmalogeny (17, 25).

Reakcje katalizowane przez fosfolipazy A_2 podlegają stymulacji przez: jony Ca^{2+} (10, 12), eter etylowy (26), taurocholan (8), Triton X-100 (17, 27), dezoksycholan sodu (6), mielitynę, polimyksynę B (28), EDTA w określonych stężeniach (21).

Hamują reakcję hydrolizy: wolne kwasy tłuszczowe (6), jony Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Triton X-100 0,4% (14), dezoksycholan sodu w stężeniu $5 \times 10^{-4}M$, lizofosfolipidy (10), jodoocetan, ultrafiolet, wymrażanie i sonifikacja enzymu (4), siarczan dodecyłu, 2-chloroetanol (27), EDTA w stężeniu 1mM (11).

Wpływ detergentów na przebieg reakcji hydrolizy katalizowanej przez fosfolipazę A_2 zależy od stężenia detergentu w układzie inkubowanym, rodzaju tkanki z jakiej pochodzi enzym oraz substratu na jaki działa. Dezoksycholan sodu np. w tych samych stężeniach hamuje aktywność fosfolipazy gdy substratem jest GPC, nie wywiera natomiast takiego

wpływu gdy hydrolizie ulega GPE (14). Bardzo kontrowersyjny jest wpływ EDTA na działanie fosfolipazy A_2 , podobnie jak i jonów Ca^{2+} (33). Zdolność wiązania jonów Ca^{2+} przez EDTA nie jest przyczyną hamowania reakcji hydrolizy enzymatycznej. Fosfolipaza A_2 działa bardzo opornie na micelle sferyczne substratu jednakże wraz ze wzrastającym rozdrobnieniem fosfolipidu szybkość reakcji wzrasta osiągając maksimum w układach, w których uzyskano tak zwany film lipidowy tj. warstwę cząstek substratu na powierzchni buforu (33). Dodatek eteru etylowego zwiększa szybkość hydrolizy dzięki większemu rozdrobnieniu substratu, łatwiejszą penetrację enzymu do wnętrza cząstek oraz umożliwia swobodniejszy odpływ uwolnionych kwasów tłuszczowych (26). Peptydy stymulują działanie fosfolipaz A_2 prawdopodobnie przez tworzenie kompleksu z fosfolipidem (28). Enzym nie hydrolizuje D- α -fosfolipidów natomiast L- α -formy ulegają hydrolizie intensywnie. Symetryczne β -lecycyny ulegają rozłożeniu przez fosfolipazę A_2 na optycznie czynne lizolecycyny (34). Analogi lecycyny zawierające wiązanie acyloamidowe w pozycji β są potencjalnymi inhibitorami kompetycyjnymi fosfolipazy A_2 . Obecność jednej grupy metylowej przy atomie węgla przylegającym do grupy karboksylowej w łańcuchu kwasowym znacznie obniża szybkość maksymalną reakcji hydrolizy, wprowadzenie dwu grup metylowych daje lecycynę całkowicie odporną na działanie enzymu (35).

Fosfolipaza A_2 jest białkiem termostabilnym, ogrzewana w pH 3,0 w temperaturze 90°C przez 15 minut nie wykazuje zmian swej aktywności (21, 29). Dodatek kwasów tłuszczowych do ogrzewanego enzymu zwiększa jego oporność na wysoką temperaturę, natomiast poddanie dializie wydatnie ją zmniejsza (14). Inkubacja w temperaturze 80°C w pH powyżej 6,0 prowadzi do utraty własności katalitycznych, a proces ten zależy również od pH środowiska i czasu inkubacji (4).

Maksymalną aktywność fosfolipazy A_2 poszczególni autorzy obserwowali w środowisku o pH od 4,0 do 9,5 (5—31). Optymalna wartość pH środowiska zależy od rodzaju tkanki z jakiej pochodzi enzym. Ponadto rodzaj użytego buforu wyraźnie wpływa na aktywność fosfolipaz wyizolowanych z jądów (32).

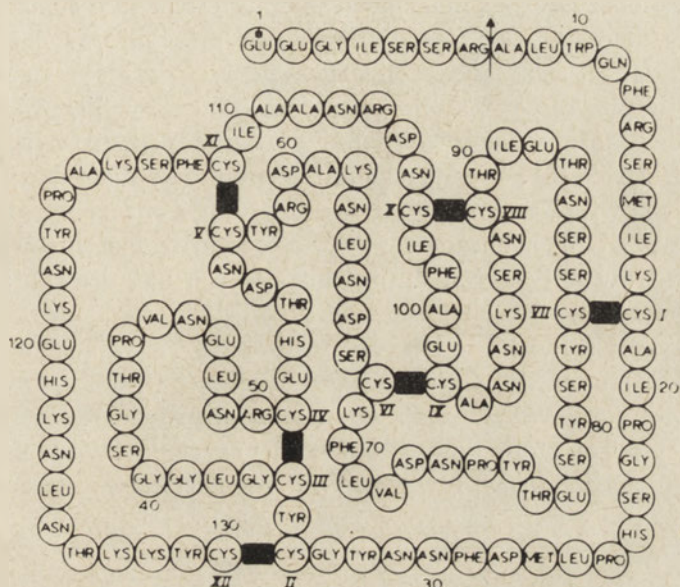
Dotychczas udało się wyizolować i określić w całości lub częściowo skład aminokwasowy fosfolipazy A_2 z trzech źródeł, a mianowicie z jadu pszczoł (36), trzustki wołowej (37), oraz jadu węża *Agkistrodon halays blankhoffi* (38). Enzymy te różnią się między sobą ilością i składem aminokwasów. I tak fosfolipaza pszczoła zbudowana jest z 128, trzustkowa ze 130, zaś wężowa z 126 aminokwasów (Ryc. 3 i 4).

Różnice ciężaru cząsteczkowego wynikają przede wszystkim z obecności w cząsteczce enzymu substancji dodatkowych związanych z enzymem np. fosfolipaza A_2 z trzustki zawiera dodatkowo siedmioaminokwasowy zymogen i ma ciężar 14 000, pszczoła zaś związane cukry: fukozę, mannozę, galaktozę i N-acetyloglukozaminy, a ciężar jej wynosi 20 000.

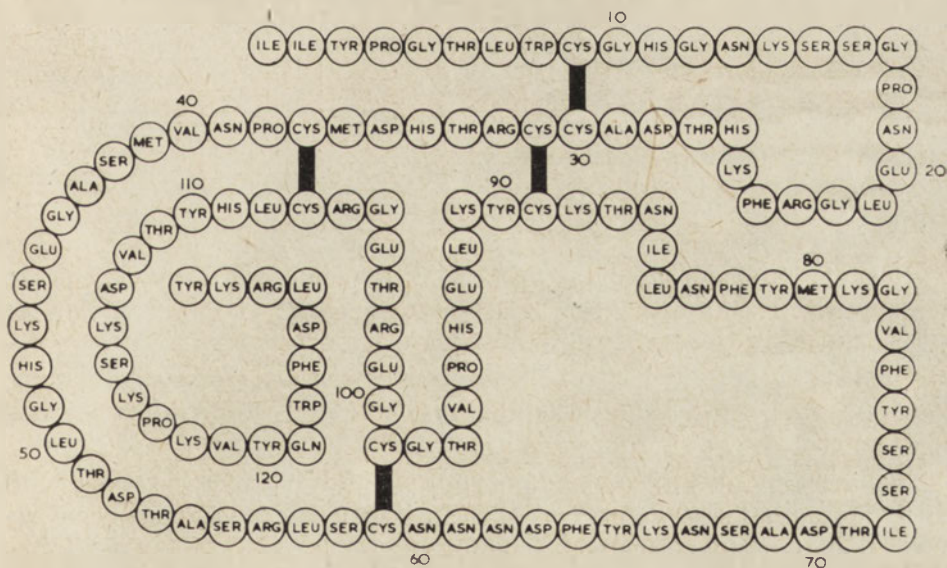
Ponadto fosfolipaza pszczoła może występować jako dimer o ciężarze 40 000.

Z jadu kobry *Naja naja* wyizolowano 11 izoenzymów fosfolipazy A_2 o ciężarach od 8500 do 20 000 i punktach izoelektrycznych od 4,62 do 9,9 (39).

Największą masą cząsteczkową charakteryzuje się fosfolipaza A_2 wyizolowana z mózgu ludzkiego, wynosi ona 55 000 (8).



Ryc. 3. Struktura I rzędowa fosfolipazy A_2 z trzustki wołu (37)



Ryc. 4. Struktura I rzędowa fosfolipazy A_2 z jadu pszczoł (36)

II. Fosfolipaza A₁

Fosfolipaza A₁ jest przypuszczalnie enzymem wyłącznie endogennym, nie stwierdzono jej bowiem w jadach węży, występuje natomiast w różnych tkankach zwierzęcych. Można znaleźć ją w czystej postaci we frakcjach mikrosomalnych (16, 19, 23), natomiast w błonach cytoplazmatycznych komórek wątroby (35), lizosomach wątroby (15, 21) i mózgu szczura (17), komórkach zwojów i neuronach królika (18), mikrosomach komórek larw muchy domowej (40) występuje łącznie z fosfolipazą A₂.

Fosfolipaza A₁ jest enzymem specyficznie odszczepiającym kwasy tłuszczowe z pozycji α fosfolipidów. Może także wykazywać działanie lizofosfolipazy katalizując uwalnianie kwasu z pozycji α -lizofosfolipidu (41). Przypisuje się jej również działanie podobne do fosfolipazy B tzn. katalizujące całkowitą deacylację fosfolipidów (42). Ponadto enzym ten może wykazywać działanie transacylazy. Stwierdzono w fosfolipazie A₁ istnienie dwu centrów aktywnych, które umożliwiają katalizowanie przez ten enzym reakcji hydrolizy i transacylacji (43).

Największą aktywność wykazuje fosfolipaza A₁ w stosunku do GPC w mniejszym stopniu do GPS i GPE (Tabela 2) (17). Enzym ten działa także na kwas fosfatydowy, 1,3-dwuacyloglicerol, 1-acyloglicerol oraz pochodne 1-acylizofosfolipidów. Stopień nienasycenia kwasu tłuszczowego w pozycji α substratu wpływa jedynie na szybkość katalizowanej reakcji (43).

Tabela 2

Wpływ rodzaju substratu na aktywność fosfolipazy A₁ z mózgu szczura (17)

Substrat	K _m (mM/l)	V (μ M/l/min)
dwuacylo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatydylocholina	0,60	5,0
dwuacylo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatydyloetanolamina	0,92	3,7
dwuacylo- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatydyloseryna	1,19	2,8

Reakcje katalizowane przez fosfolipazy A₁ podlegają stymulacji przez: dezoksychohan sodu (42), Triton X-100 (44), jony Ca²⁺ (41), taurochohan (8), EDTA oraz heparynę (45).

Hamują reakcję hydrolizy: nienasycone kwasy tłuszczowe, albuminy, NaCl, dezoksychohan sodu, protamina (44, 45), oraz temperatura powyżej 50°C (7).

Maksymalną aktywność tego enzymu stwierdzono w środowisku o pH od 3,5 do 9,0 (18—46). Optymalna wartość pH środowiska zależy od rodzaju tkanki z jakiej pochodzi enzym.

Fosfolipazy A₁ oczyszczono w różnym stopniu, jednakże w niewystar-

czającym dla określenia składu aminokwasowego oraz struktury tych enzymów. Stwierdzono przy tym iż w zależności od stopnia oczyszczenia zmienia się wrażliwość fosfolipazy A_1 na jony Ca^{2+} np. enzym oczyszczony z frakcji błon plazmatycznych wątroby szczura jest bardziej aktywny w nieobecności jonów Ca^{2+} niż jego forma nieoczyszczona. Dla fosfolipazy A_1 z innych tkanek brak podobnych danych.

Ze względu na zdolność fosfolipazy A_1 z błon plazmatycznych wątroby szczura do transacylowania zaproponowano dla niej nazwę monoacyloglicerotransferazy (41). Wykazano, iż akceptorami uwalnianych przez ten enzym kwasów tłuszczowych mogą być związki zawierające zarówno pierwszorzędowe jak i drugorzędowe grupy hydroksylowe np. glicerol czy też fosfoglicerol (43).

III. Lizofosfolipazy

Wiadomości na temat tych enzymów są dość skąpe, najczęściej opisywano te enzymy przy pracach nad fosfolipazami A. Znalaziono je we frakcjach rozpuszczalnych otrzymanych po rozwirowaniu struktur subkomórkowych (20), między innymi w trzustce (21) i mózgu szczura (47), wątrobie wołowej (48), komórkach larwy muchy domowej (40), erytrocytach wołu (12).

Lizofosfolipazy działają zarówno na 1-acylizopochodne fosfolipidów jak i na 2-acylizopochodne powodując ich całkowitą deacylację przy czym hydroliza 2-acylizopochodnych zachodzi znacznie szybciej niż 1-acylo (9).

Aktywność enzymu stymulują jony Ca^{2+} i siarczan laurylu (40). Hamują: EDTA, jony Hg^{2+} , Triton X-100, jodoctan (48), dezoksyholan (21). Optimum pH środowiska dla lizofosfolipaz z różnych tkanek mieści się między wartościami pH od 6,5 do 8,6 (9, 10, 48, 49).

Dotychczas wyizolowano dwie lizofosfolipazy z wątroby wołowej oznakowane roboczo jako lizofosfolipaza nr I i nr II. Masa cząsteczkowa tych enzymów i ich punkty izoelektryczne wynoszą odpowiednio: 25 000 i 5,2 oraz 60 000 i 4,5. Ponadto lizofosfolipazę nr I silnie hamują: jodoacetamid, N-etyloimid kwasu maleinowego, a także lecz słabiej p-nitrofenylofosforan. Lizofosfolipaza nr II wykazuje odwrotną odpowiedź na wyżej wymienione związki.

Obie lizofosfolipazy wykazują w niewielkim stopniu (2%) działanie charakteryzujące fosfolipazę A_1 (48).

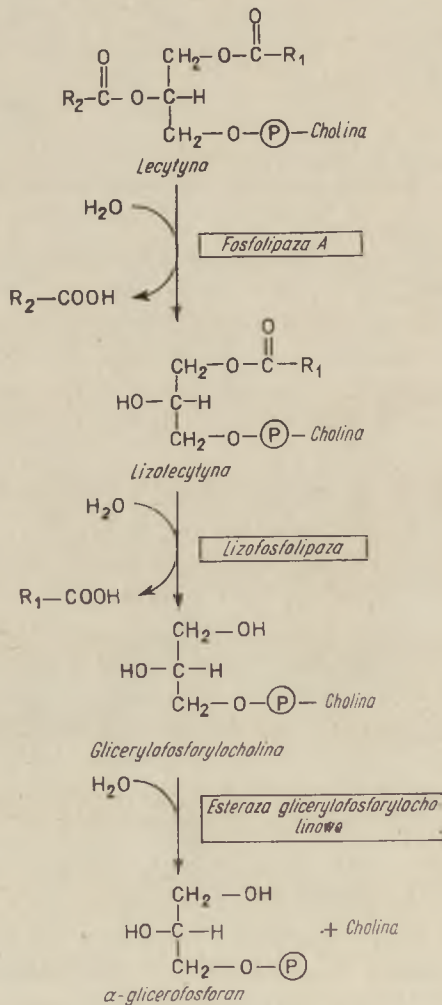
Lizofosfolipazy działają znacznie szybciej na filmy lipidowe niż micelle sferyczne (47). Hydrolizują również monoacylowe pochodne zawierające fosfocholinę w pozycji 1; 2 lub 3 glicerolu.

Ogrzewane w temperaturze $70^{\circ}C$ przez 10 minut tracą swe własności enzymatyczne (50).

IV. Uwagi końcowe — znaczenie biologiczne fosfolipaz zwierzęcych

Fosfolipazy obecne w większości jadów wężowych odgrywają ważną rolę w uśmiercaniu osobników zaatakowanych przez te zwierzęta. Lizo-pochodne fosfolipidów powstałe w wyniku działania fosfolipaz A_2 obecnych w jadach w połączeniu z jonami Ca^{2+} oraz albuminami surowicy, powodują gwałtowny rozpad błon erytrocytów (51). Uniemożliwia to prawidłową wymianę gazową w organizmie, prowadząc w końcowym rezultacie do szybkiej śmierci przez uduszenie.

Fosfolipazy w sokach trawiennych powodują rozkład fosfolipidów pokarmowych uwalniając kwasy tłuszczowe, z których kwasy o łańcuchach



Ryc. 5. Katabolizm fosfolipidów (na przykładzie lecytyny) w dwunastnicy ssaków (52)

krótszych niż 10—12 atomów węgla przenoszone są bezpośrednio do żyły wrotnej. Wyższe kwasy tłuszczowe przenoszone są przez ściany jelita cienkiego do limfy. Ponadto produkty rozpadu fosfolipidów posiadając właściwość zmniejszania napięcia powierzchniowego przyczyniają się do lepszego zemulgowania innych tłuszczowców pokarmowych (Ryc. 5) (52).

W celu określenia roli fosfolipidów w błonach komórkowych stosowano różne fosfolipazy ze względu na ich selektywne i łagodne działanie enzymatyczne pozwalające na całkowite odlipidowanie błon bez denaturacji białek strukturalnych. *In vitro* traktowane fosfolipazami retikulum sarkoplazmatyczne wskutek odtłuszczenia traci zdolność akumulacji jonów Ca^{2+} , następuje również rozprężenie aktywności ATP-azy stymulowanej wapniem (53). Znalaziono również korelację między działaniem fosfolipazy A_2 , a wrażliwością na temperaturę reduktazy i oksydazy cytochromu c (54). Ponadto fosfolipazy wpływają na aktywność cykazy adenylowej stymulowanej glukagonem. Przy niskich stężeniach fosfolipazy wzrasta wiązanie glukagonu przez cyklazę, przy wyższych stężeniach enzymu wyraźnie maleje (55). Ze względu na zdolność do transacylacji oraz obecność na zewnątrz błon komórkowych mogą fosfolipazy łącznie z innymi białkami wpływać na poziom wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy jak i ich ilość oraz okres półtrwania w błonach komórkowych (12, 41).

Próbowano również powiązać zmiany w aktywności fosfolipaz ze zmianami patologicznymi w organizmach zwierzęcych. Znalaziono korelację między ostrą formą stanu zapalnego trzustki człowieka, a aktywnością fosfolipazy A_2 w soku trzustkowym (6). Również w mózgu szczurów z doświadczalnie wywołaną alergiczną demielinizacją stwierdzono w ostrej formie tego schorzenia zwiększoną aktywność fosfolipazy A_1 o 35%, zaś A_2 o 25% niezależnie od rodzaju substratu na jaki działały (56).

Prowadzenie badań nad właściwościami fosfolipaz *in vitro* i *in vivo* napotyka szereg trudności. Ponadto dowolność kryteriów oceny aktywności tych enzymów oraz wpływu niektórych substancji na tę aktywność nie pozwalają na jednoznaczne porównanie uzyskanych wyników. Nie powiodły się również próby uogólnień, które zadowalająco tłumaczyłyby rolę i mechanizm działania tych enzymów w organizmach żywych.

Artykuł nadszedł 12.4.1975; po rewizji autorskiej otrzymano 20.8.1975

PIŚMIENNICTWO

1. Celmer W. D., Carter H. E. (1952), *Physiol. Rev.* **32**, 167—196.
2. Van Deenen L. L. M. (1964), w *Metabolism and Physiological Significance of Lipids*, red. Dawson R. M. C., Rhodes D. N. str. 155, J. Wiley and Sons Ltd, London.
3. Van Deenen L. L. M., De Haas G. H. (1966), *Ann. Rev. Biochem.* **35**, 157—194.

4. Marinetti G. V. (1965), *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 554—565.
5. Shipolini R. A., Callewaert G. L., Cottrel R. C., Doonan S., Vennon C. A., Banks B. E. C. (1971), *Eur. J. Biochem.* **20**, 459—468.
6. Zieve L. M. D., Vogel W. C. M. S. (1961), *J. Lab. Clin. Med.* **57**, 586—599.
7. Van Den Bosch H., Postema N. H., De Haas G. H., Van Deenen L. L. M. (1965), *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 657—659.
8. Cooper M. F., Webster G. R. (1972), *J. Neurochem.* **19**, 333—340.
9. Eisenberg S., Stein Y., Stein O. (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **164**, 205—214.
10. Kunze H., Nahars N., Wurl D. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **348**, 35—44.
11. Weglicki W. B., Waite M., Sisson P., Shonet S. B. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **231**, 512—519.
12. Zwaal R. F. A., Fluckiger R., Moser S., Zahler P. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **373**, 416—424.
13. Lloveras J., Douste-Blazy L. (1968), *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 157—162.
14. Rahman Y. E., Cerny E. A., Peraino C. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **321**, 526—535.
15. Lloveras J., Douste-Blazy L. (1973), *Eur. J. Biochem.* **33**, 567—577.
16. Waite M., Van Deenen L. L. M. (1967), *Biochim. Biophys. Acta* **137**, 498—517.
17. Woelk H., Porcellati G. (1973), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 90—100.
18. Woelk H., Goracci G., Gaiti A., Porcellati G. (1973), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 729—736.
19. Scherphof G. L., Waite M., Van Deenen L. L. M. (1966), *Biochim. Biophys. Acta* **125**, 406—409.
20. Victoria E. J., Van Golde L. M. G., Hostetler K. Y., Scherphof G. L., Van Deenen L. L. M. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **239**, 443—457.
21. Franon R., Waite M., La Via M. (1971), *Biochemistry* **10**, 1942—1946.
22. Zborowski J., Sarzała M. G. (1974), *Post. Biochem.* **20**, 21—34.
23. Woelk H., Kanig K., Peiler-Ichikawa K. (1974), *J. Neurochem.* **23**, 745—750.
24. Salach J. I., Seng R., Tisdale H., Singer T. P. (1971), *J. Biol. Chem.* **246**, 340—347.
25. Waite M., Sisson P. (1971), *Biochemistry* **10**, 2377—2383.
26. Dawson R. M. C. (1963), *Biochem. J.* **88**, 414—422.
27. Kramer R., Jungi B., Zahler P. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **373**, 404—415.
28. Mollay B. C., Kreil G. (1974), *FEBS Letters* **46**, 141—144.
29. Jennifer J. (1965), *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 128—136.
30. Dawson R. M. C. (1963), *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 697—699.
31. Wells M. A., Hanahan D. J. (1969), w *Methods in Enzymology* red. Colowick S. P., Kaplan N. O. **14** str. 172—184, Academic Press INC, London.
32. Magee W. L., Thompsom R. H. S. (1960), *Biochem. J.* **77**, 526—534.
33. De Haas G. H., Bonsen P. P. M., Pieterse W. A., Van Deenen L. L. M. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **239**, 252—266.
34. Van Deenen L. L. M., De Haas G. H. (1963), *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 538—555.
35. Bonsen P. P. M., De Haas G. H., Pieterse W. A., Van Deenen L. L. M. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **270**, 364—382.
36. Shipolini R. A., Doonan S., Vernon C. A. (1974), *Eur. J. Biochem.* **48**, 477—483.

37. De Haas G. H., Slotboom A. J., Bonsen P. P. M., Nieuwenhuizen W., Van Deenen L. L. M., Maraoux S., Dlouha V., Desnuelle P. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **221**, 417—420.
38. Samejima Y., Iwanaga S., Suzuki T., Kawanchi S. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **221**, 417—420.
39. Salach J. I., Turini P., Seng R., Hauber J., Singer T. P. (1971), *J. Biol. Chem.* **246**, 340—347.
40. Kumar S. S., Millay R. H., Bieber L. L. (1970), *Biochemistry* **9**, 754—759.
41. Waite M., Sisson P. (1973), *J. Biol. Chem.* **248**, 7985—7999.
42. Van Den Bosch H., Aarsham A. J., Van Deenen L. L. M. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **348**, 197—209.
43. Waite M., Sisson P. (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 6401—6405.
44. Gatt S., Barenholz Y. (1969), w *Methods in Enzymology* red. Colowick S. P., Kaplan N. O. **14** str. 167—170, Academic Press INC, London.
45. Waite M., Sisson P. (1973), *J. Biol. Chem.* **248**, 7201—7206.
46. Newkirk J. D., Waite M. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 562—576.
47. Leibowitz-Ben Gerschon Z., Kobilier J., Gatt S. (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 6840—6847.
48. De Jong I. G. N., Van Den Bosch H., Rijken D., Van Deenen L. L. M. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **369**, 50—63.
49. Erbland J. F., Marinetti G. V., (1965), *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 128—138.
50. Van Den Bosch H., Aarsham A. J., Slotboom A. J., Van Deenen L. L. M. (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **164**, 215—225.
51. Gul S., Smith A. D. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **367**, 271—281.
52. Harper H. A. (1972), *Zarys chemii fizjologicznej*, str. 343, PZWL.
53. Sarzała M. G. (1974), *Post. Biochem.* **20**, 403—424.
54. Wilschut J. C., Scherphof G. L. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **365**, 91—99.
55. Pohl S. L., Michiel H., Kraus J., Kozyreff V., Birnbaumer L., Rodbell M. (1971), *J. Biol. Chem.* **246**, 4447—4454.
56. Woelk H., Kanig K. (1974), *J. Neurochem.* **23**, 739—743.

KOMUNIKAT

ZARZĄDU GŁÓWNEGO

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego postanowił nazwać dorocznie przyznawane nagrody dla młodych biochemików imieniem zmarłego w 1975 r. wybitnego biochemika i zasłużonego wychowawcy młodzieży, prof. dr. Włodzimierza Mozołowskiego.

Za najlepsze prace przedstawione przez młodych biochemików na XIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, który odbył się we wrześniu 1975 r. w Toruniu Zarząd Główny Towarzystwa postanowił przyznać trzy równorzędne nagrody pierwsze oraz dziewięć równorzędnych nagród drugich. Laureatami zostali:

I. nagrody pierwsze:

- 1) Andrzej Guranowski (wraz ze współautorem Zenonem Schneide-rem, Poznań)
- 2) Ryszard Słomski (Poznań)
- 3) W. Kudlicki (wraz ze współautorem N. Grankowskim, Lublin)

II. nagrody drugie:

- 1) A. Dubin (wraz ze współautorem J. Silberringiem, Kraków)
- 2) Anna Szkopińska (Warszawa)
- 3) Wiesław Wątopek (Wrocław)
- 4) Piotr Ścisłowski (wraz ze współautorem J. Świerczyńskim, Gdańsk)
- 5) W. Sasak (wraz ze współautorem T. Mańkowskim, Warszawa)
- 6) Małgorzata Landman (wraz ze współautorkami B. Grzelakowską-Sztabert i W. Chmurzyńską, Warszawa)
- 7) M. Michalak (wraz ze współautorką M. G. Sarzałą, Warszawa)
- 8) B. Kowalska-Loth (wraz ze współautorem T. Kureckim, Warszawa)
- 9) A. Stankiewicz (wraz ze współautorem W. Makarewiczem, Gdańsk)

EWA PRÓCHNIEWICZ *

Fizykochemiczne właściwości aktyny i jej rola w skurczu mięśnia

Physicochemical Properties of Actin and its Role in Muscular Contraction

W poprzednich numerach *Postępów Biochemii* (1, 2) zostały zamieszczone artykuły przeglądowe, dotyczące budowy mięśni szkieletowych kręgowców oraz molekularnego mechanizmu regulacji ich skurczu. W niniejszym artykule chciałabym bliżej scharakteryzować jedno ze strukturalnych białek mięśniowych — aktynę — zarówno jej fizykochemiczne właściwości jak i przypisywaną jej rolę w procesie skurczu.

Aktyna została po raz pierwszy wyizolowana z mięśni poprzecznie prążkowanych kręgowców przez Strauba w 1942 r. (3); stanowi ona około 12% wszystkich białek w tych mięśniach. *In vitro* aktyna może występować w postaci globularnej monomerycznej G-aktyny, lub tworzyć włókniste polimery — w tej formie nosi nazwę F-aktyny.

I. Ogólna charakterystyka G-aktyny

G-aktyna jest białkiem globularnym, o ciężarze cząsteczkowym 42.300 zbudowanym z jednego łańcucha polipeptydowego o znanej sekwencji (4). Pozostałe parametry, charakteryzujące fizykochemiczne właściwości monomerów są następujące:

promień cząsteczki	55 Å	(5, 13)
lepkość graniczna	0,036 dl/g	(6)
objętość cząstkowa	0,716	(7)
stała sedymentacji	3,385S	(8)
punkt izoelektryczny	pH = 4,6	(3)
ładunek elektryczny w pH = 7,5	-20	(9)
moment dipolowy	660 jedn. Debye	(10)

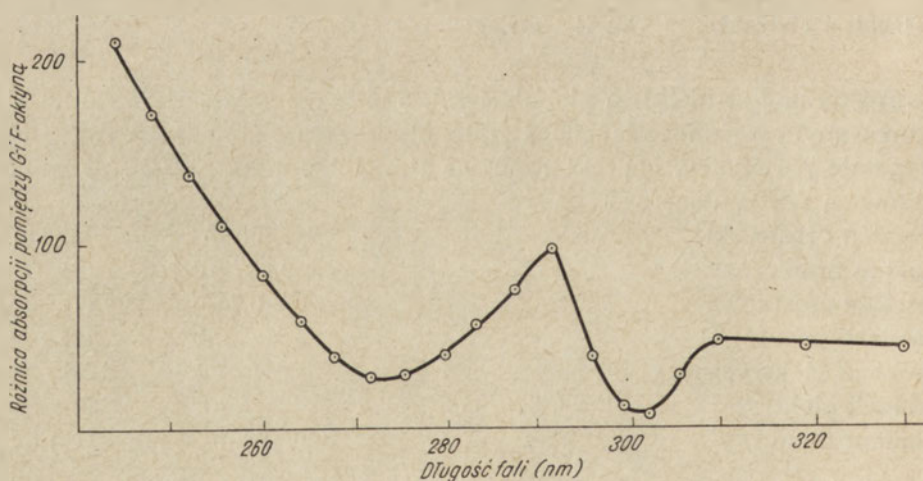
* Dr, Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Cząsteczki rodzimej G-aktyny zawierają związany nukleotyd—ATP w ilości 1 mola na mol białka, nieusuwalny przez krótkotrwałe wytrząsanie z wymienniczym anionowym Dowex-1, ale wymienialny z wolnym ATP, a także zastępowany przez inne nukleotydy (11). W preparatach aktyny znajduje się ponadto Ca^{2+} , związany z białkiem również w ilości 1 mola na mol aktyny, nieusuwalny przez krótkotrwałe wytrząsanie z wymienniczym kationowym Dowex-50, ale wymieniający się z wolnym Ca^{2+} oraz zastępowany przez inne kationy dwuwartościowe w stopniu zależnym od stężenia i rodzaju dodanego Me^{2+} (12). Usunięcie Ca^{2+} i ATP z G-aktyny powoduje nieodwracalną denaturację białka.

II. Polimeryzacja. Własności F-aktyny

Pod wpływem dodanych soli monomeryczna G-aktyna ulega polimeryzacji (zwanej także transformacją G—F) (3) do F-aktyny. Otrzymane po raz pierwszy w 1963 roku przez Hanson i Lowy (13) zdjęcia negatywowo barwionych preparatów spolimeryzowanego białka wykazały, że F-aktyna tworzy długie filamenty zbudowane z dwóch spiralnie wokół siebie skręconych sznurów cząsteczek G-aktyny. Polimeryzacji towarzyszy wzrost lepkości i podwójnego załamania prądowego (dwójłomności strumieniowej) roztworu białka (3). F-aktyna w roztworze wykazuje ponadto własność dwójłomności elektrycznej, spowodowanej istnieniem momentu dipolowego filamentów (10).

Jednocześnie ze zmianami stanu fizykochemicznego pojawiają się zmiany własności spektralnych białka. Na rycinie 1 przedstawiono przykładowo



Ryc. 1. Różnica pomiędzy widmami absorpcji G- i F-aktyny w ultrafiolecie

Widmo otrzymano przy stężeniu białka 3,5 mg/ml, w obecności 20 mM KCl i 5 mM buforu Tris-HCl o pH 8,2 (19).

wo różnicę pomiędzy widmami absorpcji G- i F-aktyny w ultrafiolecie. W zakresie długości fal od 270 do 310 nm różnica ta wydaje się być wywołana zmianami stopnia ekspozycji reszt tryptofanu i tyrozyny zachodzącymi przy polimeryzacji (14, 19). Widma fluorescencji G- i F-aktyny również się różnią: natężenie fluorescencji tryptofanu w F-aktynie obniża się o około 10%, natomiast tyrozyny wzrasta o około 15%, w stosunku do obserwowanych w G-aktynie (15). Jak wskazują autorzy cytowanych prac, obserwowane zmiany spektralne mogą być wynikiem zmian konformacyjnych zachodzących w polimeryzujących cząsteczkach białkowych w pobliżu aminokwasów aromatycznych i (lub) ich udziału w tworzeniu wiązań pomiędzy monomerami.

Podczas polimeryzacji, ATP silnie związany z G-aktyną ulega hydrolizie z uwolnieniem nieorganicznego fosforanu do środowiska. W wyniku tego F-aktyna zawiera ADP jako silnie związany nukleotyd. Dalsze badania wykazały, że defosforylacja nie jest jednak koniecznym warunkiem polimeryzacji (16, 17).

W F-aktynie procesy uwalniania i wymiany silnie związanych kationu i nukleotydu zachodzą znacznie wolniej niż w G-aktynie, ponadto ani kation, ani nukleotyd nie są konieczne do zachowania struktury polimeru F-aktynowego oraz nie biorą udziału w połączeniach pomiędzy monomerami (17, 18, 19).

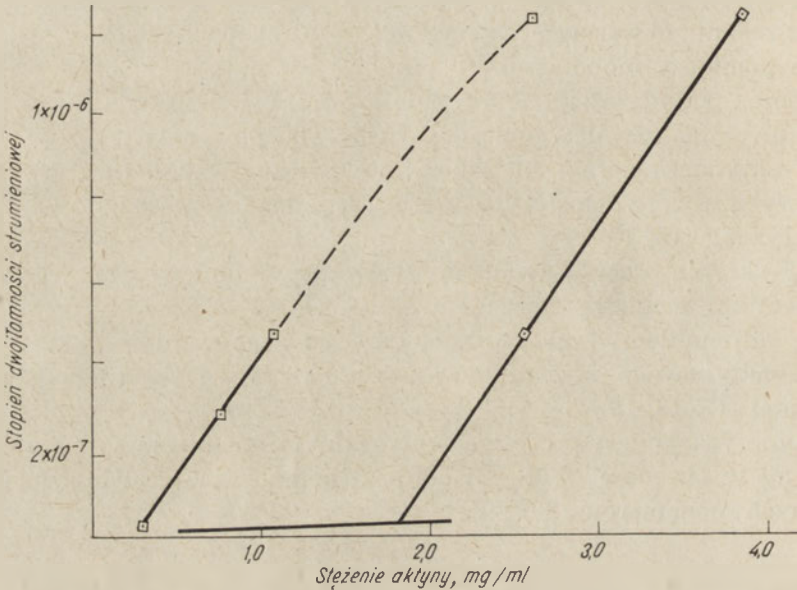
Polimeryzacja jest procesem odwracalnym; usunięcie soli z roztworu F-aktyny w obecności ATP powoduje depolimeryzację białka do postaci rodzimych monomerów (20).

III. Badania mechanizmu polimeryzacji

Od czasu odkrycia zjawiska polimeryzacji aktyny w szeregu pracowni badano mechanizm tego procesu.

Już z wczesnych obserwacji wynikało, że stopień spolimeryzowania aktyny zależy od warunków środowiskowych. W stanie tzw. częściowej polimeryzacji, występującym przy stężeniach soli niższych niż wymagane do wywołania pełnej polimeryzacji, tylko część znajdujących się w roztworze cząsteczek aktyny jest w formie F; poziom równowagi nie zależy przy tym od tego, czy sole były dodane do roztworu G-aktyny, czy też doprowadzono do takich samych warunków jonowych roztwór uprzednio w pełni spolimeryzowanego białka przez odpowiednie rozcieńczenie. Badając własności częściowo spolimeryzowanych roztworów aktyny A s a k u r a i wsp. (21) wykazali, że w takich roztworach w obecności wolnego ATP ma miejsce przebiegające powoli, ciągle uwalnianie nieorganicznego fosforanu. Ich zdaniem ciągle uwalnianie fosforanu mogło być spowodowane zachodzącymi cyklicznie i z jednakową szybkością procesami przyłączania i odłączania monomerów od pozostających z nimi

w równowadze polimerów: w czasie każdego cyklu ADP, związane z odłączanymi monomerami ADP-G-aktywy wymieniałyby się z wolnym ATP, znajdującym się w roztworze, po czym następowałoby uwolnienie fosforanu w trakcie ponownego tworzenia połączenia pomiędzy monomerem powstałej ATP-G-aktywy a polimerem. Późniejsze badania (22, 23) potwierdziły tę hipotezę i wykazały ponadto, że cykl odłączania i przyłączania monomerów do F-aktywy może zachodzić tylko na końcach polimeru.



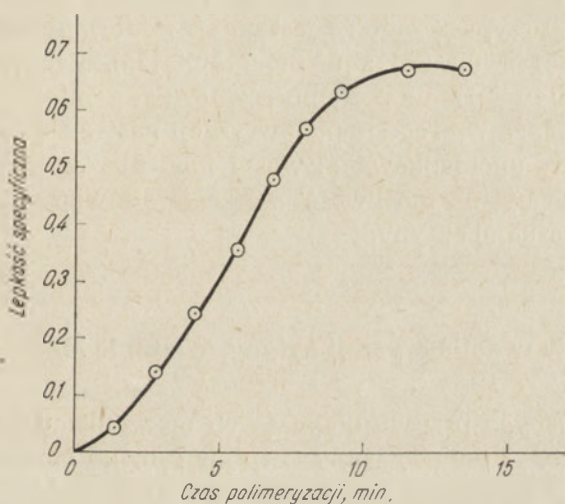
Ryc. 2. Zależność pomiędzy ilością spolimeryzowanej aktyny, oznaczaną metodą pomiaru stopnia dwójłomności strumieniowej roztworu białka, a całkowitym stężeniem aktyny.

Pomiary wykonano w 18°C w obecności 0,01M buforu weronalowego o pH 8 i: ◊ 0,1 mM MgCl₂, □ 0,6 mM MgCl₂ (21).

Duże zasługi w poznaniu fizykochemicznych własności transformacji G-F położyli O o s a w a, A s a k u r a, K a s a i, H i g a s h i, O o i, M i h a s h i, którzy opublikowali szereg prac doświadczalnych i teoretycznych dotyczących tego zagadnienia. Autorzy ci już w swoich wczesnych pracach (21, 24) zauważyli, że w warunkach częściowej polimeryzacji poziom równowagi pomiędzy G- i F-aktywą zależy od stężenia białka. Rycina 2 ilustruje wyniki przeprowadzonych przez nich pomiarów końcowych wartości stopnia dwójłomności strumieniowej szeregu roztworów aktyny o wzrastających stężeniach białka po dodaniu MgCl₂. Widoczne jest, że polimeryzacja (i wywołany tym wzrost stopnia dwójłomności) zaczyna się dopiero wtedy, gdy stężenie aktyny przekroczy pewną wartość, zwaną stężeniem krytycznym. Przy dalszym wzroście stężenia wzrasta tylko ilość F-aktywy, natomiast stężenie pozostającego z nią w równowadze biał-

ka niespolimeryzowanego pozostaje stałe i równe wielkości krytycznej. Zaobserwowano również, że wielkość stężenia krytycznego zależy od warunków jonowych i obniża się ze wzrostem stężenia soli. W oparciu o uzyskane wyniki szkoła Oosawy wysunęła hipotezę, że polimeryzacja jest procesem wykazującym własności przemiany fazowej typu kondensacji lub krystalizacji. Na podobieństwo transformacji G-F do przemiany fazowej wskazywały ponadto wyniki badań wpływu temperatury na poziom równowagi pomiędzy G- i F-aktyną: stężenie krytyczne A_k zmieniało się w zależności od temperatury T zgodnie z równaniem Clausiusa-Clapeyrona: $\ln A_k = a - b/T$ (25) (a i b — stałe współczynniki).

Wysunięta przez szkołę Oosawy hipoteza, że polimeryzacja jest rodzajem przemiany fazowej została dalej potwierdzona wynikami badań kinetycznych, w których obserwowano zarówno sigmoidalny kształt krzywych przebiegu polimeryzacji w czasie, charakterystyczny dla procesów kooperatywnych (Ryc. 3),



Ryc. 3. Kinetyka polimeryzacji aktyny. Przebieg polimeryzacji badano mierząc zmiany lepkości roztworu białka po dodaniu soli

Pomiary wykonano przy stężeniu białka 0,82 mg/ml, w 21,9°C, w obecności 6,7 mM buforu fosforanowego o pH 7, 0,05mM ATP i 3mM cysteiny (60).

jak też zależność szybkości polimeryzacji od stężenia białka (26). Na podstawie tych wyników Kasa i wsp. (26) wysunęli przypuszczenie, że proces polimeryzacji jest przynajmniej dwuetapowy: w pierwszym etapie powstają oligomery zbudowane z trzech monomerów, nazwane zarodkami, a dopiero w drugim etapie do tych trimerów przyłączają się dalsze monomery, powodując wzrost spirali F-aktyny. W oparciu o uzyskane dane doświadczalne Oosawa i wsp. (27, 28) przedstawili ogólną teorię agregacji globularnych cząsteczek białkowych w wysoce uporządkowane,

włókniste struktury. Wyprowadzając w niej równanie opisujące obserwowaną zależność stanu równowagi od stężenia białka i przebieg kinetyczny transformacji G-F uzasadnili zarówno występowanie stężenia krytycznego, jak i sigmoidalny kształt krzywej przebiegu polimeryzacji mechanizmem wzrostu spiralnego polimeru na uprzednio utworzonych zarodkach o specjalnej konformacji.

IV. Termodynamika polimeryzacji

Uwzględniając zależność poziomu równowagi pomiędzy G i F-aktyną od temperatury obliczono zmianę entalpii towarzyszącą polimeryzacji; osiągała ona wielkość rzędu 10 kcal/mol, niezależnie od stężenia soli, białka i pH środowiska (29, 30). Ponieważ polimeryzacja jest reakcją zachodzącą spontanicznie, w której zmiana swobodnej energii $\Delta F = \Delta H - T\Delta S < 0$, wydawało się, że transformacji G—F powinien towarzyszyć wzrost entropii. Przypuszczano że jest on spowodowany uwalnianiem wody hydratacyjnej związanej z monomerami (25). Zaobserwowane przy wzroście ciśnienia obniżenie poziomu równowagi pomiędzy G- i F-aktyną sugeruje również, że w procesie polimeryzacji następuje pewnego rodzaju „topnienie” wody uporządkowanej wokół monomerów (31). Tego rodzaju obserwacje wskazują na możliwość tworzenia się wiązań hydrofobowych pomiędzy cząsteczkami aktyny.

V. Rola kationów w polimeryzacji aktyny. Wiązanie Me^{2+} przez aktynę

Już we wczesnych pracach dotyczących mechanizmu polimeryzacji (3, 9) przypuszczano, że polimeryzujący wpływ soli lub obniżenia pH na aktynę może być wynikiem wiązania kationów przez to białko. Sądzono, że związane kationy neutralizując ujemny ładunek białka powodują zmniejszenie sił elektrostatycznego odpychania pomiędzy monomerami, co ułatwia zbliżanie i agregację cząsteczek G-aktyny.

Badania nad wiązaniem Ca^{2+} , Mg^{2+} i Mn^{2+} wykazały, że kationy te, oprócz jednego miejsca silnego wiązania o stałej powinowactwa rzędu 10^5 , mają jeszcze 7—10 miejsc wiążących Me^{2+} ze stałą rzędu 10^8 (9, 21, 32). Zaobserwowana (9, 32) została również bezpośrednia zależność pomiędzy ilością związanych kationów a poziomem polimeryzacji. Ilość F-aktyny powstającej po dodaniu Ca^{2+} , Mg^{2+} lub Mn^{2+} gwałtownie wzrastała kiedy ilość związanych kationów osiągała wartości 4—5 moli na 6×10^4 g białka, a po związaniu 7—8 moli obserwowano już całkowitą polimeryzację. Nie obserwowano przy tym różnicy pomiędzy ilością kationów wiązanych w warunkach częściowej polimeryzacji do G- i F-aktyny, co sugeruje, że do

utworzenia F-aktyny nie jest konieczne związanie przez wchodzące w jej skład monomery określonej liczby kationów.

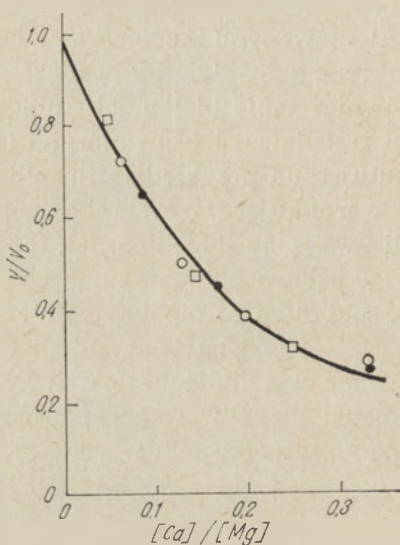
Zależność pomiędzy zdolnością cząsteczek aktyny do polimeryzacji a ich strukturą chemiczną i przestrzenną wskazuje, że neutralizacja ładunku białka poprzez związane kationy jest tylko jednym z czynników istotnych w procesie powstawania filamentów F-aktyny. Barańy i wsp. (33) sugerowali, że sama polimeryzacja jest wynikiem specyficznych oddziaływań pomiędzy zneutralizowanymi w odpowiednich miejscach i odpowiednio względem siebie zorientowanymi monomerami. Spiralne polimery zbudowane podobnie jak aktyna z dużej liczby powiązanych niekowalencyjnie monomerów tworzą również takie białka jak tubulina, flagellina, białka otoczki wirusa mozaiki tytoniowej i tropomiozyna (34, 35, 36, 37). Gerber i wsp. (36) dyskutując na przykładzie flagelliny oddziaływania pomiędzy monomerami, warunkujące powstanie uporządkowanych spiralnych struktur, zwrócili uwagę, że flagellina, jak też kilka innych, przytoczonych przez nich przykładowo polimeryzujących białek — w tym również aktyna — mają wysoki moment dipolowy, który w wyniku polimeryzacji ulega obniżeniu. Na tej podstawie wysunęli oni przypuszczenie, że moment dipolowy może być czynnikiem, który w procesie tworzenia agregatu o określonej symetrii umożliwia monomerom przyjęcie właściwej wzajemnej orientacji przed utworzeniem wiązań.

VI. Wpływ kationów dwuwartościowych na szybkość polimeryzacji aktyny

Szybkość polimeryzacji aktyny wzrasta ze stężeniem dodanej soli oraz wykazuje wyraźną zależność od rodzaju dodanego kationu, np. jest większa w obecności $MgCl_2$, niż dodanego w tym samym stężeniu $CaCl_2$ (3, 38, 39). Na rycinie 4 przedstawiono przykładowo wyniki jednego z doświadczeń dotyczących badania wpływu warunków jonowych na szybkość polimeryzacji aktyny. Widoczne jest, że początkowa szybkość transformacji G—F mierzona przy stałym stężeniu KCl i zmiennym stosunku stężeń jednocześnie dodanych do białka $CaCl_2$ i $MgCl_2$ maleje ze wzrostem stężenia $CaCl_2$.

Obserwacje te nasunęły przypuszczenie (26, 38, 39, 40), że istotny wpływ na szybkość polimeryzacji może mieć rodzaj silnie związanego z aktyną kationu, co z kolei sugerowało zależność własności strukturalnych monomerów aktyny od rodzaju związanego kationu. Na możliwość wpływu silnie związanego Me^{2+} na strukturę aktyny wskazywały również zmiany reaktywności grup SH białka pod wpływem różnych kationów, jak też różnice szybkości zmian spektralnych towarzyszących denaturacji preparatów aktyny mających jako silnie związane Ca^{2+} , Mg^{2+} lub Mn^{2+} (41, 42). Jak dotychczas, nie wykazano jednak różnic we własnościach spektralnych preparatów rodzimej aktyny zawierających różne Me^{2+} w miejscu silnego

wiązania (14, 15, 43). Szybkość polimeryzacji zależna jest nie tylko od rodzaju silnie związanego kationu, ale także od rodzaju związanego nukleotydu, chociaż, podobnie jak w przypadku preparatów aktywy mających różne rodzaje silnie związanego Me^{2+} , nie zauważono zależności pomiędzy widmami absorpcji w ultrafiolecie a rodzajem związanego nukleotydu (14, 44).



Ryc. 4. Zależność początkowej szybkości polimeryzacji aktywy od stosunku stężeń dodanych łącznie do białka $CaCl_2$ i $MgCl_2$

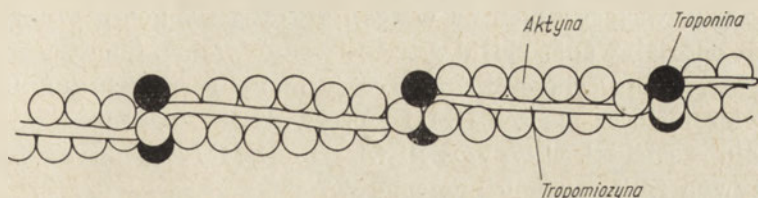
Na osi odciętych wskazano stosunek stężeń dodanych $MeCl_2$, Ca/Mg , na osi rzędnych — stosunek szybkości polimeryzacji aktywy, v , otrzymanej przy danej wartości Ca/Mg , do szybkości polimeryzacji otrzymanej w obecności samego $MgCl_2$, v_0 . Pomiar wykonano w $18^\circ C$, w obecności $0,015M$ buforu Tris-HCl o pH 8,3 oraz: —o—o— stężeniu aktywy $2,3mg/ml$, $3mM$ $MgCl_2$ i $0,1M$ HCl; —o—o— stężeniu aktywy $2,3$ mg/ml , $0,1M$ KCl, $1,2$ mM $MgCl_2$; —□—□— stężeniu aktywy $2mg/ml$, $0,06M$ KCl, $2mM$ $MgCl_2$ (26).

Pod wpływem wysokich stężeń soli G-aktyna ulega wytrąceniu. Zjawisko to tłumaczono wzrostem ilości związanych z nią kationów aż do całkowitej neutralizacji ujemnego ładunku białka (9, 33, 45). Wytrącona aktyna tworzy stabilną, mleczno-białą zawiesinę. Wytrąceniu ulega także F-aktyna. Badania w mikroskopie elektronowym wykazały, że tworzy ona wówczas parakryształy, w których filamenty są ułożone bądź równolegle względem siebie, bądź w romboidalne sieci; rodzaj powstałych parakryształów zależy od rodzaju i stężenia dodanego do danej soli (46, 47, 48).

Jak wynika z przytoczonych danych, zmiany stanu fizykochemicznego aktywy są wynikiem złożonych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami białka, jonami dodanych soli i cząsteczkami rozpuszczalnika, jednak mechanizm tych zmian nie został, jak dotychczas, w pełni wyjaśniony.

VII. Biologiczna rola aktyny

In vivo aktyna występuje wyłącznie w formie spolimeryzowanej tworząc razem z tzw. białkami regulującymi — troponiną i tropomiozyną — cienkie filamenty mięśnia (Ryc. 5).



Ryc. 5. Lokalizacja troponiny i tropomiozyny w cienkich filamentach mięśnia

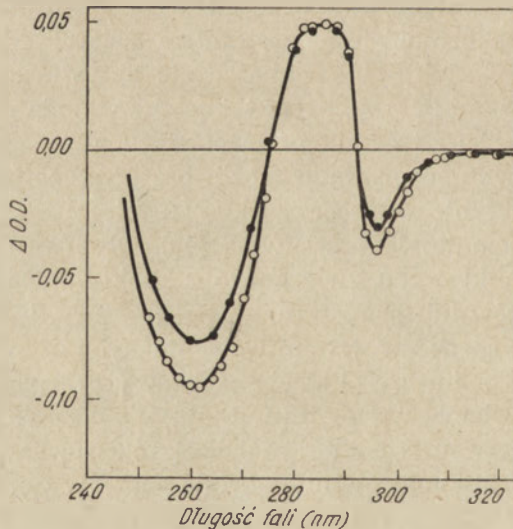
Widoczny jest tu wyraźnie spiralny fragment F-aktyny, zbudowanej z globularnych monomerów G-aktyny (59).

Najogólniej biorąc, jej biologiczna rola polega na aktywacji miozyny, zlokalizowanej w tzw. grubych filamentach i oddziaływaniu z nią w procesie skurczu mięśnia. Zgodnie z panującymi obecnie poglądami (obszerniej omówionymi w cytowanej już przeglądowej pracy (2), sygnałem do rozpoczęcia skurczu mięśnia jest uwolnienie jonów wapnia z błon sarkoplazmatycznego retikulum. Uwolniony Ca^{2+} wiąże się z troponiną, co wywołuje przesunięcia nici tropomiozynowo-troponinowych znajdujących się w rowkach spirali F-aktyny, umożliwiające wystąpienie oddziaływania pomiędzy aktyną i miozyną, a w konsekwencji skurcz. Dla wyjaśnienia roli F-aktyny w skurczu istotne jest zatem scharakteryzowanie wpływu zarówno miozyny — lub jej enzymatycznie aktywnego fragmentu, tzw. ciężkiej meromiozyny (HMM) — jak też jonów wapnia na własności F-aktyny i jej kompleksu z troponiną i tropomiozyną.

Już dosyć dawno sugerowano możliwość występowania zmian strukturalnych w F-aktynie w procesie skurczu, kiedy filamenty miozynowe i aktynowe wzajemnie się przesuwają (49). Obserwowany wzrost szybkości wymiany nukleotydu związanego z F-aktyną pod wpływem działania ultradźwięków lub podwyższonej temperatury, interpretowany jako wynik zachodzących pod wpływem wspomnianych czynników zmian konformacyjnych w polimerze, stał się podstawą przypuszczenia, że badanie szybkości wymiany nukleotydu w F-aktynie podczas jej oddziaływania z miozyną dostarczy informacji o zachodzących wówczas zmianach struktury polimeru. W kilkunastoletnim okresie badań w tym kierunku uzyskiwano jednak sprzeczne wyniki i dopiero ostatnio udało się ustalić przyczynę dotychczasowych rozbieżności oraz jednoznacznie wykazać, że oddziaływanie aktyny z miozyną nie prowadzi do zmiany wymienialności związanego z F-aktyną nukleotydu (50). Są jednak innego rodzaju wskazówki, że miozyna wywiera wpływ na własności F-aktyny. Zostały np.

zaobserwowane zmiany widma absorpcji F-aktyny w ultrafiolecie w obecności HMM, mające charakter podobny do zachodzących przy depolimeryzacji (14). Przeprowadzone później (51) badania hydrodynamiczne sugerowały, że HMM, wiążąc się z F-aktyną, może powodować pewne rozluźnienie wiązań pomiędzy monomerami. Podobne przypuszczenia zostały wysunięte również na podstawie wyników badań rozpraszania światła laserowego (52), wskazujących na wzrost giętkości filamentu F-aktyny pod wpływem oddziaływania z HMM. Obserwacje widma fluorescencji połączonej z F-aktyną pochodnej fluoresceiny (53) sugerują, że już niewielka liczba związanych cząsteczek HMM może wpływać jednocześnie na własności wielu cząsteczek aktyny, czyli wiązanie HMM z F-aktyną wywołuje kooperatywną zmianę stanu monomerów.

Własności F-aktyny tworzącej *in vitro* kompleks z troponiną i tropomiozyną ulegają podobnym do wspomnianych wyżej zmian, z tym że warunkiem ich wystąpienia staje się obecność jonów wapnia w środowisku. Badania przeprowadzone zarówno przy użyciu znaczników spinowych (54), jak i fluoryzujących (55) związanych z F-aktyną wskazywały również, że stan F-aktyny w cienkim filamencie zależy od obecności Ca^{2+} . Doświadczenia wykonane metodą rozpraszania światła laserowego (52) pozwoliły na wysunięcie przypuszczenia, że wapń w stężeniach wystarczających do aktywacji skurczu mięśnia zwiększa stopień elastyczności cienkiego filamentu. Później zaobserwowano w tym samym laboratorium odwracalne zmiany, zachodzące w widmach liniowego dichroizmu kompleksu F-aktyny



Ryc. 6. Wpływ jonów wapnia na widmo dichroizmu liniowego kompleksu F-aktyny z troponiną i tropomiozyną z mięśni szkieletowych królika

Widmo otrzymano w temperaturze pokojowej w obecności: —○— 150mM KCl, 2mM MgCl₂, 10mM buforu histydynowego o pH 7 i 1mM EGTA; —●— 150mM KCl, 2mM MgCl₂, 10mM buforu histydynowego o pH 7 i buforu Ca/EGTA o pCa = 5. (56).

z troponiną i tropomiozyną po dodaniu Ca^{2+} (56) (Ryc. 6). Zmiany te zinterpretowano, zgodnie z wyżej cytowanym przypuszczeniem (52), jako następstwo osłabienia wiązań pomiędzy monomerami oraz zwiększenia fluktuacji orientacji monomerów względem osi polimeru po związaniu Ca^{2+} do troponiny.

Cytowane wyniki badań wskazują na aktywną rolę, jaką spełnia aktyna w skurczu mięśnia. Wysłunięto ostatnio pogląd, że istotne znaczenie w tym procesie może mieć wzrost elastyczności cienkiego filamentu zachodzący, jak wspomniano, pod wpływem wiązania Ca^{2+} do troponiny (57). Ponieważ występuje zależność pomiędzy wielkością napięcia mięśnia, a stopniem zachodzenia na siebie cienkich i grubych filamentów oraz odległością pomiędzy nimi (58), zmiany elastyczności cienkiego filamentu w warunkach aktywacji skurczu mogą prowadzić do zmniejszenia odległości pomiędzy filamentami i tym samym ułatwiać bezpośrednie oddziaływanie aktyny z miozyną. Jednakże rola F-aktyny w skurczu — szczególnie zależność pomiędzy jej strukturą i funkcją — nie są jeszcze w pełni znane i w dalszym ciągu stanowią przedmiot badań.

Ze względu na to, że z włóknistych polimerów białkowych składają się również pewne elementy innych niż mięsień systemów ruchowych, np. wici bakterii są wieloniciowymi polimerami cząsteczek białka flagelliny, mikrotubule wchodzące w skład wici, rzęsek, aksostyli i wrzeciona podziałowego komórek są polimerami tubuliny — poznanie własności tego typu polimerów jest istotne w badaniach mechanizmu ruchu.

Artykuł nadszedł 28.7.1975; po rewizji autorskiej otrzymano 19.9.1975

PIŚMIENNICTWO

1. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 405—420.
2. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 343—359.
3. Straub F. B., (1942), *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, **2**, 3—15.
4. Elzinga M., Collins J. H., Kuehl M. M., Adelstein R. S., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 2687—2691.
5. Sakakibara J., Yagi K., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **207**, 178—183.
6. Grant R. J., Cohen S. J., L. B., Clark E. E., Hayashi T., (1964), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 314—318.
7. Lewis M. S., Maruyama K., Carroll R. W., Kominz D. R., Laki K., (1963), *Biochemistry*, **2**, 34—39.
8. Tsuboi K. K., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **160**, 420—434.
9. Martonosi A., Molino C. M., Gergely J., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 1057—1064.
10. Minakata A., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **126**, 570—577.
11. Martonosi A., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 163—165.
12. Strzelecka-Golaszewska H., Drabikowski W., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **162**, 581—595.
13. Hanson J., Lowy J., (1963), *J. Mol. Biol.*, **6**, 46—60.
14. Higashi S., Oosawa F., (1965), *J. Mol. Biol.*, **12**, 843—865.
15. Lehrer S. S., Kerwar G., (1972), *Biochemistry*, **11**, 1211—1217.

16. Hayashi T., Rosenbluth R., (1960), *Biol. Bull.* **119**, 294.
17. Kasai M., Nakano E., Oosawa F., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **94**, 494—503.
18. Kitagawa S., Drabikowski W., Gergely J., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 706—714.
19. Oosawa F., Asakura S., Higashi S., Kasai M., Kobayashi S., Nakano E., Ohnishi T., Taniguchi M., (1965), w *Molecular Biology of Muscular Contraction*, wyd. przez S. Ebashi, F. Oosawa, T. Sekino, Y. Tonomura, Igaku Shoin Ltd, 56—76.
20. Straub F. B., Feuer G., (1950), *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 455—470.
21. Asakura S., Hotta K., Imai N., Ooi T., Oosawa F., (1958), *Conference on the Chemistry of Muscular Contraction 1957*, Igaku Shoin Ltd, Tokyo, 57—65.
22. Nakaoka Y., Kasai M., (1969), *J. Mol. Biol.*, **44**, 319—332.
23. Gergely J., Gouvea M. A., Martonosi M., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 1704—1706.
24. Oosawa F., Asakura S., Hotta K., Imai N., Ooi T., (1959), *J. Polym. Sci.*, **37**, 323—336.
25. Asakura S., Kasai M., Oosawa M., (1960), *J. Polym. Sci.*, **44**, 35—49.
26. Kasai M., Asakura S., Oosawa M., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **57**, 22—31.
27. Oosawa F., Kasai M., (1962), *J. Mol. Biol.*, **4**, 10—21.
28. Oosawa F., Higashi S., (1967), *Prog. Theoret. Biol.*, **1**, 80—164.
29. Kasai M., Asakura S., Oosawa F., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **57**, 13—21.
30. Kasai M., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **180**, 399—409.
31. Ikkai T., Ooi T., (1966), *Biochemistry*, **5**, 1551—1560.
32. Próchniewicz E., Strzelecka-Gołaszewska H., (1971), *Streszczenia IX Zjazd PTBioch*, Katowice, str. 93.
33. Bárány M., Biró N. A., Molnár J., (1954), *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **5**, 63—78.
34. Bailey K., (1948), *Biochem. J.*, **43**, 271—279.
35. Caspar D. L. D., (1963), *Adv. Protein Chem.*, **18**, 37—121.
36. Gerber B. R., Routledge L. M., Takashima S., (1972), *J. Mol. Biol.*, **71**, 317—337.
37. Weisenberg R. C., Timasheff S. N., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4110—4116.
38. Mihashi K., Ooi T., (1965), w *Molecular Biology of Muscular Contraction*, wyd. przez S. Ebashi, F. Oosawa, T. Sekine, Y. Tonomura, Igaku Shoin Ltd., Tokyo, 77—89.
39. Strzelecka-Gołaszewska H., Próchniewicz E., Drabikowski W., (1972), *Streszczenia IV International Biophysics Congress*, Moskwa, str. 129.
40. Oosawa F., Asakura S., Asai H., Kasai M., Kobayashi S., Mihashi K., Ooi T., Taniguchi M., Nakano E., (1964), w *Biochemistry of Muscle Contraction*, wyd. przez J. Gergely, Little, Brown and Company, Boston, 158—172.
41. Katz A. M., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 397—407.
42. Strzelecka-Gołaszewska H., Nagy B., Gergely J., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**, 559—569.
43. Nagy B., Strzelecka-Gołaszewska H., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 428—435.
44. West J., Nagy B., Gergely J., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 611—616.

45. Bárány M., Biró N. A., Molnár J., Straub F. B., (1954), *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, **5**, 369—381.
46. Hanson J., (1973), *Proc. Roy. Soc., London*, **183B**, 39—58.
47. Strzelecka-Gołaszewska H., Próchniewicz E., Drabikowski W., (w przygotowaniu).
48. Kawamura M., Maruyama K., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **267**, 422—434.
49. Oosawa F., Asakura S., Ooi T., (1961), *Progress in Theoretical Physics*, Suppl. no 17, 14—31.
50. Strzelecka-Gołaszewska H., Jakubiak M., Drabikowski W., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **55**, 221—230.
51. Tawada K., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 311—318.
52. Fujime S., Ishiwata S., (1971), *J. Mol. Biol.*, **62**, 251—265.
53. Oosawa F., Fujime S., Ishiwata S., Mihashi K., (1973), *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, **38**, 277—285.
54. Tonomura Y., Watanabe S., Morales M., (1969), *Biochemistry*, **8**, 2171—2176.
55. Ohyashiki T., Sekine T., Kanaoka Y., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **351**, 214—223.
56. Yanagida T., Taniguchi M., Oosawa F., (1974), *J. Mol. Biol.*, **90**, 509—522.
57. Ishiwata S., Oosawa F., (1974), *J. Mechanochem. Cell Motility*, **3**, 9—17.
58. Endo M., (1973), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 505—510.
59. Ebashi S., Endo M., Ohtsuki J., (1969), *Ann. Rev. Biophys.*, **2**, 351—384.
60. Hatano S., Totsuka T., Oosawa F., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **140**, 109—122.

XIV ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbędzie się w Lublinie w dniach 3—5 września 1976 r. Przewodniczącym Komitetu Naukowo-Organizacyjnego jest prof. dr Jerzy Trojanowski (Instytut Mikrobiologii i Biochemii UMCS, ul. Akademicka 19, 20-031 Lublin). Bliższe dane o programie naukowym Zjazdu zostaną podane później.

JAN JÓZEF ZIMOWSKI *

Metabolity witamin D i ich rola biologiczna

Metabolites of Vitamin D and Their Biological Function

W latach dwudziestych wyizolowano drobnocząsteczkową substancję o działaniu przeciwrzywnym, której nadano nazwę witaminy D. Badania chemiczne wyjaśniły, że taką aktywność biologiczną wykazuje kilka naturalnych związków strukturalnie spokrewnionych ze sterolami. Są to pochodne 3β -hydroksy-9,10-seko-steranu zawierające 3 sprzężone wiązania podwójne w pozycji 5, 7 i 10 (19), przy czym poszczególne związki tej grupy, oznaczane literą D z indeksem cyfrowym, różnią się budową łańcucha bocznego przy C—17 układu steranowego. Najważniejszymi witaminami grupy D, które są najbardziej rozpowszechnione w przyrodzie i wykazują najwyższą aktywność biologiczną są witamina D_2 , ergokalciferol (III) i witamina D_3 , cholekalciferol (III) (1).

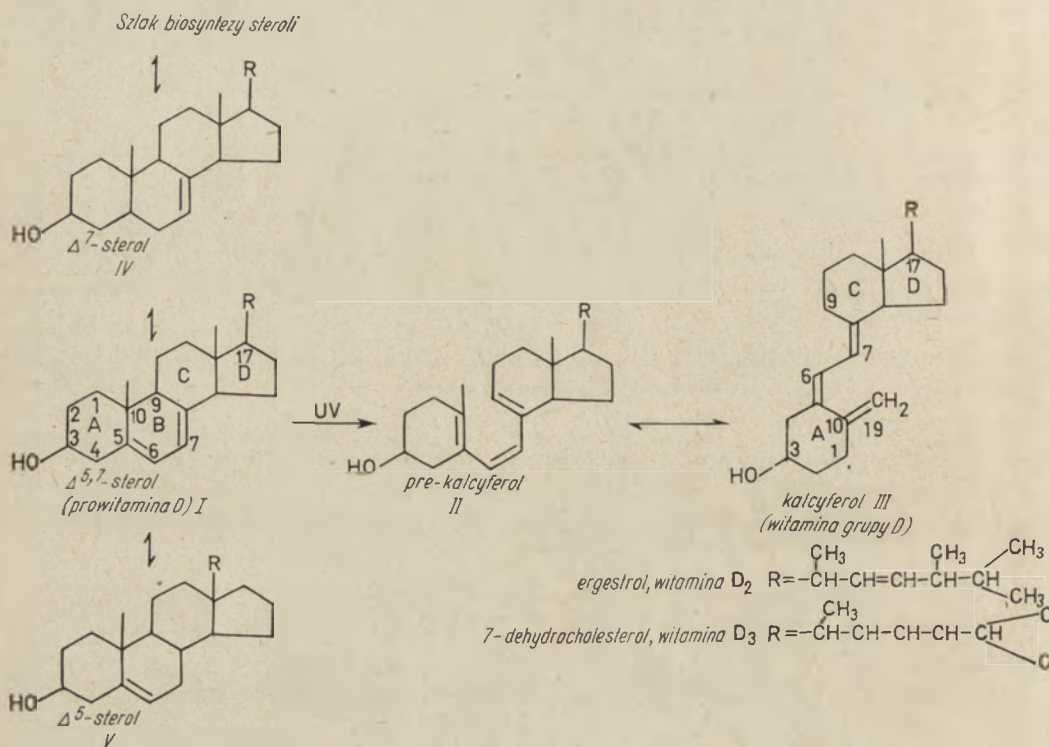
Badania przeprowadzone w latach trzydziestych i czterdziestych wyjaśniły, że witaminy D powstają z prowitamin, którymi są $\Delta^{5,7}$ -sterole. I tak prekursorem witaminy D_2 jest ergosterol zaś witaminy D_3 , 7-dehydrocholesterol. Fotochemiczne rozerwanie pierścienia B $\Delta^{5,7}$ -steroli prowadzi do powstania tzw. prekalciferoli, które następnie w wyniku termicznej izomeryzacji przekształcają się w odpowiednie witaminy D, kalciferole (Ryc. 1).

Proces ten zachodzi w zewnętrznych warstwach skóry ssaków, jednak nie zawsze z wystarczającą wydajnością (2).

* Mgr, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: 25-OH-D — 25-hydroksykalciferol; 25-OH- D_3 — 25-hydroksycholekalciferol; 24,25-(OH) $_2$ - D_3 — 24,25-dwuhydroksycholekalciferol; 1,24,25-(OH) $_3$ - D_3 — 1,24,25-trójhdroksycholekalciferol; 1 α ,25-(OH) $_2$ -D — 1 α ,25-dwuhydroksykalciferol; 1 α ,25-(OH) $_2$ - D_3 — 1 α ,25-dwuhydroksycholekalciferol; 25,26-(OH) $_2$ - D_3 — 25,26-dwuhydroksycholekalciferol; 1 α -OH- D_3 — 1 α -hydroksycholekalciferol; 5,6-t- D_3 — 5,6-trans-cholekalciferol; i-T $_3$ — izotachysterol; 3-d-1 α -OH- D_3 — 3-dezoksy-1 α -hydroksycholekalciferol; H $_2$ T $_3$ — dwuhydrotachysterol; H $_2$ V $_2$ -IV — dwuhydroergokalciferol-IV; CaBP — białko wiążące wapń.

Prowitaminy D, tzn. $\Delta^{5,7}$ -sterole występują powszechnie w tkankach zwierząt i roślin wyższych na ogół jednak w niewielkich ilościach, stanowiąc jak się przyjmuje ostatnio, metabolity pośrednie na szlaku syntezy typowych steroli strukturalnych Δ^5 (V) tj. cholesterolu u zwierząt lub β -sitosterolu i stigmasterolu u roślin wyższych (3).



Ryc. 1. Schemat przekształcenia Δ^5 - i Δ^7 -steroli w witaminy grupy D.

Wiadomo, że witaminy D są niezbędne dla prawidłowego przebiegu procesów kostnienia, wchłaniania wapnia w jelicie oraz utrzymywania odpowiedniego poziomu jonów wapniowych i fosforanowych w osoczu (4). Do niedawna jednak praktycznie nic nie wiadano o mechanizmie wpływu witamin D na wymienione wyżej procesy. Znaczny postęp osiągnięto na tym polu dopiero w ostatnich kilku latach dzięki równoległym pracom kilku laboratoriów amerykańskich i brytyjskich. Prace te wyjaśniły, że dla przejawiania aktywności biologicznej niezbędna jest kilkustopniowa enzymatyczna hydroksylacja witamin D, a mechanizm działania powstałych hydroksypochodnych kalcyferoli w znacznej mierze przypomina mechanizm działania hormonów sterydowych.

I Metabolizm witamin grupy D

I-1. Wchłanianie, transport, magazynowanie i wydalanie witamin D

Witaminy D zawarte w pokarmie ulegają wchłonięciu w jelicie cienkim zwierząt razem z solami kwasów żółciowych i solami kwasów tłuszczowych (5, 7—9). Po przejściu przez komórki śluzówki jelit dostają się do kanalików limfatycznych (10). W limfie witaminy D wiążą się ze specyficznym białkiem nośnikowym. Białka nośnikowe witamin D wyizolowano z osocza ludzkiego (11) oraz z osocza kurcząt, myszy, prosiąt i małą (12).

Stwierdzono, że znaczna część dostających się do osocza witamin D ulega estryfikacji długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi (13—15) takimi, jak kwas palmitynowy, stearynowy, linolenowy, mirystynowy (16). Stwierdzone hamowanie współzawodnicze pomiędzy cholesterolem i witaminami D oraz podobna wrażliwość enzymatyczna reakcji estryfikacji cholesterolu i witamin D na inhibitory, pozwalają przypuszczać, że estryfikację witamin D przeprowadza układ enzymatyczny estryfikujący cholesterol (6, 17). Wydaje się ponadto, że podobnie jak w przypadku steroli estry witamin D mogą stanowić ich formę transportową.

Witaminy D odkładają się w różnych tkankach, głównie w tkance tłuszczowej i w mięśniach (10). W mleku ludzkim i krowim oraz w moczu królika witaminy D występują w postaci siarczanów, które są rozpuszczalną w wodzie formą witaminy D o całkowicie zachowanej aktywności biologicznej (6). Glukuronozydy witamin D oraz kilka dotychczas bliżej niezidentyfikowanych polarnych metabolitów witamin D są formami w postaci których nadmiar witamin D zostaje usunięty (wraz z żółcią) z organizmu (6, 10).

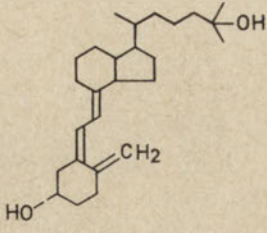
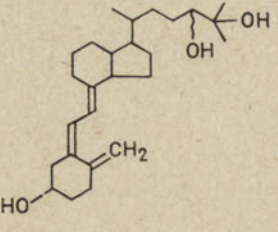
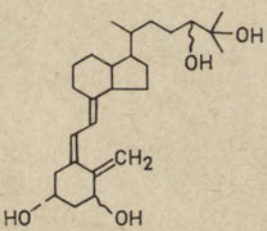
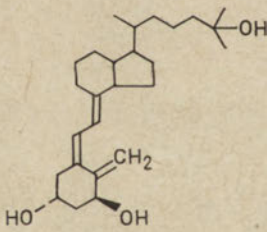
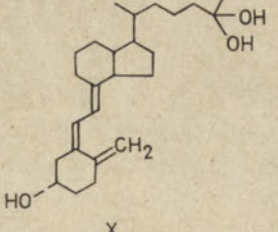
I-2. Hydroksypochodne witamin D

Badania nad losem witamin D w organizmie rozwinęły się dopiero pod koniec lat sześćdziesiątych, gdy opracowano metody efektywnego znakowania izotopowego preparatów witamin D₂ i D₃, a następnie również i niektórych metabolitów witamin D (4).

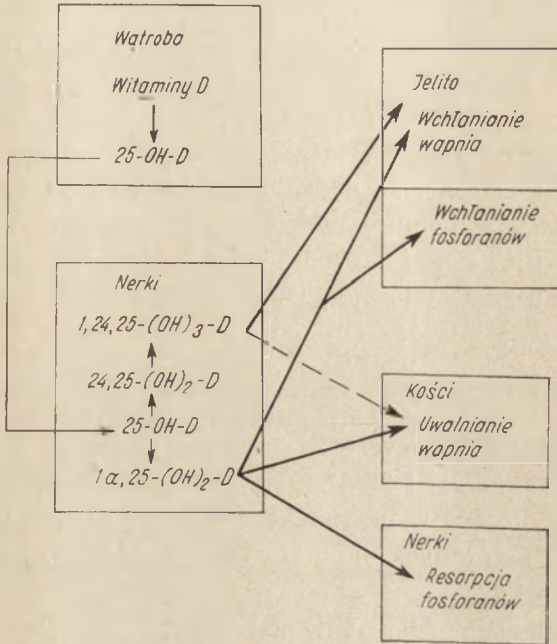
Zastosowanie tych radioaktywnych preparatów w badaniach *in vivo* i *in vitro* pozwoliło stwierdzić, że w organizmie witaminy D szybko ulegają przekształceniu w związki o wyższej polarności (4, 6, 10). Identyfikacja tych metabolitów była bardzo trudna ponieważ ilości w których występują one w organizmie są bardzo nieznaczne. Tak np. z osocza kurcząt zdołano wyizolować zaledwie 2 µg jednego z głównych metabolitów witaminy D₃, zidentyfikowanego później jako 1α,25-dwuhydroksycholekalcy-

Tabela 1

Hydroksypochoodne witaminy D₃ (cholekascyterolu)

Nazwa związku i stosowany skrót	Wzór strukturalny	Miejsce powstawania	Odnośniki literaturowe
25-hydroksycholekalcyferol 25-OH-D ₃	 <p style="text-align: center;">VI</p>	Mikrosomy wątroby	10, 20, 21, 23,
24, 25-dwuhydroksycholekalcyferol 24, 25-(OH) ₂ -D ₃	 <p style="text-align: center;">VII</p>	Mitochondria nerek	28, 29,
1, 24, 25-trójhdroksycholekalcyferol 1, 24, 25-(OH) ₃ -D ₃	 <p style="text-align: center;">VIII</p>	Nerki	30.
1α, 25-dwuhydroksycholekalcyferol 1α, 25-(OH) ₂ -D ₃	 <p style="text-align: center;">IX</p>	Mitochondria nerek	31-36, 41-44.
25, 26-dwuhydroksycholekalcyferol 25, 26-(OH) ₂ -D ₃	 <p style="text-align: center;">X</p>	?	48.

ferol (10). Dopiero równoległy rozwój mikrometod analitycznych takich jak: chromatografia gazowa, spektrografia masowa i NMR, umożliwił jednoznacznie identyfikację tych związków (4). W 1971 roku opracowano ilościową i szybką metodę wydzielenia metabolitów witamin D z materiału biologicznego, polegającą na chromatografii frakcji lipidowej na żelu Sephadex LH 20 (izopropyloteterowa pochodna Sephadex G 25) stosując gradient chloroformu w eterze naftowym, jako czynnik eluujący (18).



Ryc. 2. Metabolizm witamin D i miejsce działania ich hydroksymetabolitów.

--- → niska aktywność biologiczna.
 —→ wysoka aktywność biologiczna.

Stosując wspomniane techniki oprócz 1,25-dwuhydroksykalciferolu wykryto kilka innych hydroksypochodnych witamin D (Tabela 1) wykazujących w testach biologicznych (z wyjątkiem 25,26-dwuhydroksypochodnej) wyraźnie wyższą aktywność biologiczną niż witamina D. Wskazuje to, że biologiczna aktywność witamin D jest konsekwencją ich hydroksylacji (10).

1-2.1. 25-hydroksykalciferol (25-OH-D)

Wydzielony z osocza myszy przez de Luca i wsp. 25-hydroksycholekalcyferol (25—OH—D₃) był pierwszą zidentyfikowaną hydroksypochodną witaminy D₃ (VI) (10). W następnych latach stwierdzono, że przekształ-

cenie witaminy D_3 w ten metabolit zachodzi w organizmie myszy wyłącznie w wątrobie (20, 21). U kurcząt natomiast hydroksylacja witaminy D_3 w pozycji 25 odbywa się również w nerkach i w jelicie, jednakże z mniejszą wydajnością niż w wątrobie (22). Układ enzymatyczny przeprowadzający tę reakcję występuje we frakcji mikrosomalnej (23). Dla przebiegu jej niezbędny jest tlen cząsteczkowy i NADPH oraz niezidentyfikowany czynnik występujący w cytoplazmie (23). Hydroksylacji w pozycji 25 ulega również witamina D_2 oraz niektóre związki syntetyczne zbliżone strukturalnie do witamin D jak np. dwuhydrotachysterol (25) (XIII).

W badaniach *in vivo* zaobserwowano, że poziom 25—OH—D_3 występującego w osoczu myszy nie zależy bezpośrednio od ilości dostarczanej zwierzęciu witaminy D_3 , gdyż już przy niskich dawkach witaminy D_3 (ok. 2—3 nmoli na 1 zwierzę) stężenie 25—OH—D_3 w osoczu osiąga maksimum (25). Stwierdzono, że dodanie 25—OH—D_3 do homogenatu wątroby myszy znacznie hamuje hydroksylację witaminy D_3 (24). Na tej podstawie sugeruje się, że produkt hydroksylacji witaminy D, tj. 25—OH—D , hamuje specyficznie aktywność 25-hydroksylazy kalcyferolu.

Powstały w wątrobie 25—OH—D po przeniknięciu do krwi zostaje związany ze specyficznym białkiem nośnikowym.

U płazów, które są ewolucyjnie najstarszą grupą zwierząt wymagającą witamin D dla regulacji homeostazy wapnia w organizmie (27), rolę białek nośnikowych witaminy D i 25—OH—D pełnią niskospecyficzne lipoproteidy — jak to wykazano w przypadku ropuchy *Xenopus laevis* (12). Jest to prawdopodobnie ewolucyjnie najprymitywniejszy sposób transportu omawianych związków.

W osoczu kilku badanych ssaków białko nośnikowe wiążące 25—OH—D jest identyczne z białkiem wiążącym witaminy D (12). Ma ono ruchliwość elektroforetyczną α -globulin, z wyjątkiem białka wyodrębnionego z osocza małp Nowego Świata, którego ruchliwość elektroforetyczna odpowiada frakcji albumin (12). Z osocza kurcząt zaś wyizolowano dwa różne białka nośnikowe — jedno specyficzne wobec witamin D a drugie wobec 25—OH—D . Obydwa te białka mają ruchliwość elektroforetyczną β -globulin i charakteryzują się stałą sedymentacji 3,5 S. Można jest rozdzielić metodą sączenia molekularnego na żelu Sephadex G-100. Białko nośnikowe witaminy D ma masę cząsteczkową 60 000 a białko nośnikowe 25—OH—D — 54 000 (12).

W przeciwieństwie do innych zwierząt, które wykorzystują witaminę D_2 i witaminę D_3 z taką samą efektywnością w organizmie kur cholekalcyferol jest lepiej wykorzystywany niż ergokalcyferol. Przypuszcza się, że ewolucyjne wykształcenie dwóch odrębnych białek nośnikowych witamin D i 25—OH—D wiązało się ze zwiększeniem specyficzności pierwszego z nich w stosunku do witaminy D_3 (tj. cholekalcyferolu).

1-2.2. 24,25-dwuhydroksycholekalcyferol (24,25-OH₂-D₃)

W 1970 roku de Luca i współautorzy po podaniu kurczętom diety zawierającej dużą ilość wapnia i trytowany 25—OH—D₃ wyizolowali inny metabolit witaminy D₃ tj. 24,25—(OH)₂—D₃ (VII) (28), który początkowo mylnie zidentyfikowano jako 21,25—(OH)₂—D₃.

Przekształcenie 25—OH—D w ten metabolit przeprowadza 24-hydroksylaza 25-hydroksykalcyferolu występująca w mitochondriach nerek (29). Również w tym przypadku dla przebiegu reakcji konieczny jest tlen cząsteczkowy i NADPH. Stała Michaelisa 25—OH—D₃ wynosi około 1×10^{-6} M. Produkt reakcji czyli 24,25—(OH)₂—D₃ oraz 1 α ,25—(OH)₂—D₃ hamują działanie tego enzymu (29).

1-2.3. 1,24,25-trójhdroksycholekalcyferol (1,24,25—(OH)₃—D₃)

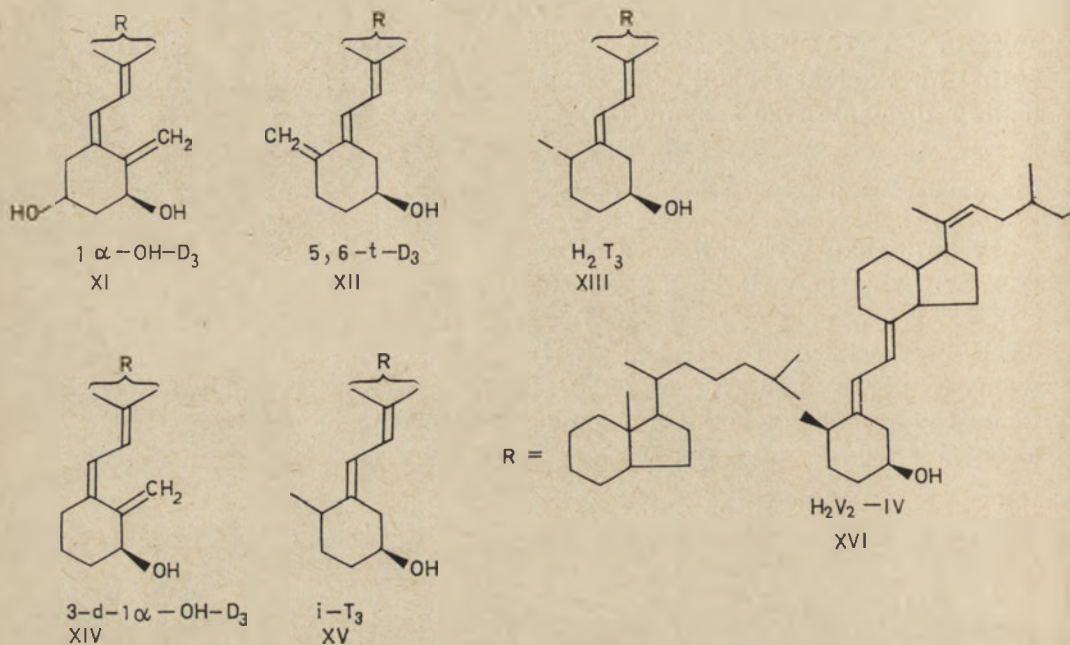
W 1973 roku wyizolowano z osocza myszy 1,24,25—(OH)₃—D₃ (VIII) (30). Synteza tego związku z 24,25—(OH)₂—D₃ przebiega w homogenacie z nerek. Wydaje się, że 24,25—(OH)₂—D wykazuje aktywność biologiczną dzięki przekształceniu w 1,24,25—(OH)₃—D. Metabolit ten stymuluje wolny (w porównaniu z 1 α ,25—(OH)₂—D₃) transport wapnia w jelicie, natomiast w procesie uwalniania wapnia z kości wykazuje stosunkowo niską aktywność (30).

1-2.4. 1 α ,25-dwuhydroksycholekalcyferol (1 α ,25—(OH)₂—D₃)

W 1971 roku równocześnie w trzech ośrodkach wyizolowano i zidentyfikowano kolejny metabolit witaminy D₃, 1 α ,25—(OH)₂—D₃ (IX) (31—36). Obecnie przyjmuje się, że związek ten jest właściwą formą czynną witamin D, przynajmniej w procesie wchłaniania wapnia w jelicie. Stwierdzono, że w perfundowanym jelicie myszy związek ten powoduje maksymalną stymulację wchłaniania wapnia przy dawce 65—325 pmoli, podczas gdy 25—OH—D₃ wykazuje ten efekt dopiero przy dawce 60 000 pmoli (10). Omówiony wyżej 1,24,25—(OH)₃—D₃ wykazuje w procesie wchłaniania wapnia tylko około 60% aktywności 1 α ,25—(OH)₂—D₃ (30). W procesie uwalniania wapnia z kości 1 α ,25—(OH)₂—D₃ jest około 100 razy efektywniejszy niż 25—OH—D₃ (37, 38), podczas gdy 1,24,25—(OH)₃—D₃ wykazuje tylko niską aktywność (30). De Luca i wsp. stwierdzili, że podanie myszom *in vivo* aktywnymocyny D, która powoduje znaczne zahamowanie przekształcenia 25—OH—D₃ w 1 α ,25—(OH)₂—D₃ blokuje również transport wapnia w jelicie (37). Podanie 1 α ,25—(OH)₂—D₃ znosi działanie antybiotyku. Stwierdzono, że 1 α ,25—(OH)₂—D₃ nie ulega dalszym przekształceniom w jelicie zanim nie nastąpi stymulacja transportu wapnia (39). Wyniki te wskazują więc, że 1 α ,25—(OH)₂—D jest bezpośrednio zaangażowany w procesie transportu wapnia w jelicie i mobilizacji wapnia

w kościach. Ostatnio wykazano, że ta pochodna witamin D jest również aktywna w procesie wchłaniania fosforanów w jelicie i ich resorpcji w nerce (4, 40).

$1\alpha,25-(OH)_2-D$ powstaje w wyniku stereospecyficznej hydroksylacji $25-OH-D$ w pozycji C- 1α (4, 10). 1-hydroksylaza 25-hydroksykalciferolu występuje podobnie jak 24-hydroksylaza 25-hydroksykalciferolu w nerkach (41, 42) we frakcji mitochondrialnej (43, 44).



Ryc. 3. Niektóre biologicznie aktywne analogi $1\alpha,25-(OH)_2-D_3$.

Własności tego enzymu zostały poznane stosunkowo lepiej niż innych hydroksylaz uczestniczących w metabolizmie witamin D. Enzym ten odznacza się wysoką specyficznością w stosunku do substratu — nie powoduje bowiem hydroksylacji ani witaminy D_3 , ani dwuhydrotachysterolu (analog witaminy D w którym pierścień A jest obrócony o 180°) (43). Optimum pH dla tej reakcji wynosi 7,4, a stała Michaelisa dla $25-OH-D_3$ około 2×10^{-6} M. Reakcja przebiega tylko w warunkach aerobowych w obecności NADPH i jonów magnezowych, a hamuje ją produkt reakcji tj. $1\alpha,25-(OH)_2-D$ (43). Wykazano, że w przypadku braku w mieszaninie reakcyjnej NADPH inhibitory łańcucha oddechowego takie jak antymycyna, dwunitrofenol, oligomycyna hamują aktywność 1-hydroksylazy 25-hydroksykalciferolu. Wskazuje to na sprzężenie reakcji 1α -hydroksylacji z procesem transportu elektronów w łańcuchu oddechowym (43).

Wyniki badań z zastosowaniem $^{18}O_2$ pozwoliły stwierdzić, że tlen wpro-

wadzony jako grupa hydroksylowa w pozycji 1α pochodzi w całości z tego izotopu, natomiast tlen z wody nie ulega włączeniu do cząsteczki $1\alpha,25-(OH)_2-D$ (45). Na tej podstawie sugeruje się, że omawiany enzym jest tzw. oksydazą o mieszanej funkcji. Potwierdzają to badania wskazujące na udział cytochromu P-450 w reakcji hydroksylacji $25-OH-D_3$. Świadczą o tym zmiany widma absorpcji podczas inaktywacji hydroksylazy tlenkiem węgla i reaktywacji w świetle (46) oraz fakt, że redukcja cytochromu P-450 w mitochondriach z nerek kurcząt jest ściśle związana z syntezą $1\alpha,25-(OH)_2-$ (4). Wykazano także, że w wyniku połączenia cytochromu P-450 wyizolowanego z frakcji mitochondrialnej z nerek rachitycznych kurcząt, z wysoko oczyszczonym flawoproteidem zależnym od NADPH i żelazoproteidem (tzw. adrenodoksyną) z mitochondriów nadnerczy powstaje układ enzymatyczny zdolny do hydroksylacji $25-OH-D$ w pozycji C- 1α (47).

Wyniki te wskazują, że 1-hydroksylaza 25-kalcyferolu strukturalnie i funkcjonalnie jest podobna do innych oksydaz o mieszanej funkcji uczestniczących w hydroksylowaniu steroidów np. 11- α -hydroksylazy steroli czy 7- α -hydroksylazy cholesterolu, które również składają się z flawoproteidu, adrenodoksyny i cytochromu P-450 (4, 46).

1-2.5. 25,26-dwuhydroksycholekalcyferol ($25,26-(OH)_2-D_3$)

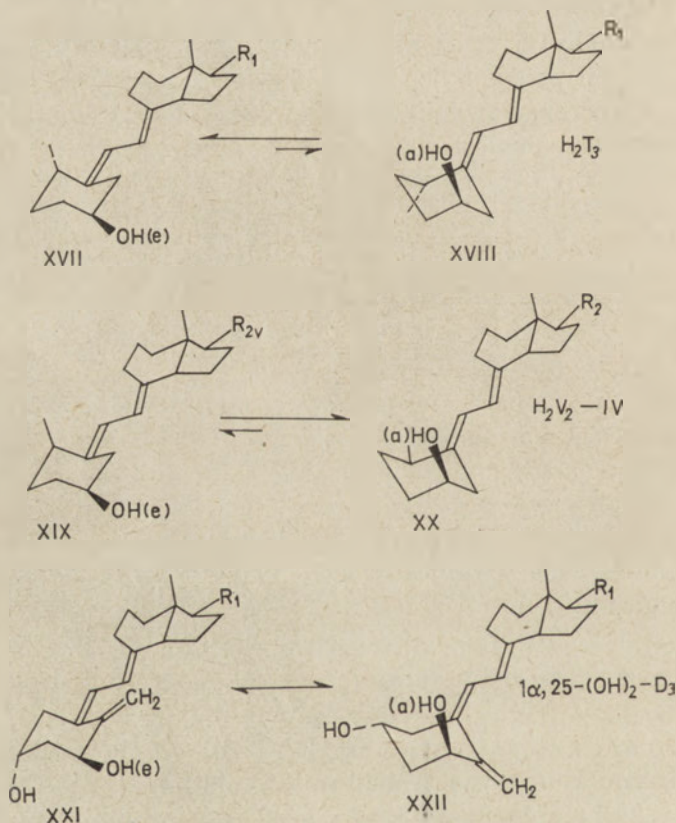
W 1971 roku de Luca i współautorzy wyizolowali $25,26-(OH)_2-D_3$ (X) z osocza prosiąt karmionych dietą bogatą w witaminę D_3 (48). Rola i miejsce powstawania tego metabolitu jest jak dotąd nieznanne. Wydaje się jednak, że hydroksylacja tego typu może stanowić wstęp do rozszczepienia i eliminacji łańcucha bocznego steroli. Jest to więc prawdopodobnie pierwsza w ciągu reakcji prowadzących do destrukcji i eliminacji witamin D z organizmu (10).

Przytoczone powyżej dane wskazują, że witaminy D w organizmach zwierzęcych podlegają kilku etapowej hydroksylacji. W pierwszym etapie w wyniku działania 25-hydroksylazy kalcyferolu występującej w mikrosomach wątroby następuje hydroksylacja witamin D w pozycji C-25. Następnie enzymy obecne we frakcji mitochondrialnej nerek tj. 1-hydroksylaza i 24-hydroksylaza 25-hydroksykalcyferolu przekształcają $25-OH-D$ odpowiednio w $1\alpha,25-(OH)_2-D_3$ i w $24,25-(OH)_2-D$. $24,25-(OH)_2-D$ również w nerkach ulega dalszej hydroksylacji do $1,24,25-(OH)_3-D$. Z badań nad aktywnością biologiczną tych hydroksypochodnych witamin D wynika, że najaktywniejszy w procesach wchłaniania wapnia w jelicie i uwalniania go z kości jest $1\alpha,25-(OH)_2-D$ natomiast najmniej aktywny jest $25-OH-D$ (Ryc. 2).

II. Mechanizm działania witamin D

II-1. Zależność aktywności biologicznej od struktury

Warunkiem aktywności biologicznej naturalnych metabolitów witamin D oraz licznych syntetycznych analogów tych związków jest obecność grupy hydroksylowej w pozycji C-1 α (49). Wszystkie analogi 1 α ,25-(OH) $_2$ -D $_3$ aktywne w procesie wchłaniania wapnia w jelicie, w organizmach zwierząt, którym usunięto nerki, muszą zawierać tę grupę, jak np. 1 α -hydroksycholekalcyferol (1 α -(OH)-D $_3$) (XX) lub jej pseudorównoważnik, jak to jest w przypadku 5,6-trans-cholekalcyferolu (5,6-t-D $_3$) (XII) (51) i izotachysterolu (i-T $_3$) (XV) (52). Przez pseudorównoważnik grupy 1 α -OH *) rozumie się grupę hydroksylową, która



Ryc. 4. Konformacja 1 α ,25-(OH) $_2$ -D $_3$ i jego analogów.

(a) — położenie aksjalne
(e) — położenie ekwatorialne

*) Oznaczenie podstawników α i β w pierścieniu A oraz numeracja atomów węgla w 9,10-seko-steroidach określana jest przez odniesienie do pierwotnej orientacji tych podstawników w związku macierzystym z nienaruszonym układem sterynowym tj. w 7-dehydrocholesterolu.

zajmuje pozycję geometrycznie równoważną grupie $1\alpha\text{—OH}$ w $1\alpha,25\text{—(OH)}_2\text{—D}$. W cząsteczkach $5,6\text{—t—D}_3$ oraz $i\text{—T}_3$ pozycję taką zajmuje grupa $3\beta\text{—OH}$. Jest to wynikiem odmiennej konfiguracji wiązania podwójnego przy C-5 (tj. *trans* zamiast *cis*) co w konsekwencji powoduje, że pierścień A w tych związkach odwrócony jest o 180° w stosunku do jego położenia w naturalnych pochodnych witamin D (49). Wyniki doświadczeń z analogami $1\alpha,25\text{—(OH)}_2\text{—D}_3$, takimi jak 3-dezoksy- 1α -hydrokalcysterol ($3\text{—d—}1\alpha\text{—(OH)—D}_3$) (XIV) (53), dwuhydrotachysterol H_2T_3 (XIII) (54), $5,6\text{—t—D}_3$ (51) i $i\text{—T}_3$ (52) wskazują natomiast, że pojawienie się aktywności biologicznej witaminy D_3 nie jest związane z obecnością grupy hydroksylowej w pozycji C-3 oraz grupy metylenowej w pozycji C-19.

Wiadomo, że pierścień A $1\alpha,25\text{—(OH)}_2\text{—D}_3$ może w roztworze przyjmować dwie różne konformacje krzesłowe. W jednej z nich grupa hydroksylowa w pozycji C- 1α ma położenie ekwatorialne (XXI) w drugiej zaś położenie aksjalne (XXII) (49). W celu zbadania, która z tych form jest bardziej aktywna biologicznie porównano aktywność dwóch analogów $1\alpha,25\text{—(OH)}_2\text{—D}_3$ tj. H_2T_3 i dwuhydroergokalcysterolu-IV ($H_2V_2\text{—IV}$) (XVI). H_2T_3 występuje w roztworze głównie w postaci, w której grupa hydroksylowa w pozycji pseudo- 1α ma położenie ekwatorialne (XVII) (53), natomiast w $H_2V_2\text{—IV}$ grupa hydroksylowa w pozycji C- 1α przyjmuje przeważnie położenie aksjalne (XX) (49). Z badań nad stymulacją wchłaniania wapnia w jelicie przez te związki wynika, że H_2T_3 wykazuje wysoką aktywność biologiczną (55) w przeciwieństwie do pochodnej $H_2V_2\text{—IV}$, która charakteryzuje się dość niską aktywnością biologiczną (49). Wynika zatem, że bardziej aktywną biologicznie jest taka konformacja pierścienia A $1\alpha,25\text{—(OH)}_2\text{—D}_3$, w której grupa hydroksylowa w pozycji C- 1α zajmuje położenie ekwatorialne.

II-2. Mechanizm działania $1\alpha,25\text{—(OH)}_2\text{—D}_3$ w śluzówce jelit

Wyniki badań rozmieszczenia trytowanego $1\alpha,25\text{—(OH)}_2\text{—D}_3$ w komórkach śluzówki jelita kurcząt i myszy wykazały, że około 80% podanego związku znajduje się w surowej frakcji jądrowej, przy czym 30—45% radioaktywności wiąże się z chromatyną (56—60). Kształt krzywej nasycania świadczy o tym, że chromatyna zawiera ograniczoną liczbę miejsc wiążących dla $1\alpha,25\text{—(OH)}_2\text{—D}_3$ (56). W homogenacie chromatyny z jelita kurczęcia nasycenie następuje po związaniu 20pmoli $1\alpha,25\text{—(OH)}_2\text{—D}_3$ na 15mg DNA (59). Niezwiązana z chromatyną część $1\alpha,25\text{—(OH)}_2\text{—D}_3$ wiąże się z frakcją białkową wykazującą wysoką specyficzność w stosunku do tego metabolitu witaminy D_3 (59, 60). Białko o tej aktywności z tkanki jelit kurcząt charakteryzuje się stałą sedymentacji 3—3,5 S. Powinowactwo $1\alpha,25\text{—(OH)}_2\text{—D}_3$ do tego białka jest bardzo wysokie, a stała Michaelisa wynosi $2,2 \times 10^{-10}\text{M}$ (61).

Ponadto wykazano, że w temperaturze 0°C $1\alpha,25\text{---}(\text{OH})_2\text{---D}_3$ występuje głównie we frakcji cytosolowej, natomiast w temperaturze 37°C szybko przemieszcza się do frakcji jądrowej wiążąc się z chromatyną. Ta zależność utrzymuje się zarówno w homogenacie śluzówki jelita jak i w rekonstruowanym układzie cytosol-chromatyna (61). Wydaje się więc, że proces transportu kompleksu $1\alpha,25\text{---}(\text{OH})_2\text{---D}_3$ ze specyficznym białkiem nośnikowym do chromatyny wymaga pewnej energii aktywacji oraz że błona jądrowa nie odgrywa najprawdopodobniej w tym procesie poważniejszej roli.

Norman i wsp. (49) w 1974 roku przedstawili hipotezę transportu $1\alpha,25\text{---}(\text{OH})_2\text{---D}$ z cytoplazmy do jądra w komórkach śluzówki jelita. W pierwszym etapie metabolit ten miał wiązać się na terenie cytoplazmy ze specyficznym receptorem białkowym. Następnie kompleks ten miałby ulegać aktywacji, która być może polega na zmianie konformacji pierścienia A $1\alpha,25\text{---}(\text{OH})_2\text{---D}$. Aktywacja kompleksu umożliwiałaby dopiero związanie $1\alpha,25\text{---}(\text{OH})_2\text{---D}$ z chromatyną. W wyniku tego procesu następowalaby synteza nowego m-RNA i białek niezbędnych dla przebiegu transportu wapnia. Fakty przytoczone poniżej świadczą o słuszności przypuszczenia, że $1\alpha,25\text{---}(\text{OH})_2\text{---D}_3$ działa na poziomie transkrypcji. I tak *in vivo* aktynomycyna D silnie hamuje transport wapnia w jelicie kurcząt jeżeli zostanie podana przed $1\alpha,25\text{---}(\text{OH})_2\text{---D}_3$ (62). Norman i wsp. zaobserwowali ponadto, że po podaniu kurczętom $1\alpha,25\text{---}(\text{OH})_2\text{---D}_3$ następuje około 2-krotne zwiększenie syntezy RNA w śluzówce jelit, mierzone przyrostem wbudowywania trytowanej urydyny. Aktynomycyna D znosi całkowicie ten efekt (63). Wykazano również, że α -amanityna i aktynomycyna D hamują powstawanie białka wiążącego wapń (CaBP — *Calcium binding protein*) w hodowli tkanki jelitowej z embrionów kurcząt inkubowanej z $1\alpha,25\text{---}(\text{OH})_2\text{---D}_3$ (64). Stwierdzono także, że po dodaniu rachitycznym kurczętom znakowanego $1\alpha,25\text{---}(\text{OH})_2\text{---D}_3$ maksymalne nasycenie chromatyny tym metabolitem witaminy D_3 następuje po 4 godzinach, maksimum stymulacji syntezy RNA po 6 godzinach a maksimum stymulacji transportu wapnia po 9 godzinach (63).

W 1974 roku Kodicek i wsp. badali zdolność syntezy CaBP przez polirybosomy z jelit kurcząt. Polirybosomy te były inkubowane z radioaktywnymi aminokwasami i następnie CaBP wyodrębniono z mieszaniny białek metodą immunoprecypitacji. Stwierdzono, że około 7% radioaktywnych białek syntetyzowanych na polirybosomach z jelit kurcząt, które uprzednio znajdowały się na diecie zawierającej witaminę D_3 jest identyczne z CaBP. Natomiast gdy polirybosomy wyizolowano z jelit kurcząt żywionych pokarmem bez witaminy D_3 CaBP stanowił zaledwie 0,5% syntetyzowanych białek (65).

Omówione wyżej doświadczenia wskazują więc wyraźnie, że $1\alpha,25\text{---}(\text{OH})_2\text{---D}$ działa na poziomie transkrypcji i jest induktorem syn-

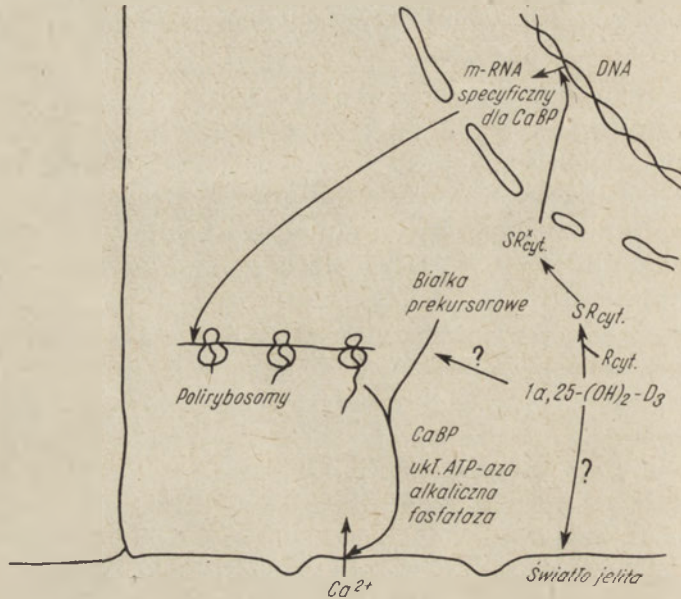
tezy m-RNA stanowiącego z kolei matrycę dla syntezy białka wiążącego wapń w jelicie tj. CaBP. Przypuszcza się, że i inne białka biorące udział w procesie wchłaniania wapnia w jelicie tj. ATP-aza stymulowana Ca^{2+} i alkaliczna fosfataza, których aktywność również wzrasta po podaniu zwierzętom witaminy D_3 , są także syntetyzowane *de novo* (6, 10, 66). Nie można wykluczyć jednak, że wzrost aktywności tych enzymów jest wynikiem przekształcenia odpowiednich białek prekursorowych w białka czynne lub też bezpośredniej aktywacji tych enzymów przez metabolity witamin D.

W 1971 roku de Luca i wsp. stwierdzili, że po podaniu myszom aktynomycyny D i następnie po 2—5 godzinach $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$, transport wapnia w jelicie przebiega normalnie (37). Stwierdzono, że w śluzówce jelit rachitycznych myszy występuje tzw. frakcja białkowa A, której ilość wyraźnie maleje po podaniu myszom witaminy D_3 podczas gdy ilość CaBP wzrasta (67). Ponadto białka frakcji A mają nieco wyższą masę cząsteczkową niż CaBP (67). Możliwość przekształcania się białek frakcji A w CaBP potwierdziło doświadczenie z zastosowaniem podwójnie znakowanych aminokwasów (68). Myszom na diecie z witaminą D_3 podano ^{14}C -aminokwasy na 6 godzin przed zabiciem, a myszom rachitycznym ^3H -aminokwasy na 3 godziny przed zabiciem. Wyizolowane śluzówki jelit zwierząt obu grup doświadczalnych zmieszano, a następnie rozdzielono białka cytosolowe metodą elektroforezy. Po oznaczeniu stosunku $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ w poszczególnych pasmach białkowych stwierdzono, że jest on wysoki dla CaBP (około 2) a niski we frakcji białkowej A (około 0,6). W doświadczeniu kontrolnym, w którym obie grupy zwierząt były na diecie nie zawierającej witamin D, stosunek $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ we wszystkich pasmach białkowych był bliski jedności. Wyniki te wskazują, że witaminy D stymulują najprawdopodobniej przekształcenie białka prekursorowego występującego w tzw. frakcji białkowej A w CaBP. Przypuszcza się, że przekształcenie to polega na odszczepieniu krótkiego peptydu.

W 1971 roku Norman i wsp. stwierdzili, że poddanie izolowanych jelit świń, które znajdowały się uprzednio na diecie bez witaminy D, działaniu antybiotyku polienowego — filipiny (wywołującego zmiany w organizacji błon) wzmaga wchłanianie wapnia w jelicie. Stymulacji takiej nie obserwuje się przy podobnym traktowaniu jelit ze świń odżywianych dietą zawierającą witaminę D_3 (69). Wynik tego doświadczenia wskazywałby, że witaminy D lub ich metabolity powodują reorganizację struktury błon mikrokosmków w sposób pozwalający na szybkie wnikanie wapnia do komórek śluzówki jelita. Obserwację tę potwierdzają badania zmian składu lipidów w błonach mikrokosmków z jelita świń znajdujących się na diecie zawierającej witaminę D_3 oraz błon z jelit świń pozostających na diecie bez witaminy D (70). W błonach jelit zwierząt żywionych dietą zawierającą witaminę D_3 obserwowano wyższy stosunek fosfo-

lipidów do steroli. Ponadto wykazano występowanie zmian w składzie kwasów tłuszczowych zarówno we frakcji fosfolipidów jak i we frakcji estrów steroli.

Ogólny schemat mechanizmu działania witamin D w procesie wchłaniania wapnia w jelicie przedstawiono na rycinie 5.



Ryc. 5. Schemat działania $1\alpha,25-(OH)_2-D_3$ w komórkach śluzówki jelita.

$R_{cyt.}$ — specyficzne cytoplazmatyczne białko receptorowe wiążące $1\alpha,25-(OH)_2-D_3$,
 $SR_{cyt.}$ — kompleks białko receptorowe— $1\alpha,25-(OH)_2-D_3$,
 $SR_{2cyt.}$ — zaktywowany kompleks białko receptorowe — $1\alpha,25-(OH)_2-D_3$.

II-3. Działanie $1\alpha,25-(OH)_2-D$ w kościach

W 1971 roku stwierdzono, że aktynomycyna D powoduje całkowite zahamowanie uwalniania wapnia z kości myszy, jeżeli ten antybiotyk podano wcześniej niż $1\alpha,25-(OH)_2-D_3$ (71). Na tej podstawie sugeruje się, że podobnie jak w jelicie $1\alpha,25-(OH)_2-D_3$ działa na poziomie transkrypcji DNA. Dodatkowym potwierdzeniem tej hipotezy może być fakt obecności tego metabolitu witaminy D głównie w jądrze komórek kostnych (72).

W 1973 roku Kodicek i wsp. badając wpływ witaminy D_3 na syntezę kolagenu stwierdzili, że w łańcuchach $\alpha-1$ i $\alpha-2$ kolagenu izolowanych z kości zwierząt rachitycznych znajduje się większy stopień hydroksylacji (73).

III. Regulacja metabolizmu $1\alpha,25-(\text{OH})_2-\text{D}$ i $24,25-(\text{OH})_2-\text{D}$

Jak omówiono tu szczegółowo wyżej witaminy D ulegają w organizmach zwierzęcych kilkusetapowej hydroksylacji. Pierwszym etapem zachodzącym głównie w wątrobie jest hydroksylacja w pozycji C-25. Następnie w nerkach $25-\text{OH}-\text{D}$ ulega hydroksylacji w pozycji C-1 α lub w pozycji C-24.

Wykazano, że szybkość hydroksylacji $25-\text{OH}-\text{D}_3$ do jednego z tych dwu metabolitów zależy od ilości wapnia w diecie i jego poziomu w osoczu (10, 74). W organizmie myszy na diecie o niskiej zawartości wapnia (około 0,02%) powstaje przede wszystkim $1\alpha,25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$, podczas gdy w organizmach myszy pozostających na diecie z wysoką zawartością wapnia (około 3,0%) powstaje głównie $24,25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ (75).

Udział wapnia w regulacji biosyntezy obu tych metabolitów może polegać na bezpośrednim wpływie poziomu wapnia w osoczu na aktywność enzymów hydroksylujących $25-\text{OH}-\text{D}$ w pozycji C-1 α albo w pozycji C-24. Można też przypuszczać, że w regulacji aktywności tych enzymów pośredniczy jakiś czynnik wrażliwy na poziom wapnia w osoczu.

Za pierwszą z tych możliwości przemawiają wyniki badań nad zmianami aktywności 1-hydroksylazy i 24-hydroksylazy 25-kalcyferolu w zależności od stężenia wapnia w izolowanych mitochondriach z nerek kurcząt. Stwierdzono, że wapń w stężeniach rzędu 0,05–0,5mM stymuluje hydroksylację $25-\text{OH}-\text{D}_3$ w pozycji C-1 α , natomiast wyższe stężenie wapnia powodują szybki spadek aktywności 1-hydroksylazy 25-kalcyferolu. Poziom hydroksylacji $25-\text{OH}-\text{D}_3$ w pozycji C-24 nie zależy od stężenia jonów wapnia (44).

Natomiast za drugą z przytoczonych powyżej możliwości przemawia fakt, że wyraźna redukcja aktywności 1-hydroksylazy 25-kalcyferolu i wzrost aktywności 24-hydroksylazy 25-kalcyferolu, następują dopiero po około 24 godzinach od zmiany zwierzętom diety z niską zawartością wapnia na dietę zawierającą znaczną jego ilość (10).

Ponieważ wiadomo, że biosynteza jednego z hormonów powstającego w gruczołach przytarczycznych, parathormonu (PTH), zależy od poziomu wapnia we krwi (2), zbadano wpływ tego hormonu na syntezę $1\alpha,25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ i $24,25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$. Myszom z usuniętą operacyjnie tarczycą wraz z przytarczycami podawano trytowany $25-\text{OH}-\text{D}$, a następnie badano zmiany poziomu radioaktywności w $1\alpha,25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ i $24,25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$. Stwierdzono, że radioaktywność w $1\alpha,25$ -dwydroksypochodnej szybko spada, natomiast w $24,25$ -dwydroksypochodnej wzrasta. Podanie takim myszom parathormonu powoduje odwrotny efekt tj. wzrost radioaktywności w $1\alpha,25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$, a jej obniżenie w $24,25-(\text{OH})_2-\text{D}_3$ (76). Na podstawie tych wyników uważa się, że zmiany poziomu parathormonu, wywołane zmianami stężenia wapnia w osoczu,

w niewyjaśniony jak dotąd sposób regulują aktywność 1-hydroksylazy-
i 24-hydroksylazy 25-kalcyferolu.

Wydaje się jednak, że obok parathormonu i wapnia również i inne czynniki biorą udział w regulacji metabolizmu 25—OH—D. Wykazano np. że nawet gdy myszy karmiono dietą o wysokiej zawartości wapnia, co jak wspomniano wyżej, hamuje w normalnych warunkach aktywność 1-hydroksylazy 25-kalcyferolu w nerkach, to przy niskim stężeniu fosforanów w diecie szybkość hydroksylacji 25—OH—D w pozycji C-1 α nie ulega wyraźnemu obniżeniu (4, 10, 77). Efekt ten być może ma związek z udziałem 1 α ,25—(OH) $_2$ —D $_3$ w resorpcji fosforanów w nerkach oraz we wchłanianiu fosforanów w jelicie (4, 10).

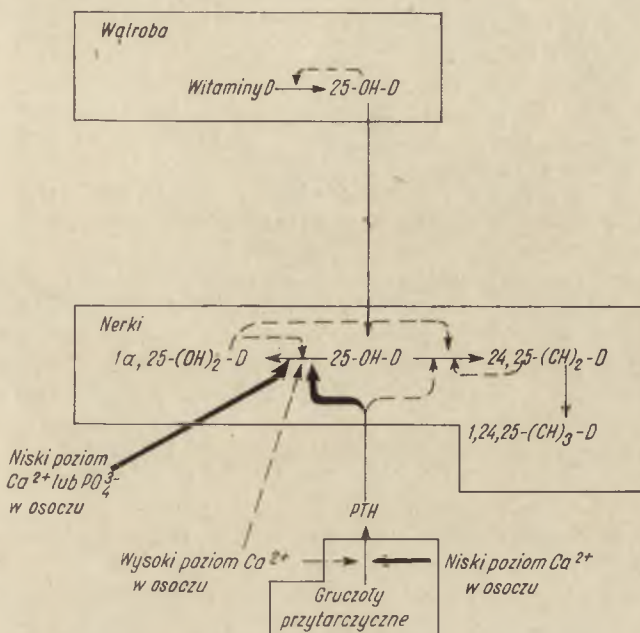
Interesujący aspekt regulacji przekształcenia 25—OH—D $_3$ do 1 α ,25—(OH) $_2$ —D $_3$ wiąże się z obserwacją, że w nerkach występuje białko cytoplazmatyczne, do którego 25—OH—D $_3$ wykazuje około 1000 krotnie większe powinowactwo ($K_m = 3 \times 10^{-9} M$) niż w stosunku do 1-hydroksylazy 25-kalcyferolu ($K_m = 2,2 \times 10^{-6} M$) (78). W związku z tym nie wyklucza się możliwości że substratem 1 α -hydroksylacji 25—OH—D jest kompleks 25—OH—D $_3$ z białkiem wiążącym. Możliwe jest również, że w miejscu przebiegu hydroksylacji istnieją warunki powodujące zmniejszenie powinowactwa białka wiążącego do 25—OH—D; a co za tym idzie, uwolnienie 25—OH—D w ilościach, które umożliwiają przebieg reakcji 1 α -hydroksylacji. Bez względu na to, która z tych dwu możliwości zachodzi rzeczywiście, wydaje się, że białko cytoplazmatyczne wiążące 25—OH—D w nerkach odgrywa istotną rolę w regulacji biosyntezy 1 α ,25—(OH) $_2$ —D $_3$.

Inny aspekt regulacji biosyntezy 1 α ,25—(OH) $_2$ —D $_3$ badali de Luca i wsp. (10). Śledzili oni wpływ aktynomycyny D i cykloheksimidu na poziom aktywności 1-hydroksylazy 25-kalcyferolu. Kurczętom na diecie nie zawierającej witaminy D $_3$ podawano dożylnie jeden z tych antybiotyków, a następnie w różnych odstępach czasu izolowano nerki i w homogenacie badano syntezę 1 α ,25—(OH) $_2$ —D $_3$. W przypadku tych obu inhibitorów biosyntezy białka stwierdzono wyraźny spadek aktywności enzymatycznej 1-hydroksylazy 25-kalcyferolu, przy czym wykluczono możliwość bezpośredniego wpływu tych antybiotyków na aktywność enzymu. Powyższe wyniki sugerują, że 1-hydroksylaza 25-kalcyferolu jest szybko metabolizowana, a „okres półtrwania” tego enzymu wynosi tylko 2,5 godziny, a „okres półtrwania” odpowiedniego m-RNA maksymalnie 6 godzin (4, 10). Nie wyklucza się także, że metabolizm tego enzymu pozostaje pod stałą kontrolą hormonalną.

Inną drogą regulacji poziomu 1 α ,25—(OH) $_2$ —D $_3$ w organizmie jest mechanizm inaktywacji tego związku. Stwierdzono, że 1 α ,25—(OH) $_2$ —D $_3$ indukuje w jelicie enzymy, które przeprowadzają jego destrukcję (10).

Ogólny schemat regulacji metabolizmu witamin D przedstawia rycina 6.

Jak wynika z omówionego wyżej aktualnego stanu wiedzy nad rolą metabolitów witamin D uzasadnione wydaje się, spotykane coraz częściej w piśmiennictwie, określanie witamin D jako prohormonów. Pod wieloma względami mechanizm działania tych związków przypomina mechanizm postulowany dla hormonów sterydowych, takich jak kortykoidy (79).



Ryc. 6. Regulacja metabolizmu witamin grupy D.

→ stymulacja procesu
 - - - - - hamowanie procesu.

Niezależnie od wartości poznawczej omówione prace mają poważny aspekt praktyczny. Stwierdzono na przykład, że w przypadku długotrwałej kuracji antydrgawkowej pojawiające się schorzenia kostne są wynikiem obniżenia w wątrobie aktywności 25-hydroksylazy kalcyferolu. Podanie takim chorym 25-OH-D₃ powoduje przywrócenie prawidłowego procesu kostnienia (4, 10). Niektóre schorzenia kostne mogą być również wywołane zmniejszeniem szybkości biosyntezy 1,25-(OH)₂-D w nerkach (4, 10). Stwierdzono, że w tych przypadkach podawanie dożylnie tego metabolitu powoduje znaczne polepszenie. W badaniach klinicznych często zastępuje się 1,25-(OH)₂-D₃ jego syntetycznym analogiem 1α-OH-D₃, gdyż można go, w przeciwieństwie do 1,25-(OH)₂-D₃ podawać doustnie bez utraty aktywności biologicznej (4). Związek ten, w warunkach podawania dootrzewnowo, wykazuje około 50% aktywności 1,25-(OH)₂-D₃ będąc przy tym znacznie tańszym w produkcji (4, 80).

PIŚMIENNICTWO

1. Wagner A. F., Folkers K., (1964) w *Vitamin and Coenzymes*, 1 wyd., str. 330—362, Interscience Publishers, New York.
2. Karlson P., (1971) w *Zarys biochemii* red. Surzycka A., 3 wyd., str. 304—306, 470, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
3. Richards J. H., Hendrikson J. B., (1964) *The Biosynthesis of Steroids, Terpens and Acetogenins*, 1 wyd., str. 305—326. W. A. Benjamin Inc. Amsterdam.
4. De Luca H. F., (1974) *Fed. Proc.* **33**, 2211—2219.
5. Schachter D., Finkelstein J. D., Kowalski S., (1964) *J. Clin. Invest.* **43**, 787—797.
6. Wassermann R. M., (1971) w *Annual Review of Biochemistry*, red. Snell E. E., Boyer P. D., Meister A., Sinsheimer R. L., t. 40, str. 512—532, Annual Reviews Inc. Palo Alto, California.
7. Avioli L. V., Haddad J. G., (1973) *Metabolism*, **22**, 507—533.
8. Rosenstreich S. J., Rich C., Volwiler W., (1971) *J. Clin. Invest.* **50**, 679—687.
9. Kodicek E., (1956) Fourth Intern. Cong. Biochem. 4th. Vitamin Metabolism str. 161—174, Wolstenholme G. K. E., O'Connor C. H. O., Little Brown, Boston.
10. Omdahl J. L., De Luca H. F., (1973) *Physiol. Rev.* **53**, 327—373.
11. Peterson P. A., (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 7748—7754.
12. Edelstein S., Lawson D. E. M., Kodicek E., (1973) *Biochem. J.* **135**, 417—426.
13. Lund J., De Luca H. F., (1966) *J. Lipid. Res.* **7**, 739—744.
14. Fraser D. R., Kodicek E., (1965) *Biochem. J.* **96**, 59—60.
15. Fraser D. R., Kodicek E., (1966) *Biochem. J.*, **100**, 67.
16. Fraser D. R., Kodicek E., (1968) *Biochem. J.*, **106**, 485—491.
17. Fraser D. R., Kodicek E., (1968) *Biochem. J.*, **109**, 457—467.
18. Holick M. F., De Luca H. F., (1971) *J. Lipid Res.* **12**, 460—465.
19. Blunt J. W., De Luca H. F., Schnoes H. K., (1968) *Biochemistry* **7**, 3317—3322.
20. Ponchon G., De Luca H. F., (1969) *J. Clin. Invest.* **48**, 1273—1279.
21. Ponchon G., Kennan A. L., De Luca H. F., (1969) *J. Clin. Invest.* **48**, 2023—2037.
22. Tucker G., Gagnon R. E., Haussler M. R., (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* **155**, 47—57.
23. Bahattacharyya M. H., De Luca H. F., (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **160**, 58—62.
24. Horsting M., De Luca H. F., (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 251—256.
25. Bhattacharyya M. H., De Luca H. F., (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 2974—2977.
26. Chen P. S., Bosman H. B., (1964) *J. Nutr.* **83**, 133—139.
27. Bruce H. H., Parkes A. S., (1950) *J. Endocrinol.* **7**, 64—81.
28. Suda T., De Luca H. F., Schnoes H. K., Ponchon G., Tanaka Y., Holick M. F., (1970) *Biochemistry* **9**, 2917—2922.
29. Kuntson J. C., De Luca H. F., (1974) *Biochemistry* **13**, 1543—1548.
30. Holick M. F., Kleiner-Bossaller A., Schnoes H. K., Kasten P. M., Boyle I. T., De Luca H. F., (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 6691—6695.
31. Holick M. F., Schnoes H. K., De Luca H. F., (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 803—804.
32. Holick M. F., Schnoes H. K., De Luca H. F., Suda T., Coussins R. J., (1971) *Biochemistry* **10**, 2799—2804.

33. Lawson D. E. M., Wilson P. W., Kodicek E., (1971) *Nature* (London), **230**, 228—230.
34. Norman A. W., Myrtle J. F., Midgett R. J., Nowicki H. G., Williams V., Popijak G., (1971) *Science*, **173**, 51—54.
35. Raisz L. G., Trummel C. L., Holick M. F., De Luca H. F., (1972) *Science*, **175**, 768—769.
36. Semmler E. J., Holick M. F., Schnoes M. E., De Luca H. F., (1972) *Tetrahedron Letters* **40**, 4147—4150.
37. Tanaka Y., De Luca H. F., Omdahl J. L., Holick M. F., (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1286—1288.
38. Holick M. F., Garabedian M., De Luca H. F., (1972) *Science*, **176**, 1146—1147.
39. Frolik C. A., De Luca H. F., (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 143—147.
40. Tanaka Y., De Luca H. F., (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1040—1044.
41. Fraser D. R., Kodicek E., (1970) *Nature*, **228**, 764—766.
42. Gray R. W., Boyle I., De Luca H. F., (1971) *Science*, **172**, 1232—1234.
43. Gray R. W., Omdahl J. L., Ghazarian J. G., De Luca H. F., (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 7528—7532.
44. Suda T., Horinchi N., Sasaki S., (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 512—519.
45. Ghazarian J. G., Schnoes H. K., De Luca H. F., (1973) *Biochemistry* **12**, 2555—2559.
46. Henry H. L., Norman A. W., (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 7529—7536.
47. Ghazarian J. G., Jefcoate C. R., Knutson J. C., Orme-Jonson W. H., De Luca H. F., (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 3026—3033.
48. Suda T., De Luca H. F., Schnoes H. K., Tanaka Y., Holick M. F., (1970) *Biochemistry* **9**, 4776—4780.
49. Okamura W. H., Norman A. W., Wing R. M., (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4194—4197.
50. Holick M. F., Semmler E. J., Schnoes H. K., De Luca H. F., (1973) *Science*, **180**, 190—191.
51. Holick M. F., Garabedian M., De Luca H. F., (1972) *Biochemistry* **11**, 2715—2719.
52. Holick M. F., De Luca H. F., Kasten P. M., Korycka M. F., (1973) *Science* **180**, 964—966.
53. Okamura W. M., Mitra M. N., Norman A. W., Piro M. R., Sine S. M., Wing R. M., (1974) *Fed. Proc.* **33**, 1974.
54. Suda T., Hallick R. B., De Luca H. F., Schnoes H. F., (1970) *Biochemistry* **9**, 1651—1657.
55. Hibberd K. A., Norman A. W., (1969) *Biochem. Pharmacol.* **18**, 2347—2355.
56. Tsai H. C., Wong R. G., Norman A. W., (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 5511—5519.
57. Haussler M. R., Myrtle J. F., Norman A. W., (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 4055—4064.
58. Brumbaugh P. F., Haussler M. R., (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **51**, 74—80.
59. Brumbaugh P. F., Haussler M. R., (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 1251—1257.
60. Chen T. C., De Luca H. F., (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 4890—4895.
61. Brumbaugh P. F., Haussler M. R., (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 1258—1262.
62. Lawson D. E. M., Emtage J. S., (1974) *Biochem. Soc. Spec. Publ.* **3**, 75—90.
63. Tsai H. C., Norman A. W., (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 622—627.

64. Corradino R. H., (1973) *Nature* (London), **243**, 41—43.
65. Emtage J. S., Lawson D. E. M., Kodicek E., (1974) *Biochem. J.* **140**, 239—247.
66. Melancon M. J. jr., De Luca H. F., (1970) *Biochemistry* **9**, 1658—1664.
67. Baryłko B., (1973) *Post. Biochem.*, **19**, 361—376.
68. Drescher D., De Luca H. F., (1971) *Biochemistry* **10**, 2308—2312.
69. Adams T. H., Wong R. G., Norman A. W., (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 4432—4442.
70. Goodman D. B. P., Haussler M. R., Rasmussen H., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 80—86.
71. Tanaka Y., De Luca H. F., (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **146**, 574—578.
72. Weber J. C., Pons V., Kodicek E., (1971) *Biochem. J.* **125**, 147—153.
73. Barnes M. J., Constable B. J., Morton L. F., Kodicek E., (1973) *Biochem. J.* **132**, 113—115.
74. Omdahl J. L., Gray R. W., Boyle I. T., Knutson J., De Luca H. F., (1972) *Nature, New Biology.* **237**, 63—64.
75. Boyle I. T., Grey R. W., De Luca H. F., (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2131—2134.
76. Garabadian M., Holick M. F., De Luca H. F., Boyle I. T., (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1673—1676.
77. Tanaka Y., De Luca H. F., (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* **154**, 566—574.
78. Colston K. W., Evens I. M., Galante L., Mac Intyre I., Moss D. W., (1973) *Biochem. J.* **134**, 817—820.
79. Grant I. K., (1969) w *Essays in Biochemistry* red. Campell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1—58, Academic Press, London.
80. Haussler M. R., Zerwekh J. E., Hesse R. H., Rizzardo E., Pechet M. M., (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2248—2258.

SPRAWOZDANIE

Kurs na temat „Zastosowanie izolowanych komórek wątroby i kanalików nerkowych w badaniach metabolicznych”

Paryż i Luzarches (Francja), 26—28 lipca 1975 r.

FEBS Advanced Course 38

Use of isolated liver cells and kidney tubules in metabolic studies.

W dniach 26—28 lipca 1975 roku, bezpośrednio po zakończeniu X Zjazdu Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS) w Paryżu odbył się kurs (FEBS Advanced Course 38) na temat „Zastosowanie izolowanych komórek wątroby i kanalików nerkowych w badaniach metabolicznych”. Organizatorami kursu byli: H. D. Söling (RFN), J. M. Tager (Holandia) i J. R. Williamson (USA). Kurs sfinansowała Federacja Europejskich Towarzystw Biochemicznych oraz firmy: Bayer AG, Boehringer Mannheim GmbH, Hoechst AG i Paul Martini-Stiftung eV.

W kursie uczestniczyło 85 naukowców stosujących w swoich badaniach izolowane komórki wątroby i kanaliki nerkowe. Najliczniej reprezentowane były: RFN (21 osób), Francja (14 osób), Anglia (12 osób), Holandia (10 osób) i USA (6 osób). Ponadto w kursie brali udział przedstawiciele Australii, Belgii, Danii, Hiszpanii, Norwegii, Szwajcarii i Włoch. Z Polski oprócz autorki sprawozdania w kursie uczestniczyli Profesorowie S. Angielski i L. Wojtczak.

Obrady pierwszego dnia odbyły się na Wydziale Farmacji Uniwersytetu Paryskiego w połączeniu z sympozjum (Post-FEBS Symposium III) na temat „Oddziaływanie mitochondriów i cytoplazmy w metabolizmie komórki”, organizowanym przez D. C. Gautheron i P. M. Vignais (Francja) z ramienia Francuskiego Towarzystwa Chemii Biologicznej i Francuskiej Grupy Bioenergetycznej. Obrady otworzył Sir Hans Krebs (Anglia). J. B. Chappell (Anglia) w referacie na temat transportu metabolitów przez błonę mitochondrialną podkreślił ograniczoną przepuszczalność błony mitochondriów wątroby dla glutaminienu i w związku z tym wątpliwy udział dehydrogenazy glutaminianowej w procesie wytwarzania amoniaku dla syntezy mocznika. Autor ten zwrócił uwagę na stymulujący wpływ leucyny na produkcję glutaminienu z α -ketoglutaranu i jonów amonowych oraz wytwarzanie amoniaku w reakcji katalizowanej przez dezaminazę adeninową.

Dużo uwagi poświęcono wewnątrzkomórkowemu rozmieszczeniu metabolitów. Dyskutowano użyteczność dwu metod rozdziału mitochondriów i cytosolu celem mierzenia w nich zawartości metabolitów. P. F. Zuurendonk (Holandia) omówił mianowicie izolowanie frakcji mitochondrialnej w wyniku wirowania przez olej silikonowy zawiesiny komórek wątroby po uprzedniej inkubacji z digitoniną celem uszkodzenia błony komórkowej. H. W. Heldt (RFN) natomiast celem rozdziału mitochondriów i cytosolu liofilizował zamrożoną wątrobę, homogenizował ją w mieszaninie czterochlorku węgla i heptanu, po czym poddawał frakcjonowanemu wirowaniu w gradencie gęstości. Mitochondria w tych warunkach gromadzą się we frakcji najlżejszej,

a frakcja cytosolu we frakcji najcięższej. T. Bücher (RFN) mówił o mitochondrialnych i cytoplazmatycznych potencjałach oksydoredukcyjnych, a E. C. Slater (Holandia) — o wewnątrz- i zewnątrzmitochondrialnych potencjałach fosforylacyjnych. J. R. Williamson (USA) w referacie na temat oddziaływania między mitochondriami i cytosolem w procesie glukoneogenezy i syntezy mocznika podkreślił znaczenie efektywnego transportu glutaminianu, asparaginianu i jabłczanu przez błonę mitochondrialną dla zachowania wysokiej syntezy glukozy i mocznika w izolowanych komórkach wątroby i w wątrobie poddawanej perfuzji.

W przerwie obrad organizatorzy i uczestnicy złożyli życzenia Sir Hans Krebsowi z okazji 75-tej rocznicy urodzin. Na tę uroczystość został przygotowany ogromny tort urodzinowy z 75 świeczkami.

W ciągu następných dwóch dni kurs odbywał się poza Paryżem w Luzarches, w ośrodku naukowo-szkoleniowym Fundacji Royaumont, znajdującym się w pomieszczeniach dawnego klasztoru. Szczególnie dużo czasu poświęcono na przedyskutowanie aspektów metodologicznych procesu izolowania komórek wątroby takich jak: rodzaj buforu stosowanego do perfuzji, szybkość perfuzji, obecność jonów wapnia w czasie perfuzji, ilość enzymów i ich stężenie w płynie stosowanym do perfuzji, obecność albuminy lub żelatyny w mieszaninie reakcyjnej. Głównymi dyskutantami w omawianiu w/w problemów byli: M. N. Berry (Australia), odkrywca metody izolowania komórek wątroby w wyniku trawienia wątroby kolagenazą i hialuronidazą w czasie perfuzji oraz Sir H. A. Krebs (Anglia), P. O. Seglen (Norwegia), J. Katz (USA) i K. R. Elliott (Anglia), którzy wprowadzili pewne modyfikacje do pierwotnej metody otrzymywania komórek wątroby szczura i innych zwierząt laboratoryjnych. R. van der Meer (Holandia) i P. Walter (Szwajcaria) przedstawili metodę perfuzji zawiesziny komórek wątroby, pozwalającą na zmianę mieszaniny reakcyjnej, zachowanie fizjologicznych stężeń substratów i kontrolowanie pO_2 i pH w czasie trwania doświadczenia. Porównano właściwości izolowanych komórek wątroby z hepatocytami hodowanymi w kulturach (J. C. Wanson, Belgia i U. Junge, RFN).

Stosunkowo niewiele czasu pozostało na omówienie problemów regulacji metabolizmu. J. Katz (USA) zwrócił uwagę na występowanie „jałowych” reakcji (tzw. futile cycles) w procesie metabolizmu glukozy w izolowanych hepatocytach na poziomie glukokinazy, fosfofruktokinazy i kinazy pirogronianowej. Omówiono regulację dehydrogenazy pirogronianowej (E. Siess, RFN) oraz rolę dehydrogenazy glutaminianowej w procesie syntezy mocznika (J. R. Williamson USA; H. Siess, RFN; J. D. McGivan, Anglia i A. J. Meijer, Holandia). Wykazano, że szybkość ureogenezy zależy od stopnia redukcji NADP oraz że w niskich stężeniach amoniaku aktywność dehydrogenazy glutaminianowej zależy od stosunku NAD(P)/NAD(P)H. Poruszano również problem regulacji hormonalnej metabolizmu glukozy w hepatocytach (P. Walter, Szwajcaria i A. Bosch, USA) i w izolowanych kanalikach nerkowych (F. Morel, Francja i W. Guder, RFN).

Na zakończenie obrad dyskusję podsumował Sir Hans Krebs. Zdaniem uczestników kursu, dyskusje na temat zastosowania izolowanych komórek wątroby i kanalików nerkowych w badaniach metabolicznych okazały się bardzo pożyteczne. Materiały kursu zostaną opublikowane przez wydawnictwo North-Holland Publishing Co.

J. Bryła

RECENZJA

Wydawnictwo pt. „Biochemistry of Nucleic Acids”

red. K. Burton

Butterworths University Park Press, Medical and Technical Publishing Co Ltd, Baltimore.

Książka jest jednym z 12 tomów seryjnego wydawnictwa dokonującego przeglądu współczesnej wiedzy z różnych dziedzin chemii i fizjologii. Butterworths University Park Press z Baltimore wspólnie z Medical and Technical Publishing Co LTD podjęły wydawanie publikacji przeglądowych w sposób seryjny co 2 lata w formie zbioru aktualnej wiedzy z poszczególnych dyscyplin.

Seria pierwsza obejmuje: biochemię, fizjologię, chemię nieorganiczną, chemię organiczną i chemię fizyczną.

Z zakresu biochemii wydano 12 tomów dotyczących następujących dziedzin:

1. Chemia makrocząsteczek, redaktor Profesor H. Gutfreund.
2. Biochemia ściany komórkowej i błon, redaktor Dr C. F. Fox.
3. Mechanizmy transdukcji energii, redaktor Profesor E. Racker.
4. Biochemia lipidów, redaktor Profesor T. W. Goodwin.
5. Biochemia węglowodanów, redaktor Profesor W. J. Whelen.
6. Biochemia kwasów nukleinowych, redaktor Profesor K. Burton.
7. Synteza aminokwasów i białek, redaktor Profesor H. R. V. Arnstein.
8. Biochemia hormonów, redaktor Profesor H. V. Rickenberg.
9. Biochemia różnicowania komórkowego, redaktor Dr. J. Paul.
10. Obrona i rozpoznawanie, redaktor Profesor R. R. Porter.
11. Biochemia roślin, redaktor Profesor D. H. Northoote.
12. Fizjologiczna i farmakologiczna biochemia, redaktor Dr. H. F. K. Blaschko.

W poszczególnych tomach pierwszej serii biochemicznej przeglądem objęto prace od roku 1967 do 1972 włącznie. Konsultantami wydawniczymi całej serii biochemicznej są H. L. Kornberg i D. C. Phillips. Tom 6 dotyczy biochemii kwasów nukleinowych i obejmuje następujące działy:

Oznaczanie sekwencji nukleotydurowej

Wpływ sekwencji nukleotydurowej na właściwości DNA

DNA i RNA chromosomów bakteryjnych i wirusowych

DNA eukariotyczny

Replikacja DNA u *E. coli*

Rekombinacja

Bakteryjna transkrypcja

RNA sterowana DNA polimeraza

Synteza rybosomalnego RNA u eukariotów i regulacja tego procesu

tRNA: struktura i biosynteza

Kwasy nukleinowe chloroplastów

Kolejne rozdziały opracowane są przez wybitnych specjalistów z poszczególnych dziedzin: W przeciwieństwie do artykułów w *Annual Reviews* rozdziały omawianego

wydawnictwa nie stanowią kompletnego zbioru i omówienia wszystkich prac ukazujących się na dany temat, lecz w sposób syntetyczny omawiają postęp w odnośnym dziale. Zgodnie z zapowiedzią wydawcy od 1974 roku zaczną się ukazywać poszczególne tomy o tych samych tytułach, jako seria druga i będą zawierały opis postępu jaki dokonał się w ciągu 2 lat w poszczególnych dziedzinach. Zawartą w omawianym tomie wiedzę podano w takiej formie, że może być zrozumiała zarówno przez zaawansowanych studentów jak i przez nie biochemików. Wydaje się, że omawiany tom 6 jak i cała seria biochemiczna może stanowić cenne uzupełnienie wielu bibliotek Instytutów Naukowych i Wyższych Uczelni.

T. Borkowski

KOMUNIKAT

**Międzynarodowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Lekarskiego,
Warszawa — Kraków, 9—15.VIII.1976 r.**

W związku z 200 rocznicą powołania w Polsce Komisji Zdrowia będącej pierwowzorem ministerstwa zdrowia i 110 rocznicą pierwszego Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich, Polskie Towarzystwo Lekarskie organizuje w dniach od 9 do 15 sierpnia 1976 r. Międzynarodowy Zjazd w Warszawie i Krakowie.

Celem Zjazdu jest zaprezentowanie dorobku medycyny polskiej oraz osiągnięć społecznych naszego kraju, a także zapoznanie polonii zagranicznej i społeczeństwa polskiego z wkładem Polaków w rozwój medycyny światowej. Zjazd będzie służył również poszerzeniu i pogłębieniu przyjaznych kontaktów, stworzy klimat i warunki do nawiązywania bezpośredniej współpracy między lekarzami praktykami i naukowcami środowisk polonijnych i lekarzami polskimi w kraju.

Program Zjazdu obejmuje 3-dniowe obrady w Warszawie i 3-dniową sesję wyjazdową w Krakowie.

Główne tematy obrad plenarnych:

- 1) Problemy współczesnego kształcenia i doskonalenia lekarzy.
- 2) Rehabilitacja i lecznictwo uzdrowiskowe.

Istnieje możliwość zorganizowania spotkań i dyskusji naukowych na inne tematy w zależności od zgłoszonych wcześniej zainteresowań uczestników.

W dniach od 16 do 23 sierpnia przewiduje się kilkudniowe wycieczki po Polsce, których trasy umożliwią zwiedzenie najważniejszych centrów kulturalnych Polski oraz sanatoriów i uzdrowisk. Bliższe informacje o zjeździe dla lekarzy polskiego pochodzenia przesyła Polskie Towarzystwo Lekarskie na prośbę zainteresowanych. Korespondencję w tej sprawie należy kierować na adres: Polskie Towarzystwo Lekarskie — Komitet Organizacyjny Międzynarodowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa — Al. Ujazdowskie 24, 00-478 Warszawa.

Uwaga: Przedstawiciele krajowych środowisk lekarskich i naukowych zostaną zaproszeni do udziału w Zjeździe bezpośrednio przez Polskie Towarzystwo Lekarskie.

SPIS TREŚCI

M. Żydowo, L. Żelewski—Profesor Włodzimierz Mozołowski — wspomnienie pośmiertne	3
W. Ostrowski—Kataliza biologiczna w 50-lecie krystalizacji ureazy przez J. B. Sumnera	11
J. Gniot-Szulżycka—Niedobory enzymatyczne leżące u podstaw mukopolisacharozydów	17
T. Gołaszewski—Kinaza tymidynowa	27
A. Grzebińska—Fitoaleksyny	53
M. K. Jurkowski—Fosfolipazy zwierzęce	65
E. Próchniewicz—Fizykochemiczne właściwości aktyny i jej rola w skurczu mięśnia	77
J. J. Zimowski—Metabolity witamin D i ich rola biologiczna	91
Sprawozdanie—Kurs nt. Zastosowanie izolowanych komórek wątroby i kanałków nerkowych w badaniach metabolicznych — <i>J. Bryła</i>	111
Recenzja	113
Komunikat	115

POSTĘPY BIOCHEMII

March 1976

ARTICLES IN POLISH

Volume 22 Number 1

M. Żydowo, L. Żelewski—Professor Włodzimierz Mozołowski—Obituary notice	3
W. Ostrowski—Biological Catalysis—Fiftieth Anniversary of the First Crystallization of Urease by J. B. Sumner—(Inst. Biochem. Med. School of Medicine, Kraków)	11
J. Gniot-Szulżycka—Mucopolisaccharidoses, Enzyme deficiencies—(Dept Biochem. Inst. Biol., M. Kopernik University, Toruń)	17
T. Gołaszewski—Thymidine Kinase—(Int. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	27
A. Grzeleńska—Fitoalexins—(Inst. Gen. Plant Breeding, Agricultural University, Warszawa)	53
M. K. Jurkowski—Animal Phospholipases—(Dept Gen. Chem. School of Medicine, Gdańsk)	65
E. Próchniewicz—Physicochemical Properties of Actin and its Role in Muscular Contraction—(Dept of Nerv. Sys. Muscle, Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	77
J. J. Zimowski—Metabolites of Vitamin D and Their Biological Function—(Inst. Biochem., University of Warsaw, Warszawa)	91
Meeting Report	111
Book review	113
Communication	115

POSTĘPY BIOCHEMII

— kwartalnik

Cena zł 20.—

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej

rocznie zł 80.—

półrocznie zł 40.—

Prenumeratę krajową przyjmują Oddziały RSW „Prasa — Książka — Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

— do dnia 25 listopada na styczeń, I-szy kwartał, I-sze półrocze roku następnego i na cały rok następny,

— do dnia 10 miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne składają zamówienia w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa — Książka — Ruch”. Zakłady pracy w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW oraz prenumeratorzy indywidualni, zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa — Książka — Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71 w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter) 00-901 Warszawa oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona—Ruch, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P. O. Box 1001, Poland. Please send payments to the account of Ars Polona—Ruch in Bank Handlowy S. A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, Poland.

Indeks 36969

ERRATA

W tomie 21 zeszyte 3 kwartalnika *Postępy Biochemii* w spisie treści w języku angielskim zamieszczono nieprawidłowy tytuł pracy A. Michalskiego. Poprawna forma tytułu powinna brzmieć: „Superoxide Dismutase”. Redakcja przeprosza autora i czytelników.

Piśmiennictwo: W artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawianej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nieuporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemicznej (IUB) według *Biochim. Acta*, (1972), 276, (1) np.

Pispa J. P., Buchanan F. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 247, 181—184.

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) inicjały autor(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stroną cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydawania, np.

Dixon M., Webb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Longmans Green and Co, London;

Grant J. K., (1969) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1—58, Academic Press, London

Załączniki: Każdy załącznik należy sporządzić w 2 egzemplarzach na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście, oraz oznaczyć (na górze strony ołówkiem) nazwiskiem 1-ego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk winny jasno opisywać ich treść zaznaczając z jakich (jakiej) prac(y) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny tj. wykresy, rysunki, schematy, lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzory cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: \triangle \square \circ \blacktriangle \blacksquare \bullet Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). O stopniu zmniejszenia ryciny w druku decyduje wydawca.

Podpisy i objaśnienia pod rycinami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można wpisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem.

Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku prac wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów od artykułu przeznaczonego do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

Redakcja prosi o właściwe pakowanie artykułów aby zabezpieczyć maszynopisy i ilustracje przed pogięciem.

SPIS TREŚCI

M. Żydowo, L. Żelewski—Profesor Włodzimierz Mozolowski—wspomnienie pośmiertne	3
W Ostrowski—Kataliza biologiczna w 50-lecie krystalizacji ureazy przez J. B. Sumnera	11
J. Gniot-Szulżycka—Niedobory enzymatyczne leżące u podstaw mukopolisacharozydów	17
T. Gołaszewski—Kinaza tymidynowa	27
A. Grzebińska—Fitoaleksyny	53
M. K. Jurkowski—Fosfolipazy zwierzęce	65
E. Próchniewicz—Fizykochemiczne właściwości aktyny i jej rola w skurczu mięśnia	77
J. J. Zimowski—Metabolity witamin D i ich rola biologiczna	91
Sprawozdanie—Kurs nt. Zastosowanie izolowanych komórek wątroby i kanałików nerkowych w badaniach metabolicznych— <i>J. Bryła</i>	111
Recenzja	113
Komunikat	115