

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

PSTBAH 21 (3)
273-357 (1975)

1975

tom 21 nr 3



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.

Układ maszynopisu: strona okładowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, 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 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.

Dr. Wojciech Roda

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1975 TOM 21 ZESZYT 3

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Pstbah 21(3)
273-356(1975)

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-Katzenellenbogen (Wrocław),
A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (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-Kramaska (Warszawa),
I. Szumiel (Warszawa)

Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1975

Nakład 2280 (2159+121)	Oddano do składania 21.3.1975 r.
Ark. wyd. 6,5 ark. druk. 5,5+2 kol.	Podpisano do druku w lipcu 1975 r.
Pap druk. sat. kl. V, 70 g 70×100	Druk ukończono w sierpniu 1975 r.
Zam. nr 445/75 B-58	Cena zł 20.—

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

JERZY DUSZYŃSKI *

Transport nukleotydów adeninowych w mitochondriach

Transport of Adenine Nucleotides in Mitochondria

Mitochondrion to organelum komórkowe, w którym zachodzą tak ważne procesy metaboliczne jak: synteza ATP, cykl Krebsa, β — oksydacja kwasów tłuszczowych, etapy cyklu mocznikowego i inne.

W mitochondrionie można wyróżnić: błonę zewnętrzną, przestrzeń międzybłonową, błonę wewnętrzną i przestrzeń wewnętrzną, zwaną matriks. Błony mitochondrialne są nie tylko barierami ograniczającymi przestrzenie mitochondrionu, lecz także miejscami ważnych przemian enzymatycznych, np. w wewnętrznej błonie umiejscowiony jest łańcuch oddechowy i układ oksydacyjnej fosforylacji.

Błona wewnętrzna różni się zdecydowanie swą przepuszczalnością od błony zewnętrznej. Ta ostatnia wydaje się przepuszczać cząsteczki zależnie od ich wielkości, co oznacza, że mogą przez nią łatwo przenikać cząsteczki o ciężarze cząsteczkowym poniżej 5000 (1,2). O przechodzeniu zaś cząsteczki przez błonę wewnętrzną decydują jej właściwości fizykochemiczne, a przede wszystkim to czy cząsteczka jest hydrofilna czy hydrofobna. Cząsteczki rozpuszczalne w lipidach z reguły łatwo przenikają przez błonę wewnętrzną. Zjonizowane, hydrofilowe cząsteczki naogół nie mogą biernie przenikać przez wewnętrzną błonę; wiele metabolitów mitochondrialnych posiada takie właśnie właściwości.

Słaba przepuszczalność błony wewnętrznej w stosunku do jonów wynika z jej podstawowych właściwości fizykochemicznych, a mianowicie błonowego potencjału elektro-chemicznego. Powstający na skutek wypompowywania protonów z matriks przez układ „pompy protonowej” znajdujący się w błonie wewnętrznej potencjał ten odgrywa najprawdopodobniej decydującą rolę w mechanizmie oksydacyjnej fosforylacji. By taki potencjał mógł powstać błona musi być bardzo szczelna wobec cząsteczek zdolnych do neutralizowania tego potencjału, a więc wobec cząsteczek zjonizowanych. Transport większości zjonizowanych metabolitów

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

Wykaz stosowanych skrótów: ATRA — atraktylozyd, BA — kwas bongrekowy, KT — kwasy tłuszczowe, K_d — stała dysocjacji, cyt. a — cytochrom a.

przez błonę zapewniają nośniki. Jednakże jednokierunkowe, nośnikowe przenoszenie zjonizowanych cząsteczek również wpływałoby na potencjał błonowy. Stąd też prawie każdy tego typu transport (za wyjątkiem układów generujących potencjał błonowy, a więc np. „pompy protonowej”) zachodzi albo na zasadzie symportu, a więc równoległym przenoszeniu jonów o znakach przeciwnych; albo antyportu, a więc przenoszeniu jonów o tym samym ładunku w kierunkach przeciwnych. Właśnie antyport jest głównym mechanizmem według którego dokonuje się transport nośnikowy przez wewnętrzną błonę mitochondrialną.

W mitochondriach, organellach o intensywnym metabolizmie, występują bardzo aktywne układy nośnikowe. Z tego właśnie powodu mitochondria są dogodnym obiektem do badań nad transportem nośnikowym przez błony biologiczne.

Zagadnienie transportu nukleotydów adeninowych skupiło uwagę dużej ilości laboratoriów. Stało się tak dlatego, że układ, który dostarcza mitochondriom ADP, a transportuje ATP do cytosolu, odgrywa w funkcjonowaniu komórki decydującą rolę. Również dość wczesne wykrycie specyficznych inhibitorów tego procesu wpłynęło na znaczne zaawansowanie wiedzy o transporcie nukleotydów adeninowych (w przypadku innych mitochondrialnych układów transportujących do chwili obecnej nie udało się znaleźć tak specyficznych inhibitorów). W roku 1962 odkryto, że pewne glikozydy rośliny *Atractylis gummifera* hamują oksydacyjną fosforylację (3,4). W roku 1964 stwierdzono, że hamują one również wiązanie nukleotydów adeninowych do błony mitochondrialnej (5). W roku 1965 wykazano, że hamują one transport nukleotydów adeninowych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną (6,7,8,9,10) i poznano ich strukturę (11). Od tego czasu datuje się szybki postęp badań nad transportem nukleotydów adeninowych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną.

I. Podstawowe cechy transportu nukleotydów adeninowych

Jak powiedziano wyżej, transport nukleotydów adeninowych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną przebiega na zasadzie antyportu. Przeniesieniu jednej cząsteczki nukleotydu z cytoplazmy do wnętrza mitochondrionu towarzyszy przeniesienie innej cząsteczki nukleotydu w kierunku odwrotnym. W ten sposób pule nukleotydów adeninowych w cytosolu i mitochondriach pozostają niezmienione, co ma duże znaczenie w regulacji metabolizmu komórkowego, zwłaszcza dla prawidłowego funkcjonowania mitochondrialnych procesów wytwarzających ATP oraz cytoplazmatycznych procesów zużywających ATP. Transport nukleotydów adeninowych przez błonę mitochondrialną nazywa się zwykle translokacją, a czynnik ulokowany w błonie mitochondrialnej, który ten transport umożliwia — translokazą. Stwierdzono (9), że translokacji podlegają wy-

łącznie ADP i ATP, podczas gdy AMP nie przenika przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, co ma dość istotne znaczenie dla metabolizmu komórkowego. Po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrialnej muszą się bowiem znajdować systemy enzymatyczne fosforylujące AMP do ADP. Po stronie zewnętrznej funkcję tę pełni kinaza adenylowa, ułożona w przestrzeni międzybłonowej, a wewnątrz mitochondrionu — fosfotransferaza GTP—AMP.

W procesie translokacji wymianie poprzez błonę mitochondrialną podlegać mogą zarówno cząsteczki ADP na ADP, ATP na ATP, jak i ADP na ATP. Używając ATP podwójnie znakowanego: ^{14}C w pierścieniu purynowym i ^{32}P w ostatniej grupie fosforanowej wykazano (12), że translokacji podlega cała cząsteczka, a nie jej reszty fosforanowe, jak to sugerowano wcześniej.

II. Specyficzność

Translokazę charakteryzuje wysoka specyficzność w stosunku do nukleotydów adeninowych. Nukleotydy o innej zasadzie, np. UTP, UDP, GTP, GDP, CTP i CDP w ogóle nie wiążą się z błoną mitochondrialną i nie ulegają translokacji (12,13). Wszelkie chemiczne modyfikacje pierścienia adeninowego bardzo obniżają powinowactwo nukleotydu do translokazy. I tak 1-N-tlenki nukleotydów adeninowych wiążą się około 10 razy słabiej z translokazą niż niemodyfikowane cząsteczki (14,15). Uważa się, że wprowadzenie podstawnika tlenowego do pierścienia adeninowego i tym samym zmniejszenie charakteru aromatycznego pierścienia osłabia hydrobowe oddziaływania adeniny z translokazą. Modyfikacja cząsteczki cukru w nukleotydzie powoduje również znaczne obniżenie jego powinowactwa do translokazy. W porównaniu z ADP i ATP, transport dezoksy-ADP i dezoksy-ATP jest znacznie wolniejszy (16). Również wszelkie zmiany w łańcuchu fosforanowym nukleotydu obniżają jego powinowactwo do translokazy. Transport adenozylo 5'-0-(dwufosfo-2,3-metylenofosforanu), adenozylo 5'-0-(dwufosfo-2,3-imidofosforanu) adenozylo 5'-0-hydrofosforanu i adenozylo 5-tetrafosforanu jest wolniejszy od transportu ADP czy ATP (17,18,19).

Ciekawe jest porównanie specyficzności translokazy nukleotydów adeninowych ze specyficznością układu oksydacyjnej fosforylacji. Istotny wpływ na reaktywność ADP w układzie oksydacyjnej fosforylacji mają wszelkie zmiany w łańcuchu fosforanowym nukleotydu, podczas gdy modyfikacje reszty cukrowej lub pierścienia adeninowego wywołują już znacznie mniejsze efekty (14,20,21,22). Natomiast, jak to już opisano, wszelkie modyfikacje części nukleozydowej nukleotydu obniżają drastycznie jego reaktywność z translokazą, a zmiany w łańcuchu fosforanowym wywołują słabsze efekty. Stąd też pogląd, że istotnym czynnikiem odpo-

wiedzialnym za absolutną specyficznosc oksydacyjnej fosforylacji w mitochondriach w stosunku do ADP jest wlasnie specyficznosc translokazy nukleotydw adeninowych (9,23,24,25,26).

III. Kinetyka translokacji

Problem, czy cala pula wewnatrzmitochondrialnego ADP i ATP podlega translokacji, byl obiektem kontrowersji w poczatkowym okresie badan. Pewni badacze uwazali, ze tylko czesc tej puli jest bezposrednio wymienialna z zewnatrznymi nukleotydami (10), natomiast inni, ze bezposredniej wymianie podlega cala pula (9). Hipoteze o niehomogenności wewnatrzmitochondrialnej puli ADP i ATP, istnienia kilku przedzialow w matriks mitochondrialnej wysunieto w polowie lat piecdziesiatych (27). W odróżnieniu od zewnatrznego ADP, wewnatrzmitochondrialne ADP nie moze byc nigdy ufosforylowane w 100%; przypuszczano wiec, ze czesc wewnatrzmitochondrialnego ADP musi sie znajdowac w przedziale mitochondrialnej matriks, izolowanym od ukkladu oksydacyjnej fosforylacji (28). Pogląd ten utrzymywal sie przez lata (29,30). Dopiero badania nad translokacją nukleotydw adeninowych wyjasnily te kwestie. Stwierdzono mianowicie, ze cala pula wewnatrzmitochondrialna ADP i ATP jest bezposrednio wymienialna (12,31). Tak wiec przypuszczenie o kilku przedzialach matriks nie znajduje tu potwierdzenia. Niemniej jednak w literaturze pojawiaja sie wciaz prace postulujace istnienie oddzielnych przedzialow w matriks mitochondrialnej (32,33).

Transport nukleotydw adeninowych jest reakcją pierwszego rzędu w stosunku do wewnatrzmitochondrialnej puli nukleotydw adeninowych (12).

Tabela 1

Wartość stałych kinetycznych transportu nukleotydw adeninowych w mitochondriach wątroby szczura

Ilość miejsc wiążących (μ mole/g białka mito.)	0,13		
Powierzchnia miejsca	4×10^4 (\AA^2 na cząsteczkę) = 250 ($\text{cm}^2/(\mu\text{mol})$)		
	Temperatura		
	0°C	20°C	37°C (ekstrapolowana)
Aktywność translokazy (μ mole/min/g białka)	7	200	1200
Liczba obrotów (min^{-1})	55	1600	1000
Szybkość przepływu przez powierzchnię błony ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{cm}^2$)	0,2	7	40

Na uwagę zasługuje bardzo silna zależność (34) aktywności translokazy od temperatury. Stwierdzenie tego typu zależności (35,13,4) było jednym z dowodów na nośnikowy charakter transportu nukleotydów adeninowych.

IV. Regulacja translokacji

Już w roku 1965 w pracowni Klingenberg'a wykazano, że ADP ze środowiska podlega szybszej translokacji niż ATP (9). Nie wykazano natomiast żadnych różnic w transporcie ADP i ATP z wnętrza mitochondriów (12). Różnice w transporcie zewnętrznych nukleotydów najlepiej się uwidaczniają w układzie kompetycyjnym, a więc takim, w którym obecne są w środowisku oba rodzaje nukleotydów. W takim właśnie układzie stwierdzono, że powinowactwo ADP do translokazy jest dziesięć razy większe niż powinowactwo ATP (12). Tylko mitochondria sprzężone, czyli zdolne do oksydacyjnej fosforylacji wykazują różne powinowactwo do ADP i ATP. Obniżenie stanu energetycznego mitochondriów, czy to przez dodanie czynników rozprzegających oksydacyjną fosforylację czy przez dodatek walinomycyny przy obecności jonów potasu w środowisku, wyrównuje powinowactwa ADP i ATP do translokazy. W takich mitochondriach szybkości transportu ADP i ATP są jednakowe.

Zjawisko różnego powinowactwa ADP i ATP do translokazy nie zostało jeszcze wytłumaczone w sposób, który zyskał ogólną akceptację. Klingenberg (34) wiąże bezpośrednio różne powinowactwo nukleotydów do translokazy z potencjałem elektrochemicznym na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Vigna is (36) postuluje, że translokaza w różnych stanach konformacyjnych charakteryzuje się różnym powinowactwem do nukleotydów.

W warunkach fizjologicznych cząsteczki ATP i ADP są zjonizowane. W łańcuchu trójfosforanowym ATP występują cztery protony zdolne do dysocjacji. W pH 7,0 wartości pK trzech z nich są niskie (pomiędzy 2 i 3), a pK czwartego protonu przybiera wartość 6,5. Tak więc, w środowisku obojętnym około 75% cząsteczek ATP występuje w postaci ATP^{4-} , a praktycznie cała reszta jako ATPH^{3-} . ADP zawiera trzy protony zdolne do dysocjacji. W pH 7,0 około 40% cząsteczek ADP występuje w roztworze w postaci ADP^{3-} , a praktycznie cała reszta w postaci ADPH^{2-} . W komórce przeważająca część ADP i ATP występuje w formie kompleksu z magnezem lub wapniem, przy czym ATP wykazuje około dziewięciokrotnie większe powinowactwo do tych kationów niż ADP. Przypuszcza się, że translokacji podlegają tylko wolne (nieskompleksowane) nukleotydy adeninowe (37).

Klingenberg uważa (34), że ADP zostaje przenoszone przez błonę jako ADP^{3-} . Pogląd ten oparł on na obserwacji, że wszystkie specyficzne inhibitory translokacji, kwas bongkrekowy, atraktylozyd i karbo-

ksyatraktylozyd posiadają co najmniej trzy ładunki ujemne i wszelkie chemiczne modyfikacje zmniejszające ilość ładunków do liczby poniżej trzech prowadzą do zatracenia zdolności inhibitorowych. Częsteczką AMP, która w swej najbardziej zjonizowanej formie może posiadać dwa ładunki ujemne, nie wykazuje zupełnie powinowactwa do translokazy. Tak więc najprawdopodobniej wymianie mogą podlegać: ADP^{3-} , ATP^{4-} i $ATPH^{3-}$.

Wymianę ADP^{3-} na $ATPH^{3-}$ nazywamy elektroneutralną, a wymianę ADP^{3-} na ATP^{4-} elektrogeną. Gdy w środowisku były obecne jony potasu i walinomycyna podczas pobierania przez mitochondria ATP, połączonego z uwalnianiem wewnętrznego ADP, zaobserwowano równoległe pobranie 0,4mola K^+ /1mol ATP (34). W podobnych warunkach — ale w obecności rozpręgacza powodującego przenikalność dla protonów — stwierdzono pobranie 0,6mola H^+ przy pobraniu 1mola ATP (38). Gdy ADP z zewnątrz wymieniało się z wewnątrzmitochondrialnym ATP (w obecności oligomycyny) stwierdzono uwolnienie 0,4mola H^+ na mol ATP (34). Stąd też sądzi się, że wymiana ATP na ADP jest w części elektroneutralna, a w części elektrogena.

W mitochondriach w stanie wysokoenergetycznym na błonie wewnętrznej ustala się potencjał z ładunkiem ujemnym po wewnętrznej stronie błony i dodatnim na zewnątrz. Potencjał ten powstaje w wyniku działania pompy protonowej, która sprawia, że wewnątrz mitochondrionu stężenie H^+ jest niższe niż w środowisku. Potencjał ten stymuluje elektrogeną wymianę ADP_{zew}^{3-} na ATP_{wew}^{4-} . Różnica stężeń protonów po obu stronach błony ułatwia elektroneutralną wymianę ADP_{zew}^{3-} na $ATPH_{wew}^{3-}$. Klingenberg uważał (12,31,34), że zmniejszone powinowactwo ATP ze środowiska do translokazy w mitochondriach w stanie wysokoenergetycznym może tłumaczyć dominujący elektrogeny charakter wymiany i istnienie potencjału błonowego. Tego typu mechanizm nie wyjaśniał obserwacji, że wymiana ATP na ATP przebiega wolniej niż wymiana ADP na ADP lub ADP_{zew} na ATP_{wew} (35).

By wytłumaczyć to zjawisko Klingenberg rozwinął swą hipotezę (39) i zaproponował tak zwany model różnego rozmieszczenia nośnika. Model ten zakłada, że cząsteczki nośnika mogą poruszać się w błonie tylko w połączeniu z ADP lub ATP (bez związanego nukleotydu nośnik zostaje unieruchomiony na powierzchni błony). Siły związane z potencjałem błonowym oddziałują na kompleks nośnika i nukleotydu adeninowego. Na skutek tych oddziaływań w mitochondriach sprzężonych, bardziej ujemnie naładowane kompleksy nośnika z nukleotydem liczniej występują na zewnętrznej powierzchni wewnętrznej błony, a nośniki o mniejszym ładunku ujemnym na wewnętrznej powierzchni tejże błony. Zakłada się, że nośniki połączone z ATP mają ładunek bardziej ujemny niż kompleksy nośnika z ADP, a zatem skupiają się na zewnętrznej powierzchni błony wewnętrznej. Stąd też utrudniony jest transport ATP do wnętrza mitochondrionu. Dodanie rozpręgacza znosi potencjał błonowy i tym samym

asymetryczne rozmieszczenie kompleksów nośnika z ATP i ADP zostaje również zniesione. W tych warunkach transport ATP ze środowiska przebiega z tą samą szybkością jak transport ADP.

Model „różnego rozmieszczenia naładowanego nośnika” nie tłumaczy jednak wielu obserwacji. I tak stwierdzono, że zależnie od stanu energetycznego mitochondriów zmienia się K_m zewnętrznego ATP do translokazy (40). W stanie niskoenergetycznym K_m jest niskie i równa się wartości K_m ADP, natomiast w stanie wysokoenergetycznym K_m jest znacznie większe od K_m ADP. Ostatnio Vignais opisał zmiany w K_m zewnętrznego ADP w zależności od stanu energetycznego mitochondriów (41). Model Klingenberga nie tłumaczy tych zmian w powinowactwie ADP czy ATP do translokazy. Nie tłumaczy również dlaczego powinowactwo wewnętrzmitochondrialnych nukleotydów jest takie samo (12). Trudno też wytłumaczyć na podstawie tego modelu zaobserwowaną różnicę w szybkości wymian: ATP na ATP i ATP_{zew} na ADP_{wew} .

Z tego powodu część badaczy stara się wyjaśnić różnice w transporcie zewnętrznego ATP i ADP istnieniem różnych form konformacyjnych translokazy (36,41,42). Powołują się oni jeszcze na następujące fakty doświadczalne. Stwierdzono mianowicie znaczny wpływ obecności ADP na charakter wiązania specyficznego inhibitora translokazy — ^{35}S -atraktylozydu do mitochondriów (36). Preinkubacja mitochondriów z ADP powoduje zanik w nich miejsc wiążących atraktylozyd z dużym powinowactwem. Vignais sądzi przeto, że zmiany w charakterze wiązania atraktylozydu są odbiciem zmian allosterycznych translokazy, pod wpływem ADP jako efektora. Tak też interpretuje się obserwację, że po preinkubacji mitochondriów z ADP translokacja nukleotydów adeninowych staje się czuła na odczynniki blokujące grupy sulfhydrylowe (43,44,45). Bez uprzedniej preinkubacji mitochondriów z ADP odczynniki te nie oddziałują na translokację. Również ostatnio opisano zmiany w objętości mitochondriów, które są związane ze zmianami w układzie translokazy w błonie mitochondrialnej (39). I tak ATP, ADP i kwas bongkrekowy powoduje skurcz mitochondriów (46,47,48,39,18), atraktylozyd powoduje ich rozkurcz (39).

Różne stałe prędkości transportu ADP i ATP do mitochondrionu (K_{ADP} , K_{ATP}) powodują, że stosunki ATP/ADP po obu stronach błony są różne. Opisuje to następujący wzór:

$$\left(\frac{ATP}{ADP}\right)_{zew} / \left(\frac{ATP}{ADP}\right)_{wew} = \left(\frac{K_{ADP}^{\rightarrow}}{K_{ATP}^{\rightarrow}}\right) / \left(\frac{K_{ADP}^{\leftarrow}}{K_{ATP}^{\leftarrow}}\right)$$

Symbolami K_{ADP}^{\leftarrow} i K_{ATP}^{\leftarrow} oznaczono stałe szybkości transportu ADP i ATP w kierunku na zewnątrz. Są one sobie równe.

Tak więc:

$$\left(\frac{ATP}{ADP}\right)_{zew} = \left(\frac{K_{ADP}^{\rightarrow}}{K_{ATP}^{\rightarrow}}\right) \times \left(\frac{ATP}{ADP}\right)_{wew}$$

W sprzężonych mitochondriach $K_{ADP}^{\rightarrow} > K_{ATP}^{\leftarrow}$, stąd też

$$\left(\frac{ATP}{ADP} \right)_{zew} > \left(\frac{ATP}{ADP} \right)_{wew}$$

Istotnie stwierdzono, że stosunek $\frac{ATP}{ADP}$ na zewnątrz jest wyższy niż wewnątrz mitochondriów (49,50,51). Obniżony wewnątrzmitochondrialny $\frac{ATP}{ADP}$ jest korzystny ze względów termodynamicznych dla syntezy ATP. W przestrzeni pozamitochondrialnej, tam gdzie głównie ATP jest zużywane, korzystne jest podniesienie tego stosunku.

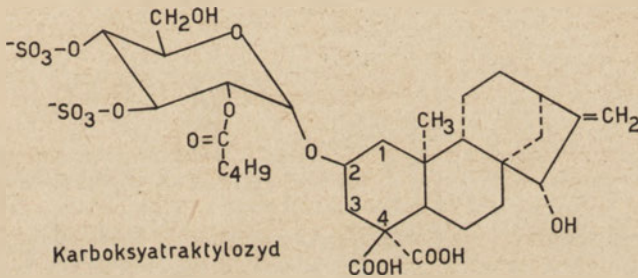
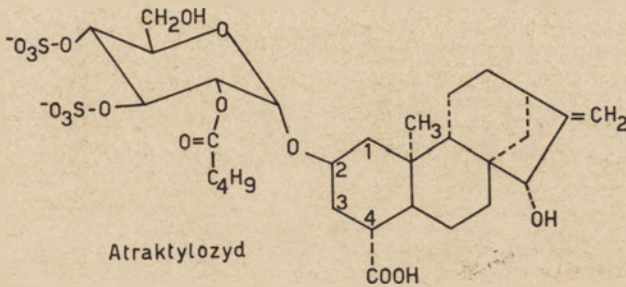
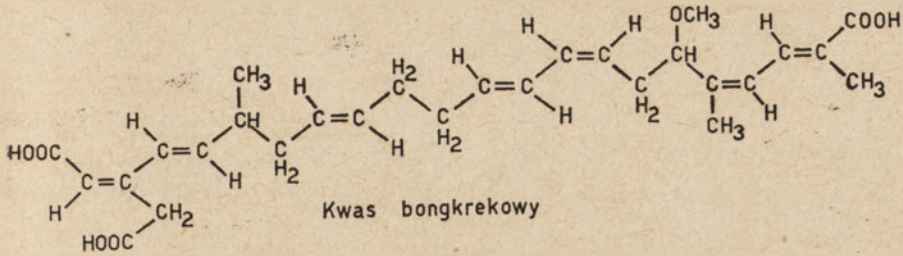
V. Inhibitory translokazy

Wprowadzenie wysoce specyficznych inhibitorów do badań nad translokacją nukleotydów adeninowych znacznie poszerzyło możliwości poznawcze w tej dziedzinie. Pierwszym chronologicznie odkrytym inhibitorem był atraktylozyd (5,9,10). W roku 1969 opisano w pracowni H. A. Lardy'ego inhibitorowe właściwości kwasu bongkrekowego (52). W roku 1971 wprowadzono do badań pochodną atraktylozydu, karboksyatraktylozyd (gumiferyna) (53,54,55,56,57,58).

Z rośliny *Atractylis gummifera*, produkującej atraktylozyd i karboksyatraktylozyd, hodowanej na podłożu z dodatkiem radioaktywnego siarczanu, otrzymano inhibitory piętnowane w siarce (54,59).

Użycie tych inhibitorów pozwoliło na bardziej wnikliwe badania działania translokazy na poziomie molekularnym. W trakcie pierwszych badań stwierdzono, że atraktylozyd jest inhibitorem kompetytywnym (60, 61), a kwas bongkrekowy (62) i karboksyatraktylozyd (54) inhibitorami niekompetytywnymi transportu nukleotydów adeninowych. Ciekawe jest, że do inhibitorowego działania kwasu bongkrekowego potrzebna jest kilkuminutowa preinkubacja tego związku z mitochondriami (63). Wszystkie opisane inhibitory cechują stałe dysocjacji w zakresie $5 \times 10^{-9} M$ — $2 \times 10^{-8} M$. Uważa się, że inhibitory translokazy nukleotydów adeninowych podobnie jak ADP i ATP, są ligandami translokazy.

Wiele informacji dotyczących molekularnych podstaw translokacji uzyskano badając oddziaływanie nukleotydów adeninowych z translokazą (16,64). Przeprowadzone doświadczenia wyglądają w zarysie następująco. Mitochondria inkubowane z ^{14}C ADP gromadzą pewną radioaktywność, na którą składa się zarówno ^{14}C ADP wymienione z wewnątrzmitochondrialną pulą nukleotydów adeninowych, jak i ^{14}C ADP związane z translokazą w błonie wewnętrznej. Jeśli mitochondria uprzednio preinkubować



Ryc. 1. Inhibitory translokazy nukleotydów adeninowych

z atraktylozdem, piętnowanie tego typu nie zachodzi (można jedynie obserwować piętnowanie spowodowane wiązaniem niespecyficznym oraz obecnością ^{14}C ADP w przestrzeni pozamitochondrialnej). Dodanie zaś atraktylozdu po inkubacji z ^{14}C ADP powoduje wyparcie radioaktywnego nukleotydu z miejsc wiążących translokazy, lecz nie usuwa piętna z wnętrza mitochondrionu. W opisanych doświadczeniach udało się uzyskać informację o ilości miejsc wiążących specyficznie ADP w mitochondriach. Opisano dwa rodzaje miejsc wiążących: o wysokim ($K_d \approx 0,3 \mu\text{M}$), o niskim ($K_d \approx 7 \mu\text{M}$) powinowactwie. Sugeruje się, że odpowiadają one wewnętrznym i zewnętrznym miejscom wiązania nukleotydów adeninowych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. W przypadku mitochondriów wątroby szczura obliczono, że stosunek miejsc wiążących do ilości cząsteczki cytochromu a wynosi 1,2 (mol/mol). W mitochondriach z serca szczura stosunek ten wynosi 2,2.

Stwierdzono następnie, że w mitochondriach z wątroby szczura ilość miejsc wiążących atraktylozyd i karboksyatraktylozyd jest identyczna z ilością miejsc wiążących specyficznie ADP (65, 54). ADP wypiera związany atraktylozyd (64). Związany karboksyatraktylozyd może zostać wyparty przez atraktylozyd i kwas bongkrekowy dodany wraz z ADP (oddzielne dodanie ADP i kwasu bongkrekowego nie wpływa na wiązanie karboksyatraktylozydu przez translokazę) (66,67). Z badań nad oddziaływaniem kwasu bongkrekowego i translokazy wynika, że niskie pH, podwyższona temperatura i dłuższa preinkubacja ułatwia zadziałanie tego inhibitora (68, 69, 70). W obecności kwasu bongkrekowego ^{14}C ADP wiąże się z translokazą znacznie silniej i tak związanego ^{14}C ADP nie wypiera już atraktylozyd (70).

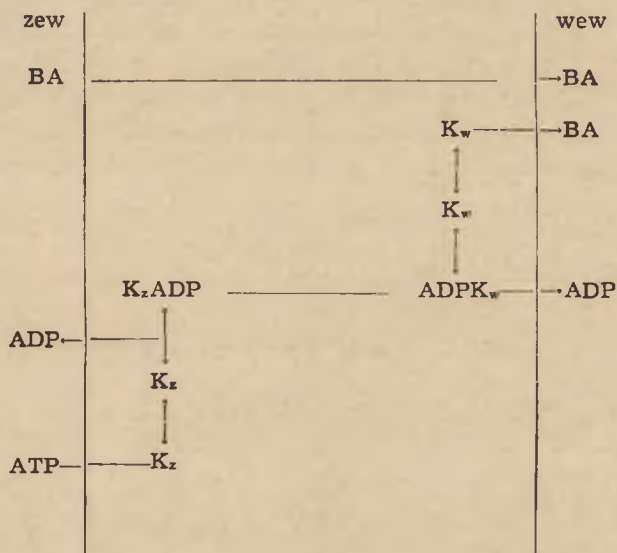
Tabela 2.

Wiązanie nukleotydów adeninowych z mitochondriami (34)

Cechy wiązania	Rodzaj mitochondriów			
	wątroba szczura ADP	serce szczura ADP	serce wołu ADP ATP	
miejsc wiążących/cyt. a % miejsc o wysokim i niskim powinowactwie	1,2	2,2	1,3	1,4
$K_d(\mu\text{M})$	100:0	25:75	20:80	17:83
specyficzność	0,5	0,1 4,1	0,1-0,3 4-7	0,6 12,0
zależność temperaturowa zależność od pH	wiązanie ADP i ATP, brak wiązania AMP lub nukleotydów o innej zasadzie niż adenina bardzo małe zmiany w K_d pomiędzy 0°C a 25°C zmniejszenie w ilości miejsc wiążących o 80% przy zmianie pH z 7,0 do 8,0; $pK = 7,2$			
wrażliwość chemiczna	na odczynniki reagujące z histydyną			

Na podstawie opisanych w tym rozdziale wyników opracowano molekularny model działania translokazy jako ruchomego nośnika (71, 72). Przyjęto, że jej regiony wiążące przemieszczają się z jednej strony błony na drugą, oraz że przemieszczenie to może zachodzić tylko wtedy, gdy ADP lub ATP znajduje się w miejscu wiążącym. Istnieje więc możliwość unieruchomienia wszystkich cząsteczek nośnika po tej stronie błony, po której nie będzie nukleotydów. W świeżo wyizolowanych mitochondriach, większość cząsteczek nośnika znajduje się po zewnętrznej stronie błony wewnętrznej, jako że zwykle brak jest w środowisku nukleotydów adeninowych. Atraktylozyd nie przenika przez błonę. Blokują on cząsteczki nośnika na stronie zewnętrznej błony. Kwas bongkrekowy może przenikać przez błonę i dlatego miejsca wiążące nośnika po obu stronach błony wewnętrznej są dla niego dostępne. W świeżo otrzymanych mitochondriach

kwask bongkrekowy wiąże się z nośnikiem głównie po stronie wewnętrznej błony, gdyż tam na skutek istniejącego gradientu pH na błonie następuje jego akumulacja (stąd też efekt pH, temperatury i czasu na działanie kwasu bongkrekowego).



Ryc. 2. Model działania translokazy nukleotydów adeninowych. (wg 72).

Symbolami K_z oznaczono cząsteczki nośnika przy zewnętrznej stronie błony, a K_w przy wewnętrznej stronie błony wewnętrznej mitochondriaru.

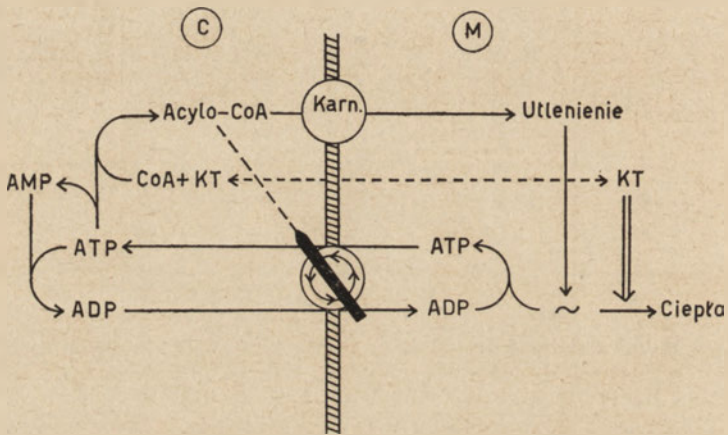
Model ten tłumaczy większość przedstawionych powyżej wyników. Nie jest to model idealny, jego główną wartością jest jednak, że jest on wyrazem dążności myślenia o transporcie nukleotydów adeninowych w kategoriach procesów molekularnych.

VI. Działanie tioestrów acylo-CoA na translokazę

W roku 1967 wykazano po raz pierwszy hamowanie translokacji nukleotydów adeninowych w mitochondriach przez oleinian (73). Tym samym wyjaśniono wcześniejszą obserwację, że kwasy tłuszczowe w niskich stężeniach hamują mitochondrialną ATP-azę stymulowaną przez DNP (74). W 1971 wykazano, że za zahamowanie translokazy przy dodatku kwasów tłuszczowych do preparatu mitochondrialnego odpowiedzialne są głównie ich zaktywowane pochodne, czyli tioestry kwasów tłuszczowych z CoA (75, 76, 77).

Tioestry acylo-CoA, znane już wcześniej jako inhibitory kilku enzymów mitochondrialnych (78, 79, 80, 81, 82), okazały się bardzo silnymi inhibitorami transportu nukleotydów adeninowych do wnętrza mitochon-

driów. Oznaczono stałe inhibitorowe (K_i) różnych tioestrów acylo-CoA (83). Najsilniejsze działanie inhibitorowe wykazują myrystoilo- i palmitoilo-CoA (są to tioestry CoA i kwasów tłuszczowych 14- i 16-węglowych). Wraz ze zmniejszaniem, jak i zwiększaniem liczby węgli w podstawniku acylowym (w porównaniu z 14- i 16-węglowymi podstawnikami) stałe inhibitorowe tioestrów acylo-CoA rosną wyraźnie, a więc ich zdolności inhibitorowe maleją. Tioestry acylo-CoA są związkami powierzchniowo czynnymi. Choć detergenty hamują też w pewnym stopniu aktywność translokazy nukleotydów adeninowych (84), działanie tioestrów acylo-CoA na translokazę nie sprowadza się wyłącznie do ich działania detergentowego.

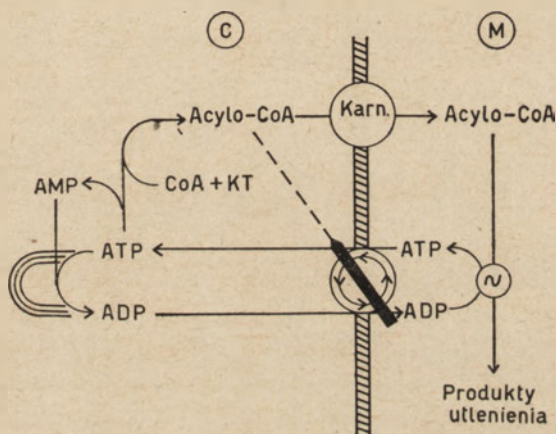


Ryc. 3. Mechanizm regulacji metabolizmu energetycznego brunatnej tkanki tłuszczowej przez długołańcuchowe acylo-CoA (87)
C, M — oznaczają przedziały: cytoplazmatyczny i wewnątrzmitochondrialny (matriks). Karn. — symbolizuje układ acylotransferazy karnitynowej.

Tioestry acylo-CoA występują w tkankach zwierzęcych i stąd przypuszczenie, że silne hamowanie przez nie aktywności translokazy może mieć znaczenie regulacyjne. Działanie to może odgrywać rolę w regulacji przemian kwasów tłuszczowych, a mianowicie ich utleniania czy estryfikacji do trójglicerydów (75). Na podstawie zaobserwowanego wyższego poziomu acylo-CoA w wątrobie szczura z cukrzycą alloxanową i w wątrobie hibernującej wiewiórki, zaproponowano regulatorową rolę tych związków w metabolizmie tych tkanek (85,86). W o j t c z a k (87) postuluje znaczenie regulatorowe tioestrów acylo-CoA w metabolizmie brunatnej tkanki tłuszczowej. W wyizolowanych z tej tkanki mitochondriów stwierdzono zahamowanie translokazy nukleotydów adeninowych. Można je było odwrócić przez dodanie albuminy surowiczej, która — jak wiadomo — silnie wiąże kwasy tłuszczowe a także tioestry acylo-CoA, dlatego uważa się, że za to zahamowanie odpowiedzialne są zewnątrzmitochondrialne tioestry acylo-CoA. Ponieważ główną funkcją tej tkanki jest ter-

mogenezą autorzy proponują mechanizm, w którym tioestry acylo-CoA mają regulować metabolizm tej tkanki.

Schemat można opisać następująco. Głównym substratem oddechowym mitochondriów brunatnej tkanki tłuszczowej są kwasy tłuszczowe. W przestrzeni cytoplazmatycznej zachodzi synteza acylo-CoA, który następnie, przy udziale układu transferazy karnitynowej, dostaje się do wnętrza mitochondrionu (88,89) i ulega utlenieniu dostarczając energii do produkcji ATP. W przypadku nadmiernej produkcji ATP i jego transportu do cytoplazmy wzrasta ilość acylo-CoA i zachodzi hamowanie transportu nukleotydów adeninowych przez błonę wewnętrzną. Wówczas energia utleniania przekształca się głównie w ciepło na skutek częściowego rozprężenia mitochondriów działaniem wolnych kwasów tłuszczowych. Gdy natomiast poziom ATP w przestrzeni cytoplazmatycznej jest niski, słaba jest również produkcja acylo-CoA i cała jego ilość ulega transportowi do wnętrza mitochondrionu i utlenieniu.

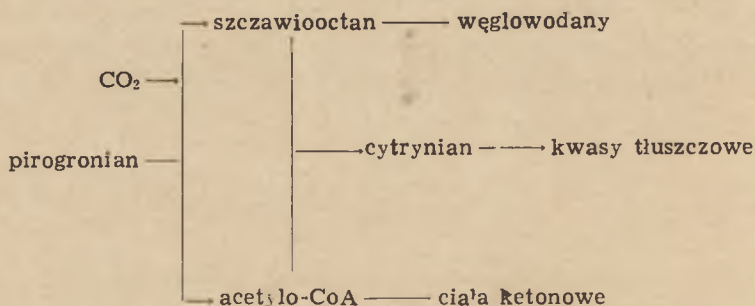


Ryc. 4. Mechanizm regulacji metabolizmu energetycznego komórki przez długołańcuchowe acylo-CoA. (Oznaczenia jak na rycinie 3)

Podobny, lecz bardziej ogólny schemat dotyczący mitochondriów innych tkanek, zaproponowali Wojtczak i wsp. na IX Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym w Sztokholmie w 1973 r. (90). Schemat ten zakłada, że intensywność oddychania regulowana jest nie tylko poziomem ADP w komórce, lecz i jego dostępnością do miejsc syntezy ATP w błonie mitochondrialnej, co z kolei zależy od ilości acylo-CoA powstającego w przestrzeni cytoplazmatycznej (90).

Zaproponowano regulatorowe działania acylo-CoA przez inhibicję translokazy w ketogenezie (91, 92) i w regulacji karboksylacji pirogronianu (93, 94). Karboksylacja pirogronianu jest reakcją enzymatyczną o kluczowym znaczeniu w regulacji glukoneogenezy, ketogenezy i lipogenezy w wątrobie.

Powstanie szczawiooctanu z pirogronianu (karboksylaza pirogronianowa) będzie nasilało glukoneogenezę lub też tłumilo ketogenezę poprzez włączanie acetylo-CoA, prekursora ciał ketonowych, do cytrynianu. Cytrynian zaś jest w przestrzeni cytoplazmatycznej prekursorem kwasów tłuszczowych. Badając wyizolowane mitochondria w stanie tak zwanym „aktywnym” (95) stwierdzono, że tioestry acylo-CoA zwiększają szybkość karboksylacji pirogronianu (93). Uważa się, że jest to skutkiem wzrostu wewnątrzmitochondrialnego stosunku ATP/ADP w wyniku zahamowania wymiany powstającego ATP z zewnętrznym ADP (96). ATP jest niezbędnym dostarczycielem energii dla karboksylacji pirogronianu, podczas gdy ADP jest inhibitorem odpowiedniej karboksylazy.



Tioestry acylo-CoA hamują również transport cytrynianu i jabłczanu przez błony mitochondrialne (97). Stałe inhibitorowe w tej inhibicji są jednak o rząd wielkości wyższe niż w inhibicji translokazy nukleotydów adeninowych (83). Stąd też propozycję regulatorowego znaczenia tej inhibicji w lipogenezie (97) należy traktować ostrożnie.

W badaniach z użyciem izolowanych komórek i całych organów jak narazie nie udało się wykazać regulatorowej roli tych związków. Można to tłumaczyć między innymi wpływem jonów magnezu i wapnia. Stwierdzono mianowicie, że kationy wielowartościowe mogą modyfikować oddziaływanie acylo-CoA z błoną mitochondrialną (37).

Podniesiono również problem, czy tioestry acylo-CoA mogą działać inhibitorowo od strony wewnętrznej (matriks). Jak narazie nie udało się tego wykazać, a jest to istotne, gdyż przy pomocy bardzo szybkiej i subtelnej metody rozdziału komórki na frakcję cytosolu i organelli (98) wykryto, że około 80% CoA w hepatocycie jest zlokalizowane wewnątrzmitochondrialnie (99).

VII. Biosynteza translokazy

Przykładem oryginalnego podejścia do zagadnienia struktury translokazy są badania genetyczne.

W roku 1972 Kolarov i wsp. (100) stwierdzili, że w punktowym mutancie jądrowym drożdży op_1 , który charakteryzuje się utratą aktyw-

ności układu oksydacyjnej fosforylacji, translokaza nukleotydów adeninowych wykazuje bardzo zmienione właściwości. Na podstawie badań nad tym mutantem uważa się, że punktowa mutacja jądrowa może wpływać bezpośrednio na właściwości translokazy. Oznacza to, że jądrowy DNA koduje przynajmniej jej część. W roku 1973 Haslam i wsp. (101) donieśli o braku wiązania i transportu ADP czułego na atraktylozyd w mitochondriach wyizolowanych z komórek *Saccharomyces cerevisiae* hodowanych w obecności erytromycyny (hamującej mitochondrialną syntezę białka) lub też z mutantów petite (charakteryzujących się brakiem mitochondrialnego DNA i obniżoną zawartością cytochromów). Natomiast mitochondria otrzymane ze szczepu dzikiego wykazują czuły na atraktylozyd transport i wiązanie ADP (102), nawet jeśli hodzi się je w warunkach beztlenowych, co pozbawia ich cytochromów i układu syntetyzującego ATP w oksydacyjnej fosforylacji. Fakty te świadczą o uczestnictwie mitochondrialnej syntezy białka w powstawaniu translokazy. Badania przeprowadzone nad innymi układami mitochondrialnego transportu, nie wykazały udziału mitochondrialnej syntezy białka w ich powstawaniu (103). Okazało się jednak, że mitochondria otrzymane z mutantów petite nie posiadają wewnętrznych nukleotydów adeninowych. Gdy preinkubować takie mitochondria ze 100 mM ATP, część ATP bierze udział w przenikaniu przez błonę. W tak naładowanych mitochondriach otrzymanych z mutantów petite można już zaobserwować czułą na atraktylozyd translokację.

Ostatnio rozpoczęto badania dotyczące izolowania mutantów drożdży nieczułych na inhibitor translokazy, kwas bongkrekowy (104, 105). Są to mutanty jądrowe. Genetyczne badanie translokazy jest dziedziną nową i w przyszłości na pewno dostarczy wielu danych o strukturze i biosyntezie translokazy.

VIII. Próby izolacji

Od kilku lat podejmuje się próby wyizolowania translokazy nukleotydów adeninowych (106). Najtrudniejszym zadaniem w opracowaniu procedury izolacji jest ustalenie testu, który by wskazywał, że oczyszczone białko jest właśnie translokazą. Przebadano możliwość użycia w tym celu oddziaływań pomiędzy translokazą a jej ligandami. Wiązanie ATP i ADP z białkiem jest mało specyficzne i bardzo labilne. Wiązanie się ^{35}S -atranktylozydu, a zwłaszcza ^{35}S -karboksyatranktylozydu z translokazą wydaje się znacznie pewniejszym sprawdzianem. Obiecujące wydają się również próby powiązania ^{14}C -NEM i nośnika wiązaniem kowalencyjnym, a następnie śledzenie piętna w trakcie procedury izolacji. Pracując tą metodą w laboratorium Klingenberga uzyskano wyniki (107), wskazujące, że translokaza jest białkiem błonowym o masie cząsteczkowej 30 000. Cie-

kowym testem na określenie, czy białko jest nośnikiem, może być próba wzbudzenia transportu nukleotydów adeninowych przez błony liposomów, pod wpływem dodania do liposomów badanego białka (108).

Mimo dziesięciu lat intensywnych badań translokaza nukleotydów adeninowych wciąż skupia uwagę dużej ilości laboratoriów. Ostatnio postuluje się (109), że translokaza może być bezpośrednio związana z układem oksydacyjnej fosforylacji. ADP zewnątrzmitochondrialny w powiązaniu z translokazą podlegałby fosforylacji do ATP, bez uprzedniego wejścia do przestrzeni matriks. Hipoteza ta stwarza nowe perspektywy dla badań nad translokazą nukleotydów adeninowych.

Artykuł nadszedł 31.1.1975; po rewizji autorskiej otrzymano 13.2.1975.

PIŚMIENNICTWO

1. Wojtczak L., (1974), *Rev. Roum. Physiol.*, **11**, 173—185.
2. Ernster L., Kuylenstierna B., (1969), *Mitochondria, Structure and Function*, red. L. Ernster, Z. Drahota, str. 5—31, Academic Press, London.
3. Bruni A., Contessa A. A., Luciani S., (1962), *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 301—311.
4. Vignais P. V., Vignais P. M., Stanislas E., (1962), *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 284—300.
5. Bruni A., Luciani S., Contessa A. R., (1964), *Nature* **201**, 1219—1220.
6. Chapell J. B., Crofts C. R., (1960), *Biochem. J.*, **95**, 707—716.
7. Kemp A., Slater E. C., (1964), *Biochim. Biophys. Acta* **92**, 178—180.
8. Heldt H. W., Jacobs H., Klingenberg M., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 174—179.
9. Pfaff E., Klingenberg M., Heldt M. W., (1965), *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 312—315.
10. Duée E. D., Vignais P. V., (1965), *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 184—188.
11. Piozzi F., Quilico A., Ajello T., Spirio V., Melera A., (1965), *Tetrahedron Letters*, **23**, 1829—1833.
12. Pfaff E., Klingenberg M., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **6**, 66—79.
13. Duée E. D., Vignais P. V., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 3920—3911.
14. Schlimme E., Lamprecht W., Eckstain F., Goody R. S., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **40**, 485—491.
15. Schlimme E., Schäfer G., (1972), *FEBS Letters* **20**, 359—363.
16. Weidemann M. I., Erdelt H., Klingenberg M., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **16**, 313—335.
17. Duée E. D., Vagnais P. V., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 546—553.
18. Klingenberg M., Grebe K., Scherer B., (1971), *FEBS Letters* **16**, 253—256.
19. Vignais P. V., Setondji I., Ebel I. P., (1971), *Biochimie*, **53**, 127—129.
20. Hohnadel D. C., Cooper C., (1972), *Biochemistry*, **11**, 1138—1144.
21. Hoppel Ch., Cooper C., (1969), *Arch. Biophys. Biochem.*, **135**, 184—193.
22. Hohnadel D. C., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **31**, 180—185.

23. Brierley G., O'Brien R. L., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 4532—4539.
24. Vignais P. V., Duée E. D., (1966), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **48**, 1169—1187.
25. Winkler H. H., Bygrave F. L., Lehninger A. L., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 20—28.
26. Souverijn J. H. M., Weijers P. J., Groot G. S. P., Kemp A., Jr., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **223**, 31—35.
27. Shug A. L., Shrago E., (1973), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 659—665.
28. Pressman B. C., (1958), *J. Biol. Chem.*, **232**, 967—978.
29. Azzone G. F., Ernster L., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 1510—1517.
30. Biarley G., O'Brien R. L., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 4532—4539.
31. Klingenberg M., Pfaff E., (1968), w *Metabolic Roles of Citrate*, red. T. W. Goodwin, str. 105—122, Academic Press, New York.
32. Tokomitsu Y., Ui M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 310—324.
33. Tokomitsu Y., Ui M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 325—337.
34. Klingenberg M., (1970), *Essays in Biochemistry* **6**, 119—159.
35. Pfaff E., Heldt H. W., Klingenberg M., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **10**, 484—493.
36. Vingais P. V., Vingais P. M., Colomb M. G., (1970), *FEBS Letters* **8**, 328—332.
37. Duszyński J., Wojtczak L., (1975), *FEBS Letters*, **50**, 74—79.
38. Klingenberg M., Wulf R., Pfaff E., Heldt H. W., (1969), w *Mitochondria: Structure and Function*, red. L. Ernster, Z. Drahotka, str. 59—77, Academic Press, London, New York.
39. Scherer B., Kingenberg M., (1974), *Biochemistry* **13**, 161—170.
40. Souverijn J. H. M., Huisman L. A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **305**, 185—198.
41. Vignais P. V., Vignais P. M., Laquin G., Morel F., (1973), *Biochimie* **55**, 763—778.
42. Souverijn J. H. M., (1974), Thesis, Amsterdam.
43. Vignais P. V., Vignais P. M., (1972), *FEBS Letters* **26**, 27—31.
44. Leblanc P., Clauser H., (1971), *FEBS Letters* **23**, 107—113.
45. Vignais P. V., Vignais P. M., (1971), *FEBS Letters* **13**, 28—32.
46. Stoner E. D., Sirak H. D., (1970), *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, **29**, 734—737.
47. Stoner C. D., Sirak M. D., (1973), *J. Cell Biol.*, **56**, 51—64.
48. Stoner C. D., Sirak H. D., (1973), *J. Cell Biol.*, **56**, 65—73.
49. Slater E. C., Rosing I., Mol A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 534—553.
50. Heldt H. W., Klingenberg M., Milowancew M., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **30**, 434—440.
51. Klingenberg M., Heldt H. W., (1969), w *The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria*, red. S. Papa, J. Tager, J. M. Quagliariello, E. C. Slater, str. 236—253, Bari, Adriatica Editrice.
52. Lardy H. A., (1969), w *Inhibitors — Tools in Cell Research*, red. Th. Bücher, H. Sies, str. 353, Springer-Verlag, Berlin.
53. Stanislas E., Vignais P. M., (1964), *C.R. Acad. Sci. Paris* **259**, 4872—4875.
54. Vignais P. V., Vignais P. M., Dafaye G., (1971), **17**, 281—288.
55. Danielli B., Bombardelli E., Bonati A., Gabetta B., (1971), *Fitoterapia* **42**, 91—94.

56. Danielli B., Bombardelli E., Bonati A., Gabetta B., (1972), *Fitoterapia* **11**, 3501—3506.
57. Defaye G., Vignais P. M., Vignais P. V., (1972), *FEBS Letters* **25**, 325—328.
58. Luciani S., Martini N., Santi R., (1971), *Life Sci.* **10**, 961—968.
59. Vignais P. V., Vignais P. M., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 843—847.
60. Vignais P. V., Vignais P. M., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **14**, 559—564.
61. Bruni A., Luciani S., Bortignon C., (1965), *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 434—441.
62. Kemp A., Souverijn J. H. M., Out T. A., (1971), w *Energy Transduction in Respiration and Photosynthesis*, red. E. Quagliariello, S. Papa, C. S. Rossi, str. 959—969, Bari, Adriatica Editrice.
63. Henderson P. J. F., Lardy H. A., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1319—1326.
64. Winkler H. H., Lehninger A. L., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3000—3008.
65. Klingenberg M., Falkner G., Erdelt H., (1971), *FEBS Letters* **16**, 296—300.
66. Vignais P. V., Vignais P. M., Defaye G., (1973), *Biochemistry* **12**, 1508—1519.
67. Weidemann M. J., Erdelt H., Klingenberg M., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 363—370.
68. Heldt H. W., (1969), *FEBS Letters* **5**, 11—14.
69. Klingenberg M., Grabe K., Heldt H. W., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 344—351.
70. Erdelt H., Weidemann M. J., Buchholz M., Klingenberg M., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **30**, 107—122.
71. Klingenberg M., Buchholz H., Erdelt H., Falkner G., Grebe K., Kadner H., Cherer B., Stengel-Rutkowski L., Weidemann M. J., (1972), w *Biochemistry and biophysics of mitochondrial membranes*, red. G. F. Azzone, E. Carafoli, A. L. Lehninger, E. Quagliariello, N. Siliprandi, str. 465—486, Academic Press, New York, London.
72. Klingenberg M., Buchholz M., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **38**, 346—358.
73. Wojtczak L., Załuska H., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 76—82.
74. Bos C. J., Emmelot P., (1962), *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 21—29.
75. Pande S. V., Blanchaer M. C., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 402—411.
76. Shug A. L., Lerner E., Elsen C., Shrago E., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 557—563.
77. Harris R. A., Farmer B., Azawa T., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 199—209.
78. Numa S., Bortz W. M., Lynen F., (1965), *Advn. Enzyme Regul.*, **3**, 407—423.
79. Eger-Neufeldt I., Feinzer A., Weiss L., Wieland O., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 43—48.
80. Tubbs P. K. (1963), *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 608—609.
81. Wieland O., Weiss L., (1964), *Advn. Enzyme Regul.*, **2**, 85—99.
82. Rydstrom J., Panov A. V., Paradies G., Ernster C., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1389—1397.

83. Morel F., Lauquin G., Lunardi J., Duszyński J., Vignais P. V., (1974), *FEBS Letters* **39**, 133—138.
84. Duszyński J., Wojtczak L., (1974), *FEBS Letters* **40**, 72—76.
85. Shug A., Ferguson S., Shrago E., Burlington R. F., (1971), *Biochim Biophys. Acta* **226**, 309—312.
86. Lerner E., Shug A. L., Elson Ch., Shrago E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1513—1519.
87. Christiansen E. N., Drahota Z., Duszyński J., Wojtczak L., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **34**, 506—512.
88. Yates D. W., Garland P. B., (1967), Abstract 4th FEBS Meeting, str. 127, Oslo.
89. Tubbs P. K., Chase J. F. A., (1967), Abstract 4th FEBS Meeting, str. 135, Oslo.
90. Wojtczak L., Duszyński J., Komosińska M., Wojtczak A. B., (1973), 9th International Congress of Biochemistry, Stockholm, Symposium Lecture 8, Sol. 1.
91. Vaartjes W. J., Kemp A., Souverijn J. H. M., Van den Bergh S. G., (1972), *FEBS Letters* **23**, 303—308.
92. Vaartjes W. J., Lopes-Cardozo M., Van den Bergh S. G., (1972), *FEBS Letters* **26**, 117—122.
93. Wojtczak A. B., Lenartowicz E., Rodionova M. A., Duszyński J., (1972), *FEBS Letters* **28**, 253—258.
94. Lopes-Cardozo M., Vaartjes W. J., Van den Bergh S. G., (1972), *FEBS Letters* **28**, 265—270.
95. Chance B., Williams G. R., (1956), *Advn. Enzymol.*, **17**, 65—130.
96. Stucki J. W., Brawand F., Walter P., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **27**, 181—191.
97. Halperin M. L., Robinson B. H., Fritz I. B., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 1003—1007.
98. Zuurendonk P. F., Tager J. M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **333**, 393—399.
99. Akerboom T. P. M., Zuurendonk P. F., (1974), 9th FEBS Meeting, Budapest, Abstr. str. 494.
100. Kolarov J., Subic J., Kovac L., (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **267**, 465—478.
101. Haslam J. M., Perkins M., Linnane A. W., (1973), *Biochem. J.*, **134**, 935—947.
102. Lauquin G., Vignais P. V., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **305**, 534—556.
103. Perkins M., Haslam J. M., Linnane A. W., (1973), *Biochem. J.*, **134**, 923—934.
104. Perkins M. E., Haslam J. M., Klyce H. R., Linnane A. W., (1973), *FEBS Letters* **36**, 137—142.
105. Lauquin G., Vignais P. V., Matton J. R., (1973), *FEBS Letters* **35**, 192—200.
106. Chavin J., (1971), *FEBS Letters* **14**, 269—282.
107. Klingenberg M., Riccio P., Aquila H., Schmiedt B., Grebe K., Topitsh P., (1974) w Membrane proteins in transport and phosphorylation, red. G. F. Azzona, M. E. Klingenberg, E. Quagliariello, N. Siliprandi, str. 229, North-Holland American Elsevier, Amsterdam, London, New York.
108. Shertzer H. G., Racker E., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1320—1321.
109. Kemp A., Jr., (1974) — doniesienie prywatne.

WOJCIECH MICHALSKI*

Dysmutaza ponadtlenkowa

Superoxide Dismutase

Wstęp

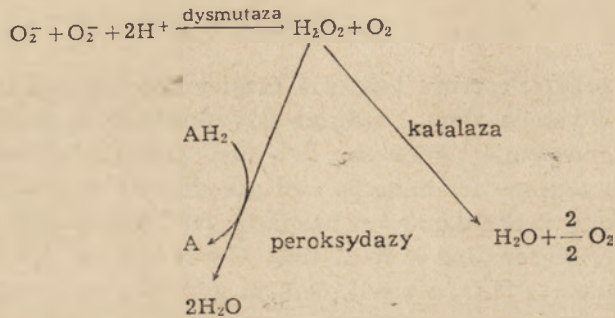
Odkryte przez Pasteura bakterie beztlenowe nie rosną w atmosferze powietrza i czystego tlenu, podczas gdy pozostałym mikroorganizmom, względnie tlenowym i tlenowym, tlen nie ogranicza wzrostu (1). Obserwacje te zapoczątkowały badania nad szkodliwym działaniem tlenu oraz nad poznaniem mechanizmów ochraniających tlenowce przed działaniem wysokich jego stężeń. Już w roku 1893 *Gottstein* odkrył, że bakterie tlenowe rozkładają H_2O_2 z wydzieleniem gazu (2), który później zidentyfikowano jako tlen, a zjawisko to wytłumaczono aktywnością katalazy. Stwierdzono też, że nadtlenek wodoru hamował wzrost bakterii beztlenowych w fazie logarytmicznej (3). Późniejsze prace wykazały, że ekstrakty z komórek bakterii beztlenowych nie zawierają katalazy (4), a dodanie tego enzymu w warunkach tlenowych do hodowli beztlenowców przywraca komórkom zdolność wzrostu (1). Egzogenna katalaza, w porównaniu z warunkami fizjologicznymi, nie w pełni ochrania beztlenowce przed toksycznym działaniem tlenu (3,5). Ponadto wiele gatunków bakterii tlenowych z rodzajów *Streptococcus* i *Pneumococcus* oraz bakterii kwasu mlekowego nie zawiera katalazy (6,7).

Fakty te doprowadziły do wniosków, że toksyczne działanie tlenu jest następstwem wytwarzania w komórkach produktów redukcji tlenu cząstkowego (3,5) np: H_2O_2 oraz, że katalaza nie jest jedynym enzymem ochraniającym organizmy tlenowe (6,7). Cząsteczka H_2O_2 powstaje w wyniku przyłączenia $2e^-$ i $2H^+$ do cząsteczki tlenu, natomiast do całkowitego zredukowania cząsteczki O_2 potrzebne są 4 elektrony. Reakcje te są wielostopniowe, a metabolitami pośrednimi są związki o charakterze wolnych rodników. Wykorzystując własności paramagnetyczne tych związków stwierdzono istnienie jonu ponadtlenkowego O_2^- jako produktu jednoelektronowej redukcji O_2 (8).

* Mgr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa.

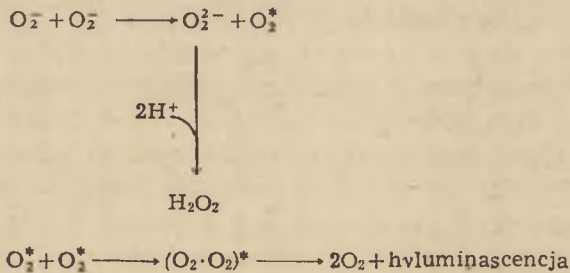
Wykaz stosowanych skrótów: EDTA — etylenodwuaminoceteroocyan; A — akceptor; EPR — elektronowy rezonans paramagnetyczny.

Różnorodność reakcji wytwarzających *in vivo* jon ponadtlenkowy (ang. *superoxide radical*) i jego duża aktywność w procesach utleniania i redukcji sugeruje, że jest on czynnikiem odpowiedzialnym za toksyczne działanie tlenu. W 1968 roku Fridovich i McCord odkryli w komórkach zwierząt i roślin dysmutację jonów ponadtlenkowych (schemat 1) katalizowaną przez enzym nazwany przez nich dysmutazą ponadtlenkową (oksydoreduktaza ponadtlenek: ponadtlenek). EC.1.15.1.1. (ang. *superoxide: superoxide oxidoreductase*) (9,10). Enzym ten współdziałając z katalazą i peroksydazami wystarczająco zabezpiecza komórki przed toksycznym działaniem tlenu (11).



Schemat 1. Współzależność reakcji katalizowanych przez dysmutazę ponadtlenkową, katalazę i peroksydazy (11)

Arneson (12) oraz Giovagnoli i wsp. (13) sugerują natomiast, że rola dysmutazy ponadtlenkowej nie polega na przyspieszaniu reakcji dysmutacji lecz raczej na przekształcaniu cząsteczki O_2 ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego (stan singletowy \rightarrow stan tripletowy), co przedstawiono na schemacie 2.



Schemat 2. Powstawanie w reakcji dysmutacji cząsteczek tlenu w stanie wzbudzonym (O_2^*) i ich przekształcenie do stanu podstawowego (12)

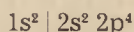
Intensywne badania prowadzone w ostatnich kilku latach dostarczyły wielu danych dotyczących budowy, występowania i mechanizmu działania dysmutazy ponadtlenkowej. Zagadnienia te przedstawił Fridovich (11,14) w dwóch artykułach przeglądowych.

W artykule niniejszym zostaną omówione własności dysmutazy ponadtlenkowej i jej substratu O_2^- uwzględniając mechanizm reakcji oraz ochronną rolę tego enzymu w metabolizmie tlenu.

I. Jon ponadtlenkowy jako substrat dysmutazy ponadtlenkowej

I-1. Budowa i własności fizyko-chemiczne tlenu

Jak wiadomo osiem elektronów atomu tlenu krąży po orbitach K i L, sześć z nich znajduje się na orbitalach 2s i 2p i decyduje o chemicznych właściwościach tlenu. Rozmieszczenie elektronów w podstawowym stanie walencyjnym jest następujące *



Dwa elektrony walencyjne znajdują się na orbitalu 2s, a cztery pozostałe na orbitalu 2p. Orbital ten jest rozszczepiony na trzy równe pod względem energetycznym poziomy 2p_x, 2p_y i 2p_z, na których może znajdować się łącznie sześć elektronów — na każdym po dwa o przeciwnie skierowanych spinach. Ponieważ na orbitalu 2p znajdują się tylko cztery elektrony nie wszystkie poziomy mogą być wypełnione. W stanie podstawowym dwa elektrony z orbitalu 2p mają spiny skierowane równolegle — są one nieskompensowane. Absorpcja kwantu energii przez atom tlenu w stanie podstawowym może spowodować jakościowe zmiany w rozmieszczeniu elektronów na powłoce walencyjnej, to znaczy może zmienić kierunek jednego z dwóch niesparowanych elektronów i doprowadzić do ich kompensacji. Wypadkowa liczba spinowa S w stanie podstawowym (t.zw. stan

tripletowy) wynosi $\left(+\frac{1}{2}\right) + \left(+\frac{1}{2}\right) = 1$, w stanie wzbudzonym zaś (t.zw.

stan singletowy) wynosi $\left(+\frac{1}{2}\right) + \left(-\frac{1}{2}\right) = 0$ (15). W organizmach jednak

tlen nie występuje w formie atomowej, lecz wyłącznie niemal w postaci cząsteczek dwuatomowych. Cząsteczkowy tlen zaś ma formę dwurodnika posiada bowiem dwa niesparowane elektrony, może więc po absorpcji kwantu energii przechodzić w stan wzbudzony — singletowy. Cząsteczka O_2 w stanie wzbudzonym powstaje w reakcjach o charakterze wolnorodnikowym, na przykład w reakcjach fotolitycznych (15).

Stwierdzono, że cząsteczka tlenu ma własności paramagnetyczne co wskazuje na istnienie w niej dwóch nieskompensowanych elektronów. Uwzględnia to zaproponowany w 1931 roku przez Paulinga wzór: $|0 \uparrow \downarrow 0|$ z dwoma wiązaniami trójelektronowymi (taki typ wiązania nosi nazwę wiązania nieparzystoelektronowego). Wewnątrz każdej z obu trójek jest

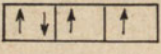
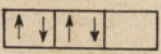
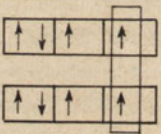
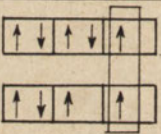
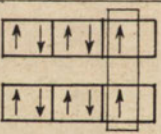
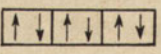
* Cyfry 1 i 2 oznaczają główną liczbę kwantową (odpowiadają kolejno powłokom K i L), litery s i p poboczną liczbę kwantową, a cyfry po prawej stronie u góry liczbę elektronów na danym orbitalu. Pionową kreską oddzielono elektrony biorące udział w tworzeniu połączeń chemicznych tlenu.

po jednym elektronie o nieskompensowanym spinie, który przy tym nie kompensuje się ze spinem elektronu drugiej trójki (8,16).

Możliwe rozmieszczenie elektronów na trzech poziomach energetycznych orbitalu 2p oraz ich udział w tworzeniu wiązań międzyatomowych w różnych formach tlenu przedstawia schematycznie tabela 1.

Tabela 1.

Rozmieszczenie elektronów na trzech poziomach energetycznych orbitalu 2p tlenu w różnych typach wiązań między atomami (16)

Nazwa systematyczna	Rozmieszczenie elektronów	Wzór strukturalny	Odległość między jądrami
Tlen atomowy ^{16}O stan podstawowy	2px 2py 2pz 	—	—
$^1\Sigma^{16}\text{O}$ stan wzbudzony		—	—
Tlen cząsteczkowy O_2		$(\text{o} \cdots \text{o})$	1,21 Å
Jon ponadtlenny O_2^- lub $\text{O}_2^{\cdot -}$		$(\overset{\cdot}{\text{o}} \cdots \overset{\cdot}{\text{o}})^-$	1,28 Å
Jon nadtlenny O_2^{2-}		$(\bar{\text{o}} - \bar{\text{o}})^-$	1,48 Å
Jon tlenkowy O^{2-}		$(\bar{\text{o}})^-$	—

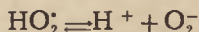
W tablicy zaznaczono, że w tworzeniu wiązania atomowego typu σ biorą udział elektrony z poziomu 2p_z. Powstanie wiązań trójelektronowych jest następstwem oddziaływania między elektronami z poziomów 2p_x i 2p_y (17).

Przyłączanie elektronów do cząsteczki tlenu w reakcjach redukcji pociąga za sobą naruszenie wiązań trójelektronowych, czego konsekwencją jest zwiększenie odległości między jądrami atomów (16).

I-2. Charakterystyka jonu nadtlennkowego

I-2.1. Wytwarzanie

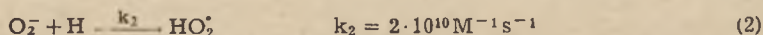
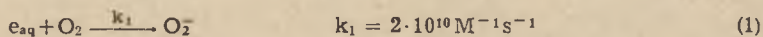
Pierwszym produktem redukcji O_2 (przyłączenie $1e$ i $1H^+$) jest rodnik nadhydroksylowy HO_2^{\cdot} (ang. *perhydroxyl radical*), który może dysocjować na proton i jon nadtlennkowy zgodnie z odwracalną reakcją:



Równowaga tej reakcji ustala się przy $pH = 7-8$ (18).

Jon O_2^- można otrzymać także w reakcji jednoelektronowego utleniania nadtlennku wodoru używając Ce^{IV} jako utleniacza (19). Jon nadtlennkowy powstaje również podczas fotolizy (20), ultrasonifikacji (21-22) i radiolizy (23-25) wody, a także w reakcjach utleniania zredukowanych flawoproteidów (26-33), katecholamin (34), ferrodoksyn (35-37), hemo-proteidów (38,39) i chinonów (29).

Ostatnio do wytwarzania jonów O_2^- i badania ich dysmutacji zastosowano metodę impulsowej radiolizy wody nasyconej tlenem w połączeniu ze zmodyfikowaną techniką elektronowego rezonansu paramagnetycznego (23). Metoda radiolizy polega na cyklicznym naświetlaniu wody promieniami X lub strumieniem elektronów o energii kinetycznej 4-5 MeV w obecności etanolu jako wychwytywacza rodników OH^{\cdot} . Na schemacie 3 przedstawiono zachodzące w tym układzie reakcje i stałe ich szybkości (23).



Schemat 3. Procesy zachodzące podczas radiolizy wody nasyconej tlenem (23)

Zredukowane przenośniki elektronów: metylowiologen czy ferrodoksyna używane do badania fotosyntetycznego transportu elektronów w obecności H_2O jako donora elektronów utleniają się tlenem atmosferycznym z wytworzeniem jonów nadtlennkowych (40,41). Procesy te w obecności askorbinianu, cysteiny lub glutationu (AH_2) mogą zakłócać stechiometrię zużycia tlenu przez wyizolowane chloroplasty (42,43).

I-2.2. Wykrywanie

Obecność jonów O_2^- jako produktów wyżej wymienionych reakcji stwierdzono metodami spektroskopii masowej (44) i optycznej (24,45-47) oraz metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) (19,26,35,36,48-50).

Badając widmo absorpcji w ultrafiolecie poddanego radiolizie roztworu uzyskano maksima pochłaniania przez rodnik HO_2^{\cdot} przy 230 nm i przez jon O_2^- przy 245 nm (23-25).

Metoda spektroskopii optycznej zawodzi jednak przy badaniu widma jonów ponadtlenkowych wytwarzanych przez układy enzymatyczne (np: flawinowe). Stężenie jonów O_2^- w stanie równowagi, katalizowanej enzymatycznie reakcji dysmutacji jest niższe od zdolności rozdzielczej tej metody. Dlatego też dopiero zastosowanie zmodyfikowanej metody spektroskopii EPR polegającej na badaniu widma w gwałtownie oziębionych roztworach pozwoliło ustalić podstawowe parametry widma jonu ponadtlenkowego (48—50).

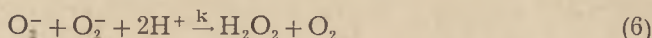
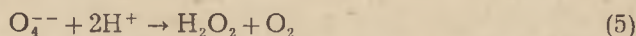
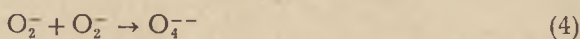
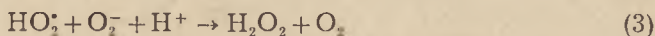
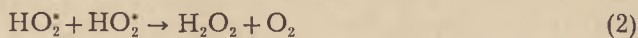
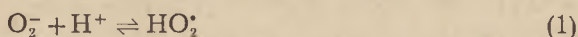
Technika EPR służy do wykrywania i charakteryzowania wolnych rodników. Jeśli cząsteczka posiadająca niesparowany elektron znajduje się w jednorodnym polu magnetycznym to nastąpi rozdzielenie elektronów na dwie grupy, jedną zawierającą elektrony o spinie $+\frac{1}{2}$ i drugą o spinie $-\frac{1}{2}$. Różnica energii między tymi grupami jest skwantowana

i będzie wynosiła $\Delta E = \frac{1}{2} g B_N H_0$ (gdzie: H_0 — natężenie pola magnetycznego, B_N — magneton jądrowy Bohra, g — współczynnik rozszczepienia charakterystyczny dla wszystkich rodników, wynoszący teoretycznie 2,0023). Jeśli próbę umieszczoną w polu magnetycznym naświetlić promieniowaniem elektromagnetycznym o częstotliwości ν , to przy warunku $h\nu = g B_N H_0$ część elektronów przejdzie z niższego poziomu energetycznego na wyższy i nastąpi absorpcja promieniowania. Kształt krzywej widma absorpcji jako funkcji natężenia pola oraz wyliczone wartości g charakteryzują badany rodnik (51). Knowles i wsp. (52) stosując metodę EPR do identyfikacji jonu ponadtlenkowego wytwarzanego przez oksydazę ksantynową z mleka ssaków uzyskali wartości $g_{\parallel} = 2,08$ i $g_{\perp} = 2,00$. Symbole g_{\parallel} i g_{\perp} są tożsame odpowiednio z oznaczeniami g_z i $g_x = g_y$ stosowanymi do charakterystyki złożonych widm EPR. W zestawieniu z publikowanymi (53) widmami taka charakterystyka dowodzi wolnorodnikowego charakteru ($O_2 + \bar{e} = O_2^-$) utleniania tlenem cząsteczkowym ksantyny do kwasu moczowego przez oksydazę ksantynową.

Stosowanie spektroskopii EPR pozwala na identyfikację i charakterystykę rodnikowych własności metabolitów pośrednich, nie pozwala jednak na śledzenie procesu ich powstawania aż do momentu osiągnięcia stanu równowagi, a informacje na ten temat umożliwiają badanie kinetyki reakcji enzymatycznych. W tym celu wykorzystano własności redukcyjne jonu ponadtlenkowego. Jako akceptorów elektronów użyto związków o charakterystycznym widmie absorpcji fal świetlnych, takich jak: cytochrom c (Fe^{+3}) (54), czteronitrometan (55) i błękit nitrotetrazoliowy (56). Stężenie wytworzonego jonu O_2^- obliczano z różnicy maksimów absorpcji formy utlenionej i zredukowanej akceptorów elektronów. Zastosowanie pośrednich metod chemicznych, omówiono w rozdziale II.

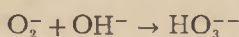
1-2.3. Trwałość

Trwałość jonu ponadtlenkowego jest funkcją pH. Zaobserwowano mianowicie, że w roztworze o dużym stężeniu protonów ($\text{pH} = 5$) jon O_2^- ulega spontanicznie reakcji wielostopniowej dysmutacji z wytworzeniem O_2 i H_2O_2 (reakcja ta ma charakter rekombinacji wolnych rodników). Przebieg tych przemian przedstawiają reakcje:



Behar i wsp. (23) oraz Czapski (57) podają, że stała szybkości k spontanicznej reakcji dysmutacji (równanie 6) jest $10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, czyli około 10^7 razy mniejsza od szybkości reakcji enzymatycznej dysmutacji (patrz rozdział II).

W środowisku alkalicznym natomiast jony ponadtlenkowe charakteryzują się stosunkowo długim okresem trwałości, jest to wynikiem reakcji jonów O_2^- z jonami hydroksylowymi OH^- :



Powstający w tej reakcji jon ponadhydroksylowy (ang. *superhydroxyl ion*) ma własności podobne do jonu O_2^- . Stabilizujące działanie środowiska alkalicznego polega więc na niemożności wytwarzania rodników HO_2^* i zmniejszeniu tym samym ilości możliwych rekombinacji wolnych rodników. Najwyższą stabilność jonów ponadtlenkowych uzyskano w $\text{pH} \sim 10(52,8)$.

1-3. Występowanie jonu ponadtlenkowego w układach biologicznych

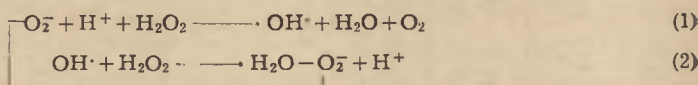
Utlenianie substratów i redukcja tlenu przez enzymy flawinowe może zachodzić w dwóch reakcjach jednoelektronowych z wytworzeniem wolnych rodników substratu i tlenu lub w jednej reakcji dwuelektronowej (27,29). Badania ilościowe utleniania ksantyny tlenem przez oksydazę ksantynową wykazały, że około 50% zużytego tlenu ulega redukcji — w reakcji jednoelektronowej czego następstwem jest wytworzenie jonu ponadtlenkowego (27). Innymi enzymami wytwarzającymi w katalizowanych przez nie reakcjach jon O_2^- są dehydrogenazy mitochondrialne:

bursztynianowa i dwuhydroorotanowa (59), oksydaza aldehydów z wątroby królika, a także oksydaza dwuamin z wątroby świnki morskiej (60) i oksydaza NADPH z leukocytów wielojądrowych ssaków (61—63).

Jon ponadtlenkowy powstawać może również w wyniku reakcji nieenzymatycznego utleniania mioglobiny i hemoglobiny (38,60), a procesy te hamuje nie całkowicie katalaza, co sugeruje, że utleniaczem może tu być nadtlenek wodoru. W środowisku alkalicznym w obecności jonów Fe^{+3} zaobserwowano także spontaniczne utlenianie adrenaliny do adrenochromu (34). Reakcję tą hamuje całkowicie dysmutaza ponadtlenkowa (34).

Powstawanie jonu ponadtlenkowego stwierdzono także w chloroplastach. Reakcja ta jest związana z fotosyntetycznym transportem elektronów ponieważ dwuchlorofenylometylomocznik hamuje jego wytwarzanie (64). Wydaje się, że źródłem O_2^- mogą tu być zarówno reakcja fotolizy wody jak i samoutleniania zredukowanych benzo- i naftochinonów (29, 60, 65). Jak postuluje Fridovich (11) jon manganu, będący przenośnikiem elektronów II układu fotosyntezy może być także koenzymem chloroplastowej dysmutazy ponadtlenkowej, a jon ponadtlenkowy metabolitem pośrednim procesu fotosyntetycznego utleniania wody do tlenu cząsteczkowego.

Jon O_2^- bierze udział w nieenzymatycznej hydroksylacji p-krezolu. Fakt ten sugeruje (66), że jon ten jest odpowiedzialny za wytwarzanie rodnika hydroksylowego. Rodnik ten może powstawać w cyklu reakcji podanym przez Habera i Weissa w roku 1934 (schemat 4) (67).



Schemat 4. Wytwarzanie rodnika $\text{OH}\cdot$ w cyklu reakcji Habera i Weissa (67)

Przyпуска się, że jon ponadtlenkowy w podobny sposób bierze udział w reakcji hydroksylacji zachodzącej *in vivo* za pośrednictwem cytochromu P-450 z mikrosomów (68).

Zaobserwowany fakt wytwarzania H_2O_2 wewnątrz mitochondriów sugeruje możliwość powstawania jonu ponadtlenkowego jako metabolitu pośredniego w redukcji O_2 w łańcuchu oddechowym (69). Wydaje się, że w tych organellach O_2^- powstaje w reakcjach spontanicznego utleniania zredukowanych chinonów (29) lub cytochromów (38,39).

I-4. Szkodliwe działanie jonu ponadtlenkowego w układach biologicznych

Powszechność występowania O_2^- oraz jego duża reaktywność jako rodnika w reakcjach utleniania i redukcji stwarza niebezpieczeństwo wywoływania trwałych zmian w budowie struktur subkomórkowych. Możliwość takich zmian tłumaczyłaby szkodliwe działanie tlenu na organizmy i wskazywała na ewentualną rolę dysmutazy ponadtlenkowej jako

enzymu ochraniającego, występującego powszechnie u wszystkich badanych organizmów tlenowych. Uważa się, że szkodliwe działanie tlenu, a ściślej jonu nadadtlenkowego sprowadzić można do takich procesów jak: peroksydacja kwasów tłuszczowych, depolimeryzacja wielocukrów (70,71) i kwasów nukleinowych oraz utleniania grup sulfhydrylowych białek (72,73).

Stwierdzono, że własności bakteriobójcze antybiotyku streptonigryny — związku o charakterze p-chinonu — są następstwem wytwarzania jonu nadadtlenkowego podczas redukcji i spontanicznego utleniania jej grup chinonowych (71). Streptonigryna zwiększa aktywność oksydazy NADH i NADPH (74,75) oraz powoduje denaturację DNA bakteryjnego (*Escherichia coli*) (76). Dysmutaza nadadtlenkowa i katalaza całkowicie ochraniają bakterie przed zabójczym działaniem streptonigryny.

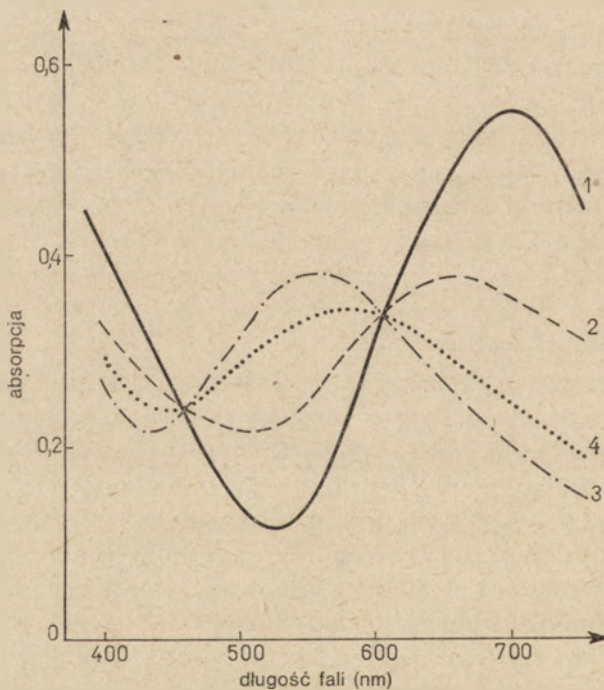
Pfeiffer i McCoy (61) wykazali współzależność między wytwarzaniem jonów O_2^- w reakcji enzymatycznego utleniania NADPH, a peroksydacją nienasyconych kwasów tłuszczowych fosfolipidów błon erytrocytów, mitochondriów i lizosomów. Kro-Lan Fong i wsp. (77) stwierdzili natomiast, że w procesie peroksydacji lipidów błon lizosomów nie biorą udziału bezpośrednio jony nadadtlenkowe lecz rodniki hydroksylowe. Proces ten jest konsekwencją aktywności enzymów flawinowych. Dysmutaza nadadtlenkowa całkowicie ochrania erytrocyty przed hemolizą (78), hamuje też peroksydację lipidów błon mitochondrialnych (78), ale tylko częściowo hamuje peroksydację lipidów błon lizosomów (77). Wytwarzanie rodnika OH^* zachodzi tu zapewne na drodze cyklu reakcji Habera i Weissa (67), a katalaza całkowicie hamuje peroksydację lipidów błon lizosomów (77).

Peroksydacja nienasyconych lipidów, pociągająca za sobą trwałą destrukcję błon, posłużyła do wyjaśnienia istoty procesu fagocytozy bakterii przez leukocyty wielojądrowe ssaków. Stwierdzono mianowicie zwiększoną aktywność oksydazy NADPH (NADH) w leukocytach po zakażeniu bakteriami (63), a także wzbudzenie luminescencji w zakresie długości fal charakterystycznym dla O_2 w stanie wzbudzonym (tzw. stan singletowy), a tlen cząsteczkowy w stanie wzbudzonym ma własności silnie utleniające. Egzogenna dysmutaza nadadtlenkowa całkowicie wygasza luminescencję (63). Na tej podstawie Allen i wsp. (63) przypisują wzbudzonej cząsteczce tlenu własności bakteriobójcze. Klebanoff (62) natomiast uważa, że własności bakteriobójcze leukocytów są związane z wytwarzaniem rodników hydroksylowych. Przeciw hipotezie Allena i wsp. (63) przemawia fakt, że tlen cząsteczkowy w stanie wzbudzonym jest wychwytywany przez cząsteczki wody, stąd czas jego trwania *in vivo* jest bardzo krótki (79,80). Wykazano również, że wytwarzanie O_2 w stanie singletowym w reakcji modelowej rozkładu jonów CrO_4^{2-} hamują azydki i histydyna, dysmutaza jednak nie wpływa na ten proces (81).

II. Kinetyka reakcji dysmutacji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową

Małą ilość badań kinetycznych reakcji enzymatycznej dysmutacji spowodowało stosunkowo późne odkrycie aktywności enzymatycznej dysmutazy ponadtlenkowej oraz trudności natury metodycznej w wykrywaniu substratu tego enzymu.

Do wytwarzania jonów ponadtlenkowych w badaniach kinetycznych stosuje się impulsową radiolizę wody. Stężenie O_2^- powstającego w tym procesie jest rzędu $50\mu M$, co pozwala na zastosowanie do badania właściwości dysmutazy ponadtlenkowej zarówno metody EPR jak i metody spektroskopii optycznej (82,83). Ustalono, że stała szybkość reakcji k wynosi $1,9 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ i nie ulega zmianie w zakresie pH od 6 do 9,5. Wykazuje to, iż jon O_2^- a nie HO_2^* jest substratem dysmutazy ponadtlenkowej. Stosując impulsową radiolizę wody w warunkach nasycenia enzy-



Ryc. 1. Wpływ jonów CN^- na widmo absorpcji dysmutazy ponadtlenkowej z erytrocytów krwi wołu

Krzywa 1 — natywny enzym zawierający atomy Cu i Zn bez inhibitora; krzywe 2, 3 i 4 — enzym po dodaniu odpowiednio 0,5; 1,0 i 2,0 moli CN^- na gramoatom związanej miedzi (84).

mu substratem wyznaczono wartość stałej Michaelisa $K_m = 5 \times 10^{-4} M$ co świadczy o dużym powinowactwie substratowym. Wykazano również, że szybkość reakcji jest zależna od gęstości mieszaniny reakcyjnej. Zwięk-

szenie bowiem gęstości roztworu (przez dodanie glicerolu) powoduje obniżenie szybkości reakcji o ~65%. Jest to związane z ograniczoną dyfuzją enzymu i substratu (82).

Badania nad wpływem niektórych anionów jednowartościowych na aktywność dysmutazy wykazały, że jony azydkowe N_3^- i fluorkowe F^- w stężeniu 1mM nie hamują tej reakcji. Natomiast jon cyjankowy w takim stężeniu hamuje w 99% aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (82).

Ustalono, że jony CN^- łączą się z atomami Cu^{+2} enzymu, a badania nad współczynnikiem powinowactwa inhibitora do enzymu wykazały, że warunkiem całkowitej inhibicji jest dodanie 2moli CN^- na jeden mol enzymu (84). Rycina 1 przedstawia zmiany charakterystycznego widma dysmutazy po traktowaniu różnymi stężeniami jonów cyjankowych CN^- . Zmiany te są spowodowane wysycaniem wiązań koordynacyjnych miedzi jonami inhibitora.

Wykazano, że jon CN^- łączy się z atomem miedzi wiązaniami koordynacyjnymi typu $Cu - C$ (85).

Dysmutaza ponadtlenkowa jest również wrażliwa na produkt reakcji dysmutacji — nadtlenek wodoru (86). Mechanizm inhibicji wydaje się być podobny do reakcji z jonami cyjankowymi (86).

Do badań kinetycznych stosowano również metody pośrednie. Badano mianowicie wpływ dysmutazy na reakcję redukcji jonami O_2^- takich związków jak cytochrom c, czteronitrometan i błękit nitrotetrazoliowy (rozdział I.-2.2). Wyliczona tymi metodami stała szybkość reakcji jest rzędu $2 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$, a więc zgodna z wynikiem badań bezpośrednich (87).

Proces inhibicji redukcji błękitu nitrotetrazoliowego jonami O_2^- przez dysmutazę ponadtlenkową wykorzystano do jakościowego oznaczania tego enzymu podczas rozdzielu elektroforetycznego na żelu poliakrylamidowym (56).

III. Dysmutaza ponadtlenkowa

III-1. Występowanie

Dysmutazę ponadtlenkową zawierającą atomy Cu i Zn wyodrębniono z erytrocytów (88), wątroby (89,90), mózgu (91,92,93), z mięśnia sercowego ssaków (91), a także z liści roślin wyższych (94,95,96), drożdży (97) i mikroorganizmów (98,99,95). Aktywny enzym z erytrocytów wołu otrzymano w formie krystalicznej (100,101).

W wielu organizmach znaleziono inne formy dysmutazy ponadtlenkowej różniące się obecnością 2 atomów Mn lub jednego atomu Fe w miejsce miedzi i cynku, lecz nie różniące się budową apoenzymu. Dysmutaza zawierająca Mn^{+2} ulega nieodwracalnej inaktywacji w obecności rozpuszczalników organicznych, nie można przeto do jej wyodrębnienia stosować ekstrakcji tymi rozpuszczalnikami (94).

Dysmutazę ponadtlenkową zawierającą Fe (najprawdopodobniej jon trójwartościowy) wyodrębniono między innymi z *Escherichia coli* (102)

i sinicy *Spirulina* sp. (95). Natomiast dysmutazę zawierającą Mn^{+2} wyodrębniono z hydrogenosomów wiciowców pasożytniczych (103) oraz z *E. coli* (91,102) i *Streptococcus mutans* (104) oraz mitochondriów: drożdży (97), wątroby (105) i liści szpinaku (95), a także z kiełków pszenicy (96).

Dysmutazę ponadtlenkową, zawierającą Mn^{+2} wyodrębnioną z frakcji mitochondrialnej, zlokalizowano w tych organellach głównie w formie niezwiązanej z błonami, chociaż w mitochondriach z wątroby kurcząt enzym ten występuje w przestrzeni międzybłonowej związany z błoną wewnętrzną (95,97,105).

W cytosolu komórek badanych organizmów pro- i eukariotycznych znajduje się tylko dysmutaza zawierająca Cu i Zn (95, 96, 103, 105). Natomiast żadnej z form enzymu nie zlokalizowano w peroksosomach strunowców i roślin wyższych (103).

W badaniach dysmutazy ponadtlenkowej, ze względu na występowanie jej w komórkach ssaków w tym także człowieka, głównym obiektem zainteresowania jest enzym zawierający atomy miedzi i cynku. Dlatego też omawiane następnie wyniki będą dotyczyły przede wszystkim badań tego właśnie enzymu.

III-2. Wyodrębnianie z materiału biologicznego

Reakcję enzymatycznej dysmutacji wykryto wprawdzie dopiero w roku 1968 (9, 10), lecz znane były już wcześniej białka o budowie podobnej do dysmutazy ponadtlenkowej. W 1938 roku Mann i Keilin (106) wyodrębnili z erytrocytów zawierające miedź białko o masie cząsteczkowej 30—35 tys. i nazwali je erytrokuperiną. Podobne białko wyodrębniono w 1953 roku z wątroby konia (hepatokuperina) (107). Opracowanie standardowej metody wyodrębniania miedzioproteidów pozwoliło odnaleźć białka o podobnych własnościach w mięśni sercowym i mózgu ssaków (108). Dopiero w 1970 roku stwierdzono, że białka te oprócz dwóch atomów miedzi dwuwartościowej zawierają dwa atomy cynku (109).

Wykrycie aktywności dysmutazy i jej substratu nastąpiły w pewnym sensie przypadkowo. Podczas badania oksydazy sarkozynowej, używając pochodnych kwasu p-hydroksysulfonowego jako analogów strukturalnych substratu zauważono zwiększone zużycie tlenu mimo zahamowania utleniania sarkozyny. Następowало wówczas utlenianie siarczynu do siarczanu. Siarczyn powstawał w wyniku dysocjacji sulfonianu. Dodanie do mieszaniny reakcyjnej egzogenego cytochromu c (Fe^{+3}) powodowało jego redukcję (110). Obserwacje te zapoczątkowały badania nad mechanizmem enzymatycznego utleniania substratów tlenem cząsteczkowym prowadząc w rezultacie do wykrycia jonu ponadtlenkowego jako metabolitu pośredniego reakcji oksydacji (111).

McCord (11) badając stechiometrię redukcji cytochromu c (Fe^{+3}) przez oksydazę ksantynową zauważył, że anhydraza węglanowa z erytrocytów hamuje tę reakcję. Badania wykazały, że anhydraza o masie cząsteczkowej około 30 000 była zanieczyszczona w poważnym stopniu erytrokuperiną i jej to właśnie przypisano aktywność wychwytywania jonów nadadtlenkowych wytwarzanych przez oksydazę ksantynową i redukujących cytochrom c. Wyizolowana następnie z erytrocytów dysmutaza nadadtlenkowa okazała się immunologicznie identyczna z erytrokuperiną i podobnymi jej miedzioproteidami (10, 112).

Metoda wyodrębniania dysmutazy nadadtlenkowej z erytrocytów (dawna erytrokuperina) polega na ekstrakcji białek enzymatycznych mieszanką chloroformu, etanolu i wody z poddanych hemolizie krwinek. Dysmutazę wysalano z fazy organicznej ekstraktu kwaśnym fosforanem sodowym, a następnie oczyszczano metodą chromatografii jonowymiennej (10). Zastosowanie rozpuszczalników organicznych nie powoduje utraty aktywności enzymu ani nie zmienia jego ruchliwości elektroforetycznej (95, 113).

Dysmutaza nadadtlenkowa zawierająca miedź i cynk jest białkiem niezwykle stabilnym (11). Enzym ten nie jest wrażliwy na traktowanie mocznikiem o stężeniu 9,5M czy 4% roztworem soli sodowej siarczanu dodecyłu (114). Chlorowodorek guanidyny w stężeniu 1,2M w temperaturze 25°C powoduje całkowitą utratę aktywności dysmutazy, lecz odplukanie reagenta przywraca jej aktywność (114). Dodanie jednak 10^{-3} M roztworu EDTA razem z chlorowodorkiem guanidyny uniemożliwia reaktywację mimo, że EDTA nie jest inhibitorem dysmutazy. Sugeruje to, że chlorowodorek guanidyny zmienia powinowactwo białka do jonów Cu^{+2} i Zn^{+2} i tym samym umożliwia ich związanie z EDTA (112). Dysmutaza nie traci także aktywności nawet po wytrąceniu z roztworu w temperaturze 70°C (89).

III-3. Budowa enzymu

Cząsteczki dysmutazy nadadtlenkowej zbudowane są z około 210—250 reszt aminokwasowych i odpowiednich jonów metali (2Cu^{+2} i 2Zn^{+2} lub 2Mn^{+2} lub 1Fe^{+3}). Masa cząsteczkowa enzymu zawierającego Zn i Cu wynosi około 33 000, natomiast form zawierających Mn lub Fe dochodzi do 38 000 (10, 91, 94, 97, 98, 102, 113, 114). Podczas gdy analiza sekwencji aminokwasów jest bardzo trudna ze względu na zablokowanie N-końcowych aminokwasów (114, 115) analiza jakościowa została już wykonana (91, 106, 111, 115-117). Wynika z niej, że cząsteczka apoenzymu nie zawiera reszt tryptofanu (117, 118)*, a zawiera średnio od 12 do 16 reszt histydyny oraz cystynę, cysteinę i treoninę (94, 119).

* Według Rotilio i wsp. (84) dysmutaza z erytrocytów wołu zawiera od 1 do 2 reszt tryptofanu na cząsteczkę. Spowodowane to jest jak się wydaje zanieczyszczeniami preparatu bogatą w tryptofan anhydrazą węglanową (11).

Udało się również ustalić, że żadna z form dysmutazy ponadtlenkowej nie zawiera w cząsteczce węglowodanów (97).

Na podstawie rozdziału elektroforetycznego, analizy aminokwasów i badań genetycznych (11, 120) wykazano, że dysmutaza zawierająca Cu i Zn zbudowana jest z dwóch identycznych podjednostek. Odporność tego enzymu na działanie soli sodowej siarczanu dodecyłu sugeruje, że podjednostki są połączone wiązaniami kowalencyjnymi (91). Hartz i Deutsch (120) stwierdzili jednak, że stabilizujący wpływ na holoenzym mają jony metali. Otrzymany przez nich drogą dializy apoenzym dysocjował na podjednostki po dodaniu siarczanu dodecyłu lub mocznika. Wrażliwość enzymu na te związki wzrastała także po alkilacji grup sulfhydrylowych (120).

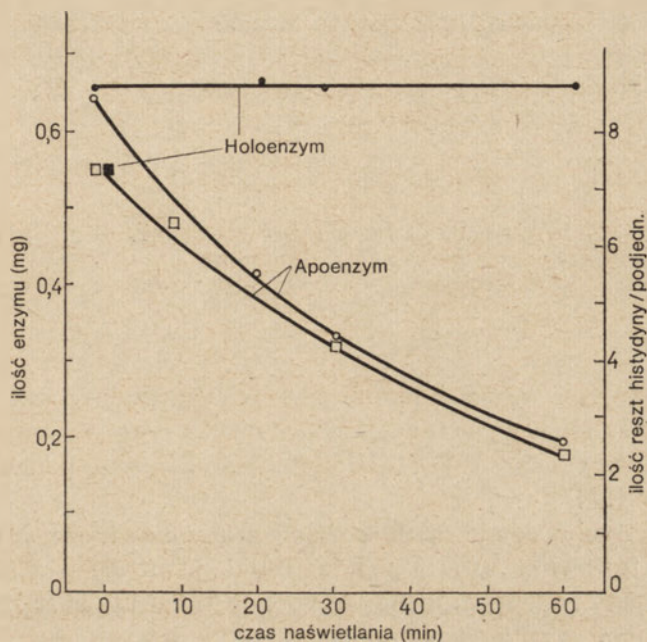
Badania dyfrakcji promieni X przez kryształy dysmutazy ponadtlenkowej z erytrocytów wykazały, że konformacja przestrzenna każdej podjednostki ma formę cylindrycznie zwiniętej β -struktury („harmonijki”) z hydrofobowymi grupami aminokwasów skierowanych do wnętrza cylindra (121).

Dokładne badania widma EPR dysmutazy ponadtlenkowej zawierającej Cu i Zn wykazały, że każdy atom miedzi jest połączony trzema wiązaniami koordynacyjnymi z atomami azotu grup imidazolowych histydyny, a czwarte wiązanie jest wolne (122). Na podstawie widma magnetycznego rezonansu jądrowego ustalono, że czwarte wiązanie koordynacyjne jest typu Cu—O, a odległość między atomami miedzi i tlenu jest rzędu 2Å. Stwierdzono, że jest to wiązanie bardzo labilne (123—125). Na podstawie badań kinetyki hamowania reakcji dysmutacji jonów ponadtlenkowych jonami CN^- postuluje się, że donorem atomu tlenu dla czwartego wiązania koordynacyjnego miedzi może być H_2O lub jon O_2^- , rodnik HO_2^* i tlen cząsteczkowy. Wydaje się więc, że jony Cu^{+2} są odpowiedzialne za aktywność enzymatyczną dysmutazy. Jonów miedzi nie udało się efektywnie zastąpić jonami Ca^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} czy Fe^{+2} (126).

Apoenzym dysmutazy jest wrażliwy na utlenianie na świetle w obecności błękitu metylenowego, podczas gdy holoenzym nie traci aktywności w tych warunkach (124). Stwierdzono również, że spośród wszystkich aminokwasów apoenzymów tylko histydyna ulegała utlenianiu (Ryc. 2), a utleniony apoenzym nie odzyskiwał aktywności enzymatycznej po dodaniu stechiometrycznych ilości miedzi i cynku. Dodanie tych jonów przed naświetleniem ochrania apoenzym przed utlenianiem (nie następuje utlenianie histydyny).

Interesujący jest fakt, że jony Zn^{+2} ochraniają apoenzym i dodane nawet w 800-krotnym nadmiarze nie blokują miejsca przyłączenia miedzi. Stwierdzono, że jony Cu^{+2} i Zn^{+2} występują w podjednostkach parami i znajdują się blisko siebie w odległości 5-6 Å (126, 127).

Wykazano również, że po oddializowaniu jonów cynku zwiększa się liczba odsłoniętych grup sulfhydrylowych (119). Fakt ten przemawia za możliwością połączeń czterech wiązań koordynacyjnych cynku z atomami siarki, wydaje się jednak, że uwalnianie grup -SH jest konsekwencją zmiany struktury enzymu (11).



Ryc. 2. Wpływ obecności jonów Cu^{+2} i Zn^{+2} na utlenianie na świetle apoenzymu dysmutazy ponadtlenkowej i zawartych w nim reszt histydyny

Do mieszaniny reakcyjnej zawierającej błękit metylenowy dodano: apoenzymu, punkty puste \circ , \square i jako kontroli holoenzymu, punkty pełne \bullet , \blacksquare , krzywe charakteryzujące zmiany ilości enzymu oznaczono kółkami; krzywe dotyczące utlenienia histydyny oznaczono kwadratami (zmodyfikowano wg 124).

Do aktywności enzymu niezbędne są zatem jony Cu^{+2} . Do utrzymania zaś struktury trzeciorzędowej enzymu konieczne są zarówno jony Cu^{+2} jak i Zn^{+2} . Ustalono jednak, że jony cynku można efektywnie zastąpić jonami Co^{+2} i Hg^{+2} (jony Mn^{+2} , Ni^{+2} i Fe^{+2} nie stabilizują enzymu (10, 124, 126).

III-4. Mechanizm reakcji

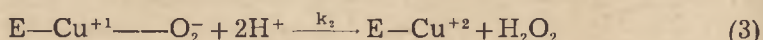
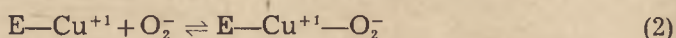
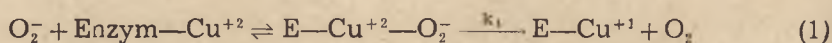
W świetle przytoczonych badań nie ulega wątpliwości, że jony Cu^{+2} wchodzi w skład miejsca aktywnego dysmutazy ponadtlenkowej (122—128). Syntetyczny preparat zawierający atom miedzi połączony z cząsteczkami takich aminokwasów jak lizyna, histydyna i tyrozyna wykazuje około 5—7% aktywności enzymu natywnego (129).

Metodą radiolizy pulsacyjnej ustalono, że pojawienie się substratu —

O_2^- w roztworze dysmutazy powoduje częściowe osłabienie niebieskozielonej barwy enzymu, ale zwiększanie stężenia substratu ma tylko niewielki wpływ na to zjawisko. Częściowy zanik barwy jest spowodowany redukcją Cu^{+2} do Cu^{+1} , a dodanie do zredukowanego enzymu (przez działanie np: H_2O_2), substratu — O_2^- powoduje przywrócenie barwy. Zredukowany enzym jest tak samo aktywny jak enzym utleniony (130, 131).

Obserwacje te pozwalają sądzić, że mechanizm wychwytywania jonów ponadtlenkowych przez dysmutazę polega na cyklicznej reakcji redukcji i utleniania jonów Cu^{+2} (aż do momentu ustalenia stanu równowagi) w reakcji przyłączania substratu (132).

Kolejne etapy tego procesu przedstawiają następujące reakcje:



Wykorzystując własności redukcyjne żelazocyjanku i utleniające żelazicyjanku ustalono, że potencjał oksydoredukcyjny dysmutazy ponadtlenkowej E'_0 wynosi 0,40V (133). Potencjał E'_0 jonu ponadtlenkowego wynosi 0,15V (134).

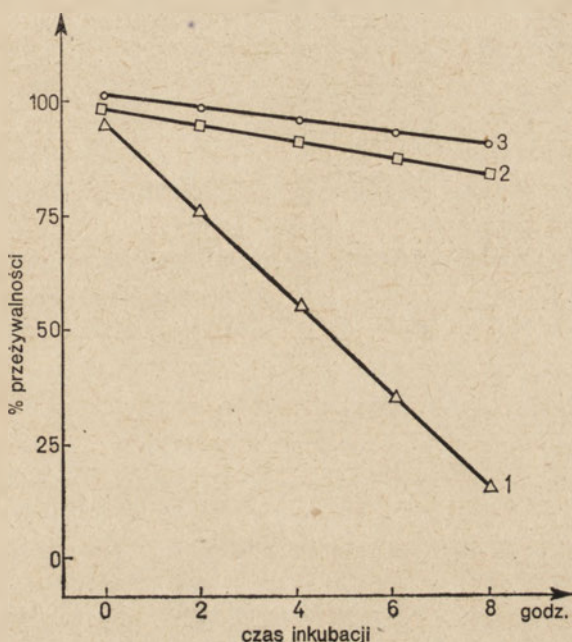
Chociaż dotychczas nie opublikowano prac omawiających ewentualną zmianę struktury enzymu (11) podczas redukcji miedzi w reakcji z jonami ponadtlenkowymi, wydaje się, że zmiany takie nie następują, a miejscem aktywnym są tylko jony miedzi (11).

IV. Biologiczna rola dysmutazy

Tlen w stężeniach нефизjologicznych jest szkodliwy dla wszystkich organizmów (135, 136). Jeżeli więc dysmutaza ponadtlenkowa pełni rolę ochronną, to poziom tego enzymu *in vivo* powinien być zależny od wzrastającego stężenia tlenu w otoczeniu. Gregory i Fridovich (137, 138) zaobserwowali to zjawisko u szeregu względnie tlenowych bakterii, między innymi u *Streptococcus faecalis*.

Na rycinie 3 przedstawiono wpływ różnych stężeń tlenu na przeżywalność kolonii *S. faecalis*. Jak widać z przebiegu krzywej i przeniesienie bakterii z warunków beztlenowych w atmosferę tlenu o ciśnieniu 46 atm. powoduje gwałtowne zmniejszenie przeżywalności bakterii. Azot o tym samym ciśnieniu nie szkodzi komórkom *S. faecalis* (krzywa 2). Krzywa 3 charakteryzuje normalnie rosnącą kolonię w warunkach 46 atm. O_2 po uprzedniej inkubacji w atmosferze 100% O_2 (ciśnienie atmosferyczne). Badania poziomu dysmutazy w takich komórkach *S. faecalis* wykazały 16-krotny wzrost aktywności tego enzymu (137, 138).

Badania bakterii tlenowej *Escherichia coli* wykazały, że dodanie do pożywki puromycyny (inhibitora biosyntezy białek) po inkubacji w atmosferze 100% tlenu nie wpływa na przeżywalność bakterii przy zwiększeniu ciśnienia tlenu nawet do 20 atm., podczas gdy komórki nieinkubowanej kolonii *E. coli* w nowych warunkach gwałtownie giną (70).



Ryc. 3. Wpływ różnych stężeń tlenu na przeżywalność *Streptococcus faecalis*

% przeżywalności wyliczono po przeniesieniu bakterii z warunków tlenowych w : atmosferę tlenu pod ciśnieniem 46 atm, Δ — Δ ; atmosferę azotu pod ciśnieniem 46 atm, \square — \square ; w atmosferę 100% tlenu, a następnie w atmosferę tlenu pod ciśnieniem 46 atm, \circ — \circ (137).

Indukcję dysmutazy ponadtlenkowej stwierdzono także w organizmach eukariontycznych na przykład: w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* (70) i erytrocytach szczura (139). Stwierdzono wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej po inkubacji w atmosferze 100% tlenu w komórkach drożdży *S. cerevisiae*.

Przy ciśnieniu równym 16 atm. aktywność właściwa enzymu wzrosła 12-krotnie.

Role ochronną dysmutazy ponadtlenkowej wykazano ostatecznie w pracach nad mutantem niezdolnym do syntezy tego enzymu *in vivo*. Otrzymano wrażliwego na temperaturę mutantu TS—2 *E. coli* niezdolnego w temperaturze 42°C do biosyntezy dysmutazy i przez to niezdolnego do życia w warunkach tlenowych. Wywołanie rewersji mutacji TS—2 przywracało mutantowi zdolność syntezy enzymu i wzrostu w atmosferze tlenu (140).

Wrażliwość dysmutazy ponadtlenkowej na nadtlenek wodoru skierowało zainteresowanie badaczy na problem współzależności między reakcją dysmutacji i aktywnością katalazy. Okazało się, że katalaza występuje tylko w mikroorganizmach tlenowych, obecność dysmutazy stwierdzono w komórkach bakterii tlenowych i względnie tlenowych (60). Mikroorganizmy względnie tlenowe mimo aktywności dysmutazy nie zawierają katalazy. Z bakterii tych zapewne, nadtlenek wodoru dyfunduje na zewnątrz (60). Stwierdzono, że wzrastające ciśnienie i tym samym wzrastające stężenie tlenu indukuje zarówno syntezę *de novo* dysmutazy zawierającej Cu i Zn jak i zawierającej Mn, podczas gdy poziom dysmutazy *E. coli* zawierającej Fe nie zmienia się w tych warunkach (141). Nie stwierdzono także (poza kilkoma przypadkami wątpliwymi) indukcji tlenem aktywności katalazy ani peroksydaz (141).

W świetle tych badań wydaje się nie ulegać wątpliwości, że dysmutaza ponadtlenkowa a nie katalaza jest enzymem skutecznie ochraniającym organizmy przed toksycznym działaniem tlenu.

V. Znaczenie ewolucyjne

Zdaniem Fridovicha (11) odkrycie aż trzech form dysmutazy ponadtlenkowej w organizmach prokariotycznych i organellach komórek eukariotów ma duże znaczenie ewolucyjne, szczególnie w rozważaniach nad hipotezą egzogenego pochodzenia organelli na przykład mitochondriów (142).

POCHODZENIE ENZYMU	SEKWENCJA AMINOKWASÓW												
				5			10						
<i>E. coli</i> (Mn)	SER	TYR	THR	LEU	PRO	SER	LEU	PRO	TYR	ALA	TYR	ASP	ALA
Mitochondrion (Mn)	LYS	HIS	THR	LEU	PRO	ASP	LEU	PRO	TYR	ASP	TYR	GLY	ALA
<i>E. coli</i> (Fe)	SER	PHE	GLU	LEU	PRO	ALA	LEU	PRO	TYR	ALA	LYS	ASP	ALA
Cytosol (Cu, Zn)Ac	ALA	THR	LYS	ALA	VAL	CYS	VAL	LEU	LYS	GLY	ASP	GLY	PRO
		15				20				25			
<i>E. coli</i> (Mn)	LEU	GLU	PRO	HIS	PHE	ASP	LYS	GLN	THR	MET	GLU	LEU	
Mitochondrion (Mn)	LEU	GLU	PRO	HIS	ILE	SER	ALA	GLU	ILE	MET	GLN	LEU	
<i>E. coli</i> (Mn)	LEU	ALA	PRO	HIS	ILE	SER	ALA	GLU	?	ILE	GLU	TYR	
Cytosol (Cu, Zn)	VAL	GLN	GLY	THR	ILE	HIS	PHE	GLU	ALA	LYS	GLY	ASP	

Ryc. 4. Porównanie sekwencji aminokwasów N-końcowych różnych form dysmutazy ponadtlenkowej. (142)

Podobieństwo w budowie dysmutazy zawierającej Mn z bakterii i z mitochondriów oraz różnice między dysmutazą mitochondrialną a enzymem cytoplazmatycznym przemawiają wyraźnie za wewnątrzkomórkową symbiozą prokariot — protoeukariot, będącą w założeniach teorii zjawiskiem prowadzącym do powstawania mitochondriów. Fakt, że dysmutaza mitochondrialna jest zakodowana w jądrowym DNA nie podważa tej teorii, ponieważ przeniesienie materiału genetycznego między symbiontami jest bardzo prawdopodobne (11).

Na rycinie 5 przedstawiono ustaloną sekwencję 25 aminokwasów (od N-końca) różnych form dysmutazy ponadtlenkowej. Widoczne podobieństwa i różnice w sekwencji aminokwasów przemawiają za egzogennym pochodzeniem mitochondriów, a może też innych organelli komórkowych.

Artykuł nadszedł 27.1.1975; po rewizji autorskiej otrzymano 18.3.1975.

PIŚMIENNICTWO

1. Stanier, R. Y., Doudoroff, M., Adelberg, E. A., (1970) *The Microbiol. World*, Prentice-Hall, Inc., Engelwood Cliffs N. J., 75—89.
2. Gottstein, A., *Virchows Arch.*, (1893), **133**, 295—299.
3. McLeod, I. W., Gordon, J., (1923), *J. Pathol. Bacteriol.*, **26**, 332—341.
4. Rywosch, D., Rywosch, M., (1907), *Zentralbl. Bacteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.* **44**, 295—308.
5. Callow, A. B., (1923), *J. Pathol. Bacteriol.*, **26**, 320—327.
6. Glendhill, W. E., Casida, L. E., Jr, (1969), *Appl. Microbiol.*, **18**, 340—348.
7. Jones, D., Watkins, J., Meyer, D. J., (1970), *Nature*, **226**, 1249—1250.
8. Taube, H., (1965), *Oxygen: Chemistry, Structure and Excited States*, Little, Brown, Boston, 45—57.
9. McCord, J. M., Fridovich, I., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5753—5759.
10. McCord, J. M., Fridovich, I., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049—6055.
11. Fridovich, I., (1974), *Adv. Enzymol.*, **41**, 35—97.
12. Arneson, R. M., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **136**, 352—260.
13. Giovagnoli, C., Calabrese, L., (1972), *FEBS Letters.*, **21**, 183—185.
14. Fridovich, I., (1974), w *Molecular Mechanism of Oxygen Activation*, red. Hayashi, Academic Press, New York, 453—475.
15. Hurwic, J., (1964), *Budowa materii*, PWN, Warszawa, 141—142.
16. Coulson, C. A. (1963), *Wiązania chemiczne*, PWN, Warszawa, 121—138.
17. Durrant, P. J., Durrant, B., (1963), *Zarys współczesnej chemii nieorganicznej*, PWN, Warszawa, 900—909.
18. Kroh, J., (1967), *Wolne rodniki w chemii radiacyjnej*, PWN, Warszawa, 141—168.
19. Saito, E., Bielski, B. H., (1961), *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 4467—4470.
20. McCord, J. M., Fridovich, I., (1973), *J. Photochem. Photobiol.*, **17**, 115—119.
21. Aubar, M., Pecht, L., (1964), *J. Phys. Chem.*, **68**, 352—358.
22. Lippitt, B., McCord, J. M., Fridovich, I., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4688—4690.

23. Behar, D., Czapski, G., Rabani, J., Dorfman, L. M., Schwarc, H. A., (1970), *J. Phys. Chem.*, **74**, 3209—3213.
24. Czapski, G. H., Bielski, B. H. J., (1963), *J. Phys. Chem.*, **67**, 2180—2184.
25. Bielski, B. H. J., Allen, A. O., (1967), *J. Phys. Chem.*, **71**, 4544—4549.
26. Ballou, D., Palmer, G., Massey, V., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 898—903.
27. Fridovich, I., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4053—4057.
28. McCord, J. M., Fridovich, I., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1374—1379.
29. Misra, H. P., Fridovich, I., (1970), *J. Biol. Chem.*, **247**, 188—92.
30. Nashikimi, M., Rac, N. A., Yagi, K., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 849—856.
31. Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S. G., Hawell, L. G., Engel, P. G., Matthews, R. G., Shuman, M., Sullivan, P. A., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 891—905.
32. Fridovich, I., Handler, P., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 916—921.
33. Aleman, V., Handler, P., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4087—4091.
34. Misra, H. P., Fridovich, I., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3170—3175.
35. Nilsson, R., Pick, F. M., Bray, R. C., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **192**, 145—152.
36. Misra, H. P., Fridovich, I., (1972), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6886—6890.
37. Orme-Johnson, W. H., Beinert, H., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 905—908.
38. Misra, H. P., Fridovich, I., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6960—6962.
39. Waver, R., Ondega, B., Van Gelder, B. F., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 475—478.
40. Elsner, E. F., Kramer, R., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 340—346.
41. Allen, J. F., Hall, D. O., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, 579—584.
42. Epel, B. L., Neumann, J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **325**, 520—527.
43. Allen, J. F., Hall, D. O., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 850—862.
44. Foner, S. N., Hudson, R. L., (1962), *Adv. Chem. Series.* **36**, 34—41.
45. Baxendale, J. H., (1962), *Radiat. Res.*, **17**, 312—318.
46. Czapski, G., Dorfman, L. M., (1964), *J. Phys. Chem.*, **68**, 1169—1175.
47. Andrews, L., (1969), *J. Phys. Chem.*, **73**, 3922—3926.
48. Bray, R. C., Pick, F. M., Samuel, D., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **15**, 352—259.
49. Kroh, J., Green, B. C., Spinks, J. W. J., (1962), *Can. J. Chem.* **40**, 413—417.
50. Kroh, J., Green, B. C., Spinks, J. W. J., (1961), *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2201—2206.
51. Hollecher, T. C., (1969), w *Physical Techniques in Biological Research*, red. Moore, D. H., Academic Press, New York, t. II B, 190—197.
52. Knowles, P. F., Gibbson, J. F., Pick, F. M., Bray, R. C., (1969), *Biochem. J.*, **111**, 53—57.
53. Bielski, B. H. J., Saito, E., (1962), *J. Phys. Chem.*, **66**, 2266—2268.
54. Land, E. J., Swallow, A. J., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 365—373.
55. Rabani, J., Mulac, W. A., Matheson, M. S., (1965), *J. Phys. Chem.*, **69**, 53—59.
56. Beauchamp, C., Fridovich, I., (1971), *J. Anal. Biochem.*, **44**, 276—278.
57. Czapski, G., (197-), *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **22**, 71—76.
58. Marklund, S., Marklund, G., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469—474.
59. Forman, H. J., Kennedy, J. A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 1044—1050.

60. McCord, J. M., Keele, B. B., Fridovich, I., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 1024—1027.
61. Pfeiffer, P. M., McCoy, P. B., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6401—6408.
62. Klebanoff, S. J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3724—3728.
63. Allen, R. C., Xevich, S. J., Orth, R. W., Steele, R. H., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 909—917.
64. Asada, K., Kiso, K., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **33**, 253—257.
65. Elstner, S., Haupel, B., (1974), *Z. Naturforsch.*, **29c**, 559—564.
66. Goscin, S. A., Fridovich, I., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 778—784.
67. Haber, F., Weiss, J., (1934), *Proc. R. Soc. (London)*, **A 147**, 332—337.
68. Coon, R. W., Autor, A. B., (1979), w *Biological Hydroksylation Mechanism*, red. Boyd, G. S., Smellie, R. M. S., Academic Press, Nev York 45—57.
69. Chance, B., Boveris, A., Oshino, N., (1972), *Biochem. J.*, **128**, 617—620.
70. Matsumura, G., Herp, A., Pigman, W., (1966), *Radiat. Res.*, **28**, 735—738.
71. Harris, M. J., Herp, A., Pigman, W., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.* **142**, 615—617.
72. Weisiger, R. A., (1973), Ph. D. Thesis, Duke University.
73. D'Aoust, B. G., (1969), *Science*, **168**, 576—578.
74. Gregory, E. M., Fridovich, I., (1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 1193—1197.
75. Hochstein, P., Laszko, J., Miller, D., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 289—292.
76. White, H. L., White, J. R., (1966), *Biochim. Biophys. Acta.*, **123**, 648—651.
77. Kro-Lang Fong, McCoy, P. B., Payer, J. L., Keele, B. B., Misra, H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7792—7798.
78. Zimmerman, R., Flohe, L., Weser, V., Hartman, H. J., (1973), *FEBS Letters*, **29**, 117—121.
79. Merkel, P. B., Kearus, D. R., (1972), *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1029—1032.
80. Khan, A. V., (1970), *Science*, **168**, 476—477.
81. Hodgson, E. K., Fridovich, I., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3811—3815.
82. Rotilio, G., Bray, R. C., Fielden, E. M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 605—608.
83. Klug, D., Rabani, J., Fridovich, I., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4839—4842.
84. Rotilio, G., Morpurgo, L., Givagnoli, C., Calabrese, L., Mondovi, B., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2187—2189.
85. Haffner, P. H., Coleman, J. E., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6626—6628.
86. Rotilo, G., Calabrese, L., Bossa, F., Barra, D., Agro, A. F., Mondovi, B., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2182—2187.
87. Forman, H. J., Fridovich, I., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 396—399.
88. Mann, T. Keilin, D., (1938), *Proc. R. Soc. (London)*; **B 126**, 303—308.
89. Mohamed, M. S., Greenberg, D. M., (1953), *J. Gen. Physiol.*, **37**, 433—438.
90. Porter, H., Sweeny, M., (19), *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 319—321.
91. Keele, B. B. Jr, McCord, J. M., Fridovich, I., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2875—2877.
92. Porter, H., Folch, J., (1957), *J. Neurochem.*, **5**, 260—263.
93. Porter, H., Ainsworth, S., (1959), *J. Neurochem.*, **5**, 91—94.
94. Sawada, Y., Ohyama, T., Yamazaki, I., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 305—307.
95. Lumsden, L., Hall, D. O., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 35—37.

96. Beauchamp, C. O., Fridovich, I., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **317**, 50—65.
97. Goscin, S. A., Fridovich, I., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 276—279.
98. Misra, H. P., Fridovich, I., (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 3410—3416.
99. Rapp, V., Adams, W. C., Miller, R. W., (1973), *Can. J. Biochem.*, **51**, 158—160.
100. Liberman, R. A., Fee, J. A., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7617—7619.
101. Richardson, D. C., Bier, C. J., Richardson, J. S., (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 6368—6369.
102. Yost, F. J., Fridovich, I., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1905—1908.
103. Lindmark, D. Gm. Muller, M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4634—4637.
104. Vance, P. G., Keele, B. B., Jr., Rayagopalan, K. V., (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 4782—4784.
105. Weisiger, R. W., Fridovich, I., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4793—4795.
106. Carrico, R. J., Deutsch, H. F., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6987—6991.
107. Carrico, R. J., Deutsch, H. F., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 723—728.
108. Heimberg, M., Fridovich, I., Handler, P., (1953). *J. Biol. Chem.*, **204**, 913—916.
109. Weber, M. M., Lenhof, H. M., Kaplan, N. O., (1956), *J. Biol. Chem.*, **220**, 93—99.
110. Shields, G. S., Markowitz, H., Klassen, W. H., Cartwright, G. E., Wintrobe, M. M., (1961), *J. Clin. Invest.*, **40**, 2007—2010.
111. Weisiger, R. A., Fridovich, I., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3582—3585.
112. Forman, H. J., Fridovich, I., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2645—2649.
113. Keele, B. B., McCord, J. M., Fridovich, I., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6176—6181.
114. Wood, E., Dalgleish, H. F., Bannister, W., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **18**, 187—193.
115. Stansell, M. L., Deutsch, H. F., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 4299—4309.
116. Hartz, J. W., Deutsch, H. F., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 4566—4568.
117. Weser, V., Carth, G., Djerassi, C., Hartman, H. J., Krauss, D., Voelcker, G., Voelter, W., Voetsch, W., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 28—33.
118. McFarland, T. M., Coleman, J. E., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **29**, 521—523.
119. Fee, J. A., Natter, G. S. T., Baker, R., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **295**, 96—106.
120. Hartz, J. W., Deutsch, H. F., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7043—7045.
121. Thomas, K. A., Rubin, B. H., Bier, J., Richardson, J. S., Richardson, D. C., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5677—5681.
122. Rotilio, G., Calabrese, L., Mondovi, B., Blumberg, H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3157—3161.
123. Gaber, B. P., Brown, R. D., Koenig, S. H., Fee, J. A., (1972), *Biochim. Biophys. Acta.*, **271**, 1—4.
124. Forman, H. J., Evans, H. J., Hill, R. L., Fridovich, I., (1973), *Biochemistry*, **12**, 823—825.
125. Rotilio, G., Calabrese, L., Coleman, J. E., (1973). *J. Biol. Chem.*, **248**, 3855—3859.
126. Bannister, J. V., Bannister, W. H., Wood, I., (1971), *Eur. J. Biochem.* **18**, 178—182.
127. Fee, J. A., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4229—4233.
128. Fee, J. A., Gaber, B. P., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 60—65.
129. Joester, K. E., Jung, G., Weber, U., Weser, U., (1972), *FEBS Letters*, **25**, 25—29.

130. Fielden, E. M., Roberts, P. B., Bray, R. C., Rotilo, G., (1973), *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 52—54.
131. Klug, D., Fridovich, I., Rabani, J., (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 2786—2788.
132. Klug, D., Rabani, J., Fridovich, I., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4839—4842. *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 229—234.
134. Rao, P. S., Hayon, E. M., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 468—472.
135. Haugaard, N., (1968), *Physiol. Rev.*, **48**, 311—316.
136. Gottlieb, S. F., (1971), *Ann. Rev. Microbiol.*, **25**, 111—118.
137. Gregory, E. M., Fridovich, I., (1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 543—548.
138. Gregory, E. M., Fridovich, I., (1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 1193—1198.
139. Crapo, J., Tierney, D., (1973), *Clin. Res.*, **21**, 222—230.
140. MCord, J. M., Beauchamp, C. O., Goscin, S., Misra, H. P., Fridovich, I., (1973), w *Oxidase and Related Redox System*, red. King, T. E., Mason, M., Morrison, S., University Park Press, Baltimore, 51—60.
141. Gregory, E. M., Goscin, S., Fridovich, I., (1974), *J. Bacteriol.*, **117**, 456—460.
142. Raff, R. A., Mahler, H. R., (1972), *Science*, **177**, 575—576.

Panu Profesorowi Zbigniewowi Kaniudze dziękuję za zainteresowanie tematem artykułu i pomoc w jego opracowaniu.

BRONISŁAW L. SLOMIANY ^{*)}, AMALIA SLOMIANY ^{*)},
JANUSZ BADURSKI ^{**)}

Budowa i funkcja glikolipidów siarczanowych

Structure and Function of Sulfated Glycolipids

Wśród dotychczas poznanych siarczanowych pochodnych glikolipidów zwierzęcych można wyróżnić dwie podstawowe grupy: I. Siarczany galaktozyloglicerydów; II. Siarczany sfingoglikolipidów. Wspólną cechą tych związków jest obecność grupy siarczanowej przy trzecim węglu galaktozy.

W skład grupy sulfosfingoglikolipidów wchodzi siarczany: galaktozyloceramidu, laktozyloceramidu i galaktozyloalaktozyloceramidu oraz kwas ungułowy, zawierający ponadto galaktozoaminę i kwas sialowy.

I. Siarczany galaktozyloglicerydów

Siarczanowe glikolipidy zaliczamy do grupy glikozyloglicerydów, w których grupa cukrowa połączona jest wiązaniem O-glikozydowym z trzecim węglem dwuglicerydu lub alkilo-2-acyloglicerolu. Siarczanową pochodną glikozyloglicerydu wykryto w 1972 roku (1,2). Związek ten stanowi główny glikolipid jąder i spermy szczura i wieprza, czemu zawdzięcza swą nazwę — seminolipid (2).

Jakościowa analiza oczyszczonego siarczanu glikozyloglicerydu wykazała, że zawiera on galaktozę, kwasy tłuszczowe, długołańcuchowy eter glicerolu i grupę siarczanową (1,2). Skład odsetkowy kwasów tłuszczowych i eterów glicerolu w siarczanie glicerogalaktolipidu z jąder wieprza i szczura oraz spermy wieprza podano w tabeli 1:

Widmo w podczerwieni (Ryc. 1) wskazuje na wielkie podobieństwo do widma galaktozylo-dwuglicerydu, w którym to związku galaktoza przyłączona jest wiązaniem beta-glikozydowym (obecność szczytu absorpcji w zakresie 875 cm^{-1}). Absorpcja w zakresie 820 cm^{-1} i 1240 cm^{-1} świad-

^{*)} Ph. D., Department of Biochemistry, New York Medical College, Valhalla, New York, U.S.A.

^{**)} Dr med., Klinika Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej, ul. M. Skłodowskiej 24a, 15-276 Białystok.

Tabela 1.

Procentowy skład kwasów tłuszczowych i eterów glicerolu w sulfoglicerogalaktolipidzie (1,2)

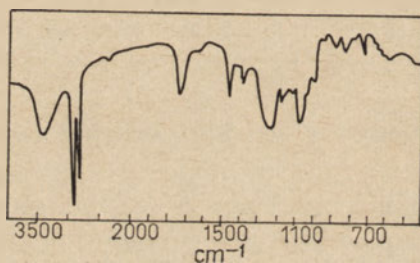
Tkanka	Procent kwasów tłuszczowych		Procent eterów glicerolu	
	14:0	16:0	chimyl*	batyl**
Jądra i sperma wieprza	5,0	95,0	78,0	
Jądra szczura		90,0	90,0	10,0

* Alkohol palmitylowy tworzący estry z glicerolem

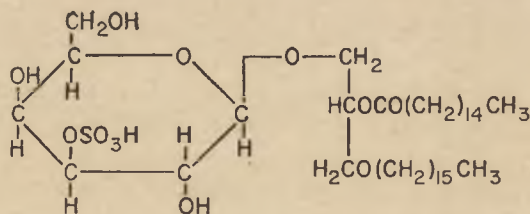
** Alkohol stearylowy tworzący estry z glicerolem

czy o obecności estrowej grupy siarczanowej w pozycji ekwatorialnej galaktozy.

Pozycję grupy acylowej (absorpcja w zakresie 1735 cm^{-1}) potwierdzono także za pomocą spektrometrii magnetycznego rezonansu protonu (2). Badania strukturalne za pomocą całkowitej metylacji siarczanu galaktozyloglicerydu ustaliły pozycję grupy siarczanowej przy węglu trzecim ga-



Ryc. 1. Widmo absorpcyjne w podczerwieni sulfogalaktozyloglicerydu (z jąder wieprza) (2)



Ryc. 2. Wzór strukturalny sulfogalaktozyloglicerydu (2)

laktozy (obecność 2,4,6-trój-O-metylogalaktozy). Kwaśna metanoliza siarczanu glicerogalaktolipidu dała trzy różne pochodne: monogalaktozylo-dwugliceryd, monogalaktozylo-monogliceryd oraz siarczan galaktozylo-alkilo-glicerolu. Pozwoliło to na ustalenie (2) struktury siarczanu glicerogalaktolipidu jako:

1-O-heksadecylo-2-O-heksanodekanoilo-3-beta'-sulfogalaktozylo-glicerol (Ryc. 2).

Badania nad rozmieszczeniem siarczanu galaktozyloglicerydu w różnych tkankach zwierzęcych wskazują na jądra i spermę, jako na tkanki o największym stężeniu tego związku (Tabela 2).

Tylko śladowe ilości siarczanu galaktozyloglicerydu wykryto w mózgu szczura (3).

Tabela 2.

Zawartość (w mg) sulfogalaktozyloglicerydu w jądrach szczura i wieprza oraz w spermie wieprza (1,2).

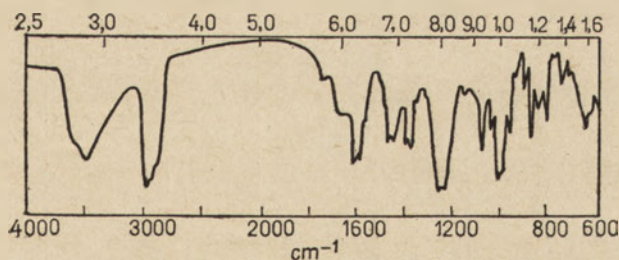
Tkanka	mg/g masy tkanki
Jądra szczura	0,48
Jądra wieprza	0,24
Sperma wieprza	0,83

II. Siarczany sfingoglikolipidów

Do grupy estrów siarczanowych sfingoglikolipidów (sulfatydów) należą siarczany: monoheksocyloceramidu, dwuheksocyloceramidu, trójheksocyloceramidu oraz kwas ungułowy.

II-1. Kwas ungułowy

Kwas ungułowy wykryli w 1967 roku Nieminen i wsp. (4) w tkance rogowej kopyta (unguła — łac. kopyto) i zaliczyli go do siarczanowych pochodnych gangliozydów. Natomiast Ueta i wsp. uważają kwas ungu-



Ryc. 3. Widmo absorpcyjne w podczerwieni kwasu ungułowego (5)

łowy za pochodną siarczanową cholesterolu (4 a). Przyczyną owej różnicy zdań jest odmienna ruchliwość kwasu ungułowego w chromatografii cienkowarstwowej i różna intensywność barwienia się chromianem potasu

Tabela 3.

Skład kwasów tłuszczowych w kwasie ungułowym wyizolowanym z różnych tkanek (5,6)

Tkanka	Procent kwasów tłuszczowych						
	16:0*	16:1	18:0	18:1	20:0	Kwasy hydroksylowe	Pozostałe kwasy tłuszcz.
Zrogowaciały naskórek człowieka	53,2	7,9	28,5	—	3,8	6,6	—
Włosy człowieka	49,2	—	32,0	—	6,0	7,4	5,4
Paznokcie człowieka	38,7	1,9	50,6	—	—	8,4	—
Szczecina świni	39,1	—	42,2	7,6	5,1	—	6,0
Wełna owcy	32,8	10,2	41,5	10,1	—	—	5,4
Pióra ptaków	29,8	25,5	30,5	—	4,6	7,3	2,3
Kopyto konia	19,7	—	63,7	—	12,0	—	4,6

*—liczba atomów węgla; liczba podwójnych wiązań

Tabela 4.

Zawartość tłuszczów i kwasu ungułowego w różnych tkankach zwierzęcych (5,6)

Tkanka	Lipidy całkowite	Kwas ungułowy	
	Procent masy tkanki	Procent tłuszczów całkowitych	Procent masy tkanki
Zrogowaciały naskórek człowieka	1,2	13,8	0,17
Włosy człowieka	3,1	3,9	0,12
Paznokcie człowieka	2,1	10,2	0,21
Szczecina świni	3,1	3,5	0,11
Wełna owcy	5,1	4,5	0,23
Pióra ptaków	2,0	7,0	0,14
Kopyto konia	2,0	25,0	0,5

w kwasie siarkowym niż to wykazują poznane dotąd siarczanowe glikolipidy i gangliozydy. Natomiast wspólne cechy siarczanowych glikolipidów, gangliozydów i kwasu ungułowego, to: tworzenie niebiesko-czerwonej barwy z odczynnikiem rezorcynolowym i identyczna absorbcja w widmie podczerwonym o szczycie przy 1240 cm^{-1} zdradzająca obecność grupy siarczanowej (Ryc. 3).

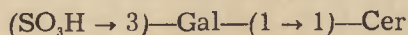
Azot stanowi 3,8%, a siarka 2,4% kwasu ungułowego. Jego ciężar cząsteczkowy, oznaczony za pomocą metody osmometrycznej w metanolu, wynosi 1280. Kwaśna metanoliza kwasu ungułowego wykazała obecność galaktozy, galaktozamininy, zasady długołańcuchowej i kwasu tłuszczowego w stosunkach molarnych równych jednośc. Kwas sjałowy wchodzący w skład kwasu ungułowego, różni się od kwasu siałowego zawartego w gangliozydach dużą odpornością na kwaśną hydrolizę.

Cechą charakterystyczną kwasu ungułowego jest duża różnorodność kwasów tłuszczowych zawartych w jego cząsteczce (Tabela 3), a także różnorodność zasad długołańcuchowych, niemniej jednak C—18 sfingozyna stanowi zawsze największy procent zasad, bez względu na źródło pochodzenia kwasu ungułowego.

Zawartość kwasu ungułowego w różnych tkankach stanowi treść tabeli 4.

II-2. Siarczan galaktozyloceramidu

Skład tego sulfatydu został po raz pierwszy podany przez B l i x a (7), który wykazał, że związek ten zbudowany jest z sfingozyny, kwasów tłuszczowych i estru siarczanowego galaktozy. Wstępne prace dotyczące pozycji grupy siarczanowej sugerowały, że jest ona przyłączona do węgla szóstego galaktozy (8,9). Dalsze badania (10—13) wykazały jednak, że zestyfikowana jest przy węglu trzecim galaktozy. Galaktoza przyłączona jest do ceramidu wiązaniem beta (14):



II-3. Siarczan dwuheksozyloceramidu

Sulfatyd zbudowany z galaktozy, glukozy i ceramidu został po raz pierwszy wyizolowany z nerki człowieka przez M a r t e n s s o n a (15).

Metoda częściowej hydrolizy i utleniania nadjodanem wykazały, że sulfatyd ten jest galaktozyloglukozylloceramidem posiadającym grupę siarczanową przyłączoną do węgla trzeciego galaktozy (16). Wyniki metylacji potwierdziły pozycję grupy siarczanowej, a także pozwoliły ustalić wiązanie między galaktozą i glukozą jako $1 \rightarrow 4$ (17):

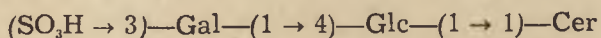
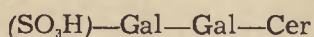


Tabela 5.

Zawartość sulfatydów w różnych organach kręgowców w $\mu\text{M/g}$ suchej tkanki

Tkanka	Sulfatyd monoheksozylo-ceramidu	Sulfatyd monoheksozylo-ceramidu + Sulfatyd dwuheksozylo-ceramidu	Sulfatyd dwuheksozylo-ceramidu	Sulfatyd trójhекsozylo-ceramidu
Substancja szara mózgu człowieka (20)	1,8		—	—
Substancja biała mózgu człowieka (21)	26,2		—	—
Nerka człowieka (22)	0,55		0,20	—
Śledziona człowieka (22)		0,05		—
Wątroba człowieka (22)		0,02		—
Część korowa nerki bydlęcej (23)	0,1		—	—
Część rdzenna nerki bydlęcej (23)	0,9		—	—
Śluzówka żołądka świni (19)	0,38		0,15	0,08
Jelito psa (24)		0,18		—
Gruczoł solny mewy (25)	5,65		—	—
Gruczoł solny kaczki (25)	8,20		—	—

Nerka psa również zawiera siarczan dwugalaktozyloceramidu (18):

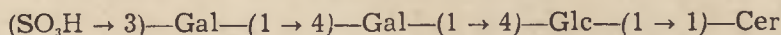


Nadal jednak struktura tego związku jest nieznaną.

II-4. Siarczan trójhекsozyloceramidu

Śluzówka żołądka świni zawiera oprócz siarczanów galaktozyloceramidu i laktozyloceramidu, również siarczan trójhекsozyloceramidu (19). Jak to wynika z analizy produktów jego degradacji, sulfatyd ten zbudowany

wany jest z glukozy, ceramidu i dwu cząsteczek galaktozy, czyli jest on siarczanem galaktozylolaktocyloceramidu. Typ wiązań między cukrami, a także pozycję grupy siarczanowej ustalono posługując się metodą metylacji i utleniania nadjodanem: grupa siarczanowa przyłączona jest do węgla trzeciego terminalnej galaktozy, a wiązania Gal—Gal i Gal—Glc są typu 1 → 4



II-5. Lokalizacja narządowa sulfatydów

Z dotychczasowych badań nad rozmieszczeniem sulfatydów w narządach zwierząt wynika, że sulfatydy dwuheksozylo- i trójheksozyloceramidu występują w większości narządów mięsnych z wyjątkiem tkanki nerwowej, natomiast sulfatydy galaktozyloceramidu występuje zarówno w tkance nerwowej jak i w pozostałych narządach (Tabela 5).

Na szczególną uwagę zasługuje wysoki poziom sulfatydów w substancji białej mózgu człowieka, a u ptaków — w gruczołach solnych. Sulfatydy wraz z innymi lipidami (głównie cerebrydami) tworzą błonę otaczającą wypustki osiowe komórek nerwowych. Obecność dużych ilości sulfatydów w części rdzennej nerki i gruczołach solnych wiąże się z transportem sodu (23).

III. Budowa części ceramidowej sulfatydów

Sulfatydy różnych tkanek kręgowców zawierają tę samą część polarną ($\text{SO}_3\text{H} \rightarrow 3\text{---Gal}$), natomiast różnią się częścią lipofilową (ceramidową).

III-1. Kwasy tłuszczowe sulfatydów

Rozkład kwasów tłuszczowych w sulfatydach jest na ogół podobny do rozkładu w innych glikosfingolipidach danego narządu. Siarczan galaktozyloceramidu i cerebryd zawierają dużo hydrokso kwasów, które w przypadku sulfatydów gruczołów solnych ptaków, stanowią ponad 90% kwasów tłuszczowych (23). Siarczan galaktozyloceramidu nerki bydłowej zawiera głównie kwasy 22h : O; 23h : O oraz 24h : O. Sulfatydy tkanek innych niż nerwowa, zawierają ponadto dużą ilość C_{22} , C_{16} i C_{18} kwasów tłuszczowych (Tabela 6 i 7):

Siarczan dwuheksozyloceramidu na ogół zawiera mniej hydrokso kwasów, które, np. w przypadku nerki bydłowej stanowią zaledwie 17% całości kwasów tłuszczowych, a tylko znikomy procent w błonie śluzowej

żołądka (19). Siarczan trójheksocyloceramidu wyizolowany z śluzówki żołądka świni (19) zawiera znaczną ilość kwasów tłuszczowych C—16 i C—18 i tylko śladowe ilości hydroksykwasów (Tabela 8):

Tabela 6

Zawartość kwasów tłuszczowych o prostych łańcuchach węglowych (w %) występujących w sulfatydach mózgu i nerki człowieka (26)

Kwasy tłuszczowe	Monoheksocylosulfatydy			Dwuheksocylo- sulfatydy
	Substancja biała mózgu	Substancja szara mózgu	Nerka	
16:0	1,3	1,3	6,7	8,4
18:0	5,3	4,8	1,5	3,2
18:1	1,3	0,5	0,2	0,2
20:0	0,5	0,8	4,5	7,9
22:0	1,5	2,2	22,7	23,6
22:1	0,4	0,3	1,0	1,8
23:0	2,6	9,0	10,0	2,6
23:1	—	—	0,6	0,6
24:0	18,6	13,5	31,2	26,8
24:1	38,7	40,0	18,7	22,5
25:0	3,3	5,7	1,0	0,7
25:1	11,4	13,4	0,6	0,2
26:0	0,9	1,7	0,3	0,5
26:1	8,7	0,3	0,3	—

III-2. Długołańcuchowe zasady sulfatydów

Różnorodność zasad długołańcuchowych, zarówno dwu- jak i trójhydroksylowych występujących w sulfatydach, jest dodatkowym czynnikiem zwiększającym heterogenność części lipofilnej sulfatydów.

Tabela 7.

Procentowa zawartość kwasów hydroksylowych występujących w sulfatydach mózgu i nerki człowieka (26)

Kwasy hydroksylowe	Monohesozylosulfatydy			Dwuhesozylo-sulfatydy
	Substancja biała mózgu	Substancja szara mózgu	Nerka	
16 h:0	—	—	2,9	15,1
18 h:0	0,6	0,4	1,1	1,5
20 h:0	0,2	0,4	2,6	7,1
22 h:0	4,9	6,1	16,0	19,3
22 h:1	—	—	0,8	0,9
23 h:0	12,0	16,2	16,9	9,9
24 h:0	26,9	37,1	29,1	23,2
24 h:1	33,9	16,0	24,4	16,7
25 h:0	5,8	9,9	1,2	1,3
25 h:1	6,4	5,0	1,8	—
26 h:0	1,9	2,5	0,4	0,7
26 h:1	5,9	5,7	0,4	—

Sulfatydy nerki bydłowej (23) oprócz zasad dwuhydroksylowych, zawierają także od 30 do 50% zasad trójhydroksylowych. Podstawową zasadą mono- i dwuhesozylosulfatydów nerki ludzkiej jest C-18 sfingenina oraz — w znacznie mniejszych ilościach — C—18 fitosfinganina (27). Sulfatydy gruczołów solnych mewy i kaczki (25) cechuje wysoka zawartość C—20 sfingeniny (Tabela 9) i brak zasad trójhydroksylowych.

Sulfatydy gruczołów solnych (28) *Squalus acanthiasis* (rekin z rodziny Squalidae) zawierają około 50% zasad trójhydroksylowych, głównie C—18 i C—19 fitosfinganinę. Spośród zasad dwuhydroksylowych najwięcej jest C—18 sfingeniny. Sulfatydy te także zawierają rozgałęzione zasady dwu- i trójhydroksylowe. Zasad tego typu nie spotyka się w sulfatydach mózgu, nerki i gruczołów solnych ptaków. Zasady długołańcuchowe występujące

Tabela 8

Zawartość kwasów tłuszczowych trójheksosylosulfatydu
śluzówki żołądka świni (w %) (19)

Długość łańcucha węglowego	Procent
14:0	1,5
16:0	18,7
18:0	29,2
18:1	25,5
20:0	3,2
20:1	8,9
20h:0	1,0
22:1	3,0
22h:0	2,5
24:1	3,1
24h:0	0,3
Niezidentyfikowane	3,1

w sulfatydach żołądka świni (19) mają podobną budowę do zasad znalezionych w innych glikolipidach tej tkanki (29—33) w głównej mierze jest to C—18 sfingenina.*

IV. Biosynteza glikolipidów siarczanowych

IV-1. Biosynteza sulfatydów

Badania McKhanna i wsp. (34) i Balasubramaniana oraz Bachawata (35) wykazały, że homogenaty mózgu, wątroby, nerki i śledziony szczura zawierają enzym, który przenosi grupę siarczanową z 3'-fosfoadenozylu-5'-fosfosiarczanu na galaktozyloceramid dając galak-

*) Bardziej szczegółowe dane — patrz artykuł B. Czartoryskiej, *Post. Biochem.* (1971), 17, 3—25.

Tabela 9.

Długolańcuchowe zasady występujące w sulfatydach gruczołów solnych mewy i kaczki (w %) (25)

Zasada	Procent	
	Mewa	Kaczka
C ₁₅ -sfinganina	1	1
C ₁₆ -sfinganina	2	2
C ₁₇ -sfinganina	5	3
C ₁₇ -sfingenina	1	1
C ₁₈ -sfinganina	10	5
C ₁₈ -sfingenina	22	28
C ₁₉ -sfingenina	1	2
C ₂₀ -sfinganina	14	4
C ₂₀ -sfingenina	40	52

tozylosulfatyd. Grupa siarczanowa może też być przenoszona na laktozyloceramid dając laktozylosulfatyd (36). Synteza sulfatydów jak i innych związków siarczanowych (mukopolisacharydów, siarczanowych glikoproteidów i steroidów) wymaga aktywacji nieorganicznego siarczanu przy udziale ATP. Proces ten jest katalizowany przez enzym ATP-sulfurylazę. Powstający adenozylo 5'-fosfosiarczan w obecności ATP i enzymu kinazy adenozylo-5'-fosfosiarczanu daje 3'-fosfoadenozylo-5'-fosfosiarczan. Aktywna grupa siarczanowa w obecności enzymu sulfotransferazy jest następnie przenoszona na odpowiedni akceptor. Sulfotransferaza przenosząca grupę siarczanową na galaktozyloceramid lub laktozyloceramid nosi nazwę sulfotransferazy cerebrozydu. Z wstępnych prac nad wewnątrzkomórkową lokalizacją tego enzymu w wątrobie szczura i myszy oraz w mózgu szczura wynika, że (34, 37, 38) znajduje się on we frakcji mikrosomalnej. Ponieważ frakcja ta zawiera głównie błony pochodzące z retikulum endoplazmatycznego, aparatu Golgiego i układu siateczkowo-śródbłonkowego, dokładnej lokalizacji tego enzymu nie ustalono. Najwięcej jednak danych przemawia za aparatem Golgiego, jako głównym siedliskiem sulfotransferazy (Tabela 10).

Nieznaczna aktywność sulfotransferazowa frakcji gładkich mikrosomów może być wynikiem zanieczyszczenia tej frakcji błonami aparatów Golgiego.

Sulfotransferaza aparatu Golgiego wykazuje wysoką specyficzność w stosunku do galaktozyloceramidu oraz do galaktozylofingozyny (psychozyny). Z badań C u m a r a i wsp. (40) oraz N u s s b a u m a i M a n d e l a (41) wynika jednak, że sulfotransferazy: przenosząca aktywną grupę siarczanową na psychozynę dając siarczan psychozyny i sulfotransferaza przenosząca grupę siarczanową na galaktozyloceramid, różnią się stałą Michaelisa. Ponadto psychozyna jest niekompetytywnym inhibitorem sulfotransferazy galaktozyloceramidowej. Dalsze etapy syntezy siarczanu galaktozyloceramidu z siarczanu psychozyny nie są obecnie znane.

Y o u n g (42) za pomocą autoradiografii wykazał, że radioaktywny $^{35}\text{SO}_4^{-2}$ najwcześniej ukazuje się w retikulum endoplazmatycznym i aparacie Golgiego. Na podstawie tych danych sugeruje, że aparat Golgiego nie tylko zawiera sulfotransferazę, ale też i enzymy związane z aktywacją nieorganicznego siarczanu przez ATP.

Tabela 10.

Aktywność sulfotransferazy w oczyszczonych frakcjach wewnątrzkomórkowych nerki szczura (3°)

Frakcja	Aktywność sulfotransferazy μ mole/godz/mg białka
Pełny homogenat	0,2
Jądra	0,0
Mitochondria	0,0
Mikrosomy szorstkie	0,2
Mikrosomy gładkie	1,3
Aparat Golgiego	14,0
Błona plazmatyczna	0,0
Supernatant (10 5000xg)	0,0

IV-2. Biosynteza sulfogalaktozyloglicerydu

Badania nad biosyntezą siarczanu galaktozyloglicerydu prowadzone przez K n a p p a i wsp. (43) wskazują, że jądra szczura zawierają enzym, sulfotransferazę, przenoszącą grupę siarczanową na węgiel trzeci galaktozy z 3'-fosfoadenozylu-5'-fosfosiarczanu zarówno na monogalaktozylo-dwugliceryd jak i na galaktozylo-ceramid. Galaktoza w obydwu tych związkach połączona jest z częścią lipidową wiązaniem typu beta. Dwu-

galaktozylo-dwugliceryd, który zawiera alfa-galaktozę jako końcowy cukier, nie może być akceptorem grupy siarczanowej. Wyniki te wskazują, że sulfotransferaza z jąder szczura jest w stanie usiarczanować galaktolipidy posiadające zarówno glicerolowy jak i sfingozynowy szkielet, ale tylko wtedy, gdy zawierają beta-galaktozę jako końcowy cukier.

Wzbogacenie aktywności sulfotransferazy — w porównaniu z homogenatem (Tabela 11) — zauważono we frakcji mikrosomalnej, a najwyższą we frakcji aparatów Golgiego.

Tabela 11.

Specyficzna aktywność sulfotransferazy 3'-fosfoadenozyl-5'-fosfosiarczanu: galaktolipid w wewnątrzkomórkowych frakcjach jąder szczura (43)

Frakcja komórkowa	(³⁵ S) inkorporowany (cpm/50 μg enzymu/godz.)	Względna aktywność specyficzna
Pełny homogenat	580	1,0
Frakcja mikrosomalna	1400	2,4
Frakcja zawierająca aparat Golgiego	10100	17,3
Supernatant 105 000xg	0	0

* cpm—impulsów na minutę

Wyniki te potwierdzają spostrzeżenia F l e i s c h e r a i Z a m b r a n o (39) o aparacie Golgiego, jako systemie służącym nie tylko do transportu i modyfikacji produktów wydzielniczych, ale również jako biorącym udział w ostatecznej syntezie lipidów, które stają się częścią błon komórkowych.

V. Degradacja sulfatydów

Początkowym etapem degradacji sulfatydów jest usuwanie grupy siarczanowej. Dalej proces degradacji przebiega podobnie do tych, jakie obserwujemy w obojętnych glikolipidach.

Obecność sulfatazy w mózgu i innych tkankach była po raz pierwszy wykazana przez M e h l a i J a t z k e w i t z a (44). Aktywność sulfatazy cerebrozydowej zależy od dwóch składników: ciepłostabilnego i ciepłolabilnego. Uważa się, że labilny składnik jest prawdopodobnie arylosulfatazą A (45). Obniżony poziom tego enzymu lub jego brak stwierdzono u ludzi cierpiących na leukodystrofię metachromatyczną. Schorzenie to ce-

chuje nadmierne gromadzenie się mono- i dwuheksozylosulfatydów w różnych tkankach (46). Ponieważ poziom mono- i dwuheksozylosulfatydów wzrasta w czasie tej choroby, uważa się, że arylosulfataza A jest odpowiedzialna za usuwanie grupy siarczanowej z obydwu sulfatydów.

Wstępnym etapem degradacji sulfatydów może też być de-N-acylacja, w wyniku której powstaje siarczan psychozyny.

Ostatnio E t o i wsp. (47) wykazali obecność sulfatazy siarczanu psychozyny w tkankach ludzkich (fibroblasty skóry).

Z przedstawionych przez autorów danych wynika, że prawdopodobnie ta sama sulfataza degraduje zarówno siarczan psychozyny jak i siarczan galaktozyloceramidu. Skoro ta sama sulfataza może usuwać grupę siarczanową z siarczanu psychozyny i siarczanu galaktozyloceramidu, grupa N-acylowa części ceramidowej galaktozyloceramidu wydaje się nie odgrywać istotniejszej roli w rozpoznaniu substratu przez sulfatazę. Natomiast pozycja grupy siarczanowej na galaktozie jest zasadniczo ważna: np. syntetyczny galaktozylo-(6-siarczan)-ceramid i galaktozo-6-siarczan nie są hydrolizowane przez sulfatazę (48).

Psychozyna z powodu obecności wolnej grupy aminowej wykazuje własności cytotoksyczne (49). Być może właściwości detergentowe są przyczyną rozległego uszkodzenia mieliny obserwowanej w leukodystrofii (50).

VI. Własności immunologiczne sulfatydów

Początkowe próby immunizacji zwierząt w celu uzyskania przeciwciał przeciwko sulfatydom były niepomyślne (51). Wprowadzenie udoskonalonych metod otrzymywania przeciwciał przeciwko części cukrowej glikolipidów (52) pozwoliło ostatnio na uzyskanie przeciwciał skierowanych przeciwko grupie siarczanowej i przyległym grupom hydroksylowym cząsteczki sulfatydu (53). Immunizacja królika siarczanem galaktozyloceramidu w obecności albuminy bydlęcej i adiuwantu Freund'a powodowało powstanie w przeciągu 40 dni przeciwciał przeciwko sulfatydom, których obecność można było wykazać za pomocą próby wiązania dopełniacza. Nie powiodły się natomiast próby uwidocznienia przeciwciał testami precipitacyjnymi. Odczyn wiązania dopełniacza zachodził jedynie w obecności lipidów pomocniczych, co jest charakterystyczną cechą haptenu lipidowych. Słabe własności antygenowe sulfatydów według Hakomoriego (53), są wynikiem obecności silnie anionowej grupy siarczanowej.

VII. Funkcja glikolipidów siarczanowych

Pomimo dużej ilości danych o rozmieszczeniu narządowym i budowie sulfonowanych glikolipidów, nie wiele wiadomo o ich funkcji w organizmie. Wzrost poziomu siarczanu galaktozyloglicerydu w jądrach szczyra

podczas pojawiania się pierwszorzędowych spermatocytów (43), może wskazywać na jego rolę w procesie kształtowania się jąder.

Kwas ungułowy (6) wykazuje własności bakteriostatyczne, a nawet bakteriobójcze w stosunku do *Streptococcus* i *Staphylococcus*, może więc uczestniczyć w ochronie naskórka przed zakażeniem bakteryjnym. Sulfatydy są składnikiem błon komórkowych i mogą odgrywać rolę w procesach selektywnej przepuszczalności i kontroli kontaktu między komórkowego.

Znajdujące się w śluzówce żołądka sulfatydy mogą chronić ją przed autotrawieniem, a także mogą stanowić receptor jonów sodowych. Duża zawartość sulfatydów w gruczołach podszczękowych (54) sugeruje ich udział w procesach wydzielniczych tego gruczołu. Spolaryzowane cząsteczki sulfatydów, obecne na powierzchni błon komórkowych, mogą być receptorami hormonów, produktów wydzielniczych komórki, jonów lub antygenów.

Tabela 12.

Stosunek aktywności Na^+ , K^+ -ATP-azy do stężenia sulfatydów w różnych tkankach (25). Aktywność enzymu przedstawiona jako ilość mmoli fosforu nieorganicznego/g tkanki/godz. Wartości sulfatydów przedstawione w μ molach/g suchej tkanki

Tkanka	Stosunek Na^+ , K^+ -ATP-azy do sulfatydów
Gruczoł solny mewy	2,0
Gruczoł solny kaczuki	2,3
Gruczoł wydalniczy psa morskiego	2,9
Część korowa nerki bydłowej	17,7
Część rdzenna nerki bydłowej	2,3
Substancja szara mózgu	2,1—1,2
Substancja biała mózgu	0,04—0,026
Neuron	0,8
Komórki glijowe	2,7

Karlsson i wsp. (23, 25, 27, 28) badając sulfatydy tkanek o wzmożonym transporcie jonów sodowych zauważyli, że zawartość sulfatydów wzrasta wraz z aktywnością wydzielniczą tkanki. Część rdzenna nerki, w której odbywa się transport jonów sodowych, zależny od kortykosteroid-

dów, wykazuje znacznie wyższy poziom sulfatydów niż część korowa. ATP-aza aktywowana przez jony Na^+ i K^+ , uważana jest za istotną część pompy sodowej (55). Porównując aktywność ATP-azy zależnej od jonów sodowego i potasowego (Na^+ , K^+ -ATP-azy) oraz poziom sulfatydów w tej samej tkance, Karlsson i wsp. (25) zauważyli, że stosunek ten jest podobny w gruczołach solnych ptaków, części rdzennej nerki, substancji szarej i komórkach glejowych mózgu (Tabela 12):

Na podstawie powyższych danych wysunęli oni hipotezę, że sulfatydy mogą służyć jako receptory albo przENOŚniki jonów sodowych oraz dalej, że sulfatydy i Na^+ , K^+ -ATP-aza podlegająca wpływowi kortykosteroidów, są składnikami błony komórkowej odpowiedzialnej za transport jonów sodowych.

Dane zebrane do chwili obecnej przemawiają za tym, że tylko część korowa nerki i substancja biała mózgu (mielina) wykazują inną wartość aktywności Na^+ , K^+ -ATP-azy niż inne tkanki, gdzie stosunek stężenia sulfatydów do aktywności ATP-azy, jest wartością w przybliżeniu stałą. Ponieważ podstawowym zadaniem mieliny jest osłanianie wypustek osiowych nerwów, Karlsson i wsp. (25) sugerują, że podczas różnicowania się mieliny, sulfatydy zostały oddzielone od Na^+ , K^+ -ATP-azy. W przypadku nerki ci sami autorzy (24) uważają, że jedynie funkcja Na^+ , K^+ -ATP-azy kontrolowanej przez kortykosteroidy (a zlokalizowanej w części rdzennej nerki) jest związana z sulfatydami.

Transport jonów w części korowej nerki, który nie jest kontrolowany przez kortykosteroidy, jest także niezależny od sulfatydów. Analiza oczyszczonej Na^+ , K^+ -ATP-azy wskazuje, że chociaż enzym ten ma charakter lipoproteidu (56), nie zawiera on sulfatydów (56) albo stanowią one znikomy procent części lipidowej tego enzymu (57). Badania nad rekombinacją Na^+ , K^+ -ATP-azy ustaliły (58), że do odzyskania aktywności enzymatycznej niezbędne są fosfatydyloseryna i fosfatydyloglicerol. Skład części tłuszczowej ATP-azy jest różny w zależności od metody stosowanej do jej oczyszczania i od typu tkanki użytej do otrzymywania tego enzymu. We wszystkich jednak badanych przypadkach sulfatydy wydają się nie odgrywać większej roli w aktywacji Na^+ , K^+ -ATP-azy. Upoważnia to do uogólnienia, że chociaż poziom sulfatydów w tkankach o intensywnym transporcie jonów sodowych jest znacznie wyższy niż w pozostałych, to jednak nie mają one wpływu na aktywność Na^+ , K^+ -ATP-azy.

Artykuł nadszedł 14.12.1974; po rewizji autorskiej otrzymano 8.3.1975.

PIŚMIENNICTWO

1. Kornblatt M. J., Schachter H., Murray R. K., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 1489—1494.
2. Ishizuka I., Suzuki M., Yamakawa T., (1973) *J. Biochem.* (Tokyo), 73, 77—87.

3. Levine M., Kornblatt M. J., Murray R. K., (1974) *Fed. Proc. Abstr.* **11**.
4. Nieminen E., Leikola E., Koljonen M., Kiistala U., Mustakallio K. K., (1967) *Acta Dermato-Venereol.* **47**, 327—331.
- 4a. Ueta N., Kawamura S., Konogawa I., Yamakawa T., (1971) *J. Biochem. (Tokyo)*, **70**, 881—883.
5. Leikola E., Nieminen E., Teppo A. M., (1969) *J. Lipid Res.*, **10**, 440—444.
6. Leikola E., Nieminen E., Teppo A. M., (1970) *J. Lipid Res.*, **11**, 306—310.
7. Blix G., (1933) *Z. Physiol Chem.*, **219**, 82—98.
8. Lloyd A. G., Dodgson K. S., (1961) *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 116—120.
9. Tannhauser S. J., Felling J., Schmidt G. A. (1955) *J. Biol. Chem.* **215**, 211—216.
10. Makita A., Yamakawa T., (1964) *J. Biochem.* **55**, 365—370.
11. Yamakawa T., Kiso N., Handa S., Makita A., Yokoyama S., (1962) *J. Biochem.*, **52**, 226—230.
12. Stoffyn P., Stoffyn A. (1963) *Biophys. Acta* **70**, 218—220.
13. Malone M., Stoffyn P. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 218—219.
14. Stoffyn P., (1966) *J. Am. Oil Chem. Soc.* **43**, 69—74.
15. Martensson E., (1963) *Acta Chem. Scand.*, **17**, 1174—1176.
16. Martensson E., (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, **116**, 296—308.
17. Stoffyn A., Stoffyn P., Martensson E., (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 353—357.
18. Esselman W. J., Ackermann J. R., Sweeley C. C., (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 7310—7317.
19. Slomiany B. L., Slomiany A., Horowitz M. I., (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **348**, 388—396.
20. Suzuki K., (1965) *J. Neurochem.*, **12**, 969—979.
21. Suzuki K., Chen G. C., (1967) *J. Lipid Res.* **8**, 105—113.
22. Swennerholm E., Swennerholm L., (1963) *Nature*, **198**, 688—689.
23. Karlsson K. A., Samuelsson B. E., Steen G. O., (1968) *Acta Chem. Scand.*, **22**, 2723—2724.
24. McKibbin J. M., (1969) *Biochemistry*, **8**, 679—684.
25. Karlsson K. A., Samuelsson B. E., Steen G. O., (1974) *Eur. J. Biochem.* **46**, 243—258.
26. Martensson E., (1969) *Progress in the Chemistry of Fats and Lipids (Pergamon Press) t. 10*, 367—407.
27. Karlsson K. A., Martensson E., (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 233—236.
28. Karlsson K. A., Samuelsson B. E., Steen G. O., (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **306**, 307—316.
29. Slomiany A., Horowitz M. I., (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 6232—6238.
30. Slomiany A., Slomiany B. L., Horowitz M. I., (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 1225—1230.
31. Slomiany B. L., Slomiany A., Horowitz M. I. (1974) *Eur. J. Biochem.* **43**, 161—165.
32. Slomiany B. L., Slomiany A., Horowitz M. I. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **326**, 224—231.
33. Slomiany B. L., Slomiany A., Horowitz M. I. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **280**, 383—392.
34. McKhann G. M., Levy R., Ho W., (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 109—113.
35. Balasubramanian A. S., Bachawat B. K., (1965) *Ind. J. Neurochem.* **2**, 212—220.

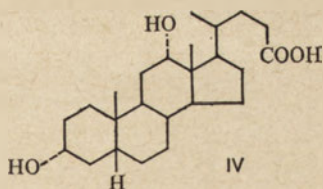
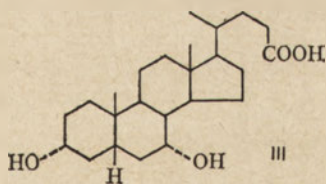
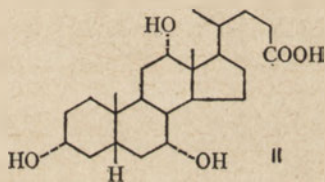
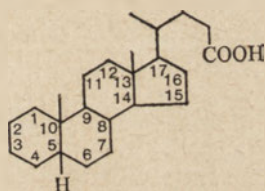
36. McKhann G. M., Ho W., (1967) *J. Neurochem.*, **14**, 717—724.
37. Farrel D. F., McKhann G. M., (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 4694—4702.
38. Sarlieve L. L., Neskovic N. M., Mandel P., (1971) *FEBS Letters*, **19**, 91—95.
39. Fleischer B., Zambrano F., (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 95—958.
40. Cumar F. A., Barra H. S., Maccioni H. J., Caputo R., (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 3807—3816.
41. Nussbaum J. L., Mandel P., (1972) *J. Neurochem.* **19**, 1789—1802.
42. Young R. W., (1973) *J. Cell Biol.*, **57**, 175—189.
43. Knapp A., Kornblatt M. J., Schachter H., Murray R. K., (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 179—186.
44. Mehl E., Jatzkewitz H., (1964) *Z. Physiol. Chem.* **339**, 260—276.
45. Austin J., Balasubramanian A., Pattabiraman T., Sarswathi S., Basu D., Bachhawat (1963) *J. Neurochem.* **10**, 805—816.
46. Martensson E., Percy A., Suennerholm L. (1966) *Acta Paed. Scand.*, **55**, 1—9.
47. Eto Y., Weismann U., Herschkowitz N. N., (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 4955—4960.
48. Mehl E., Jatzkewitz H., (1960) *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 619—627.
49. Miyatake T., Suzuki K., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **48**, 538—543.
50. Eto Y., Suzuki K., Suzuki Y., (1970) *J. Lipid Res.* **11**, 473—497.
51. Niedieck B. Z., (1967) *Imm. All. Klin. Imm.* **132**, 139—148.
52. Kościelak J., Hakomori S., Jeanloz R. W., (1968) *Immunochemistry* **5**, 441—455.
53. Hakomori, S. I. (1974) *J. Immunol.* **112**, 424—426.
54. Pritchard E. T., (1973) *Arch. Oral. Biol.* **18**, 1—3.
55. Bonting S. L., Caravaggio L. L., Canady M. R., Hawkins N. M., (1962) *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 413—419.
56. Hokin L. E., Hexum T. D., (1972) *Arch Biochem. Biophys.* **151**, 453—462.
57. Kawai K., Nakao M., Nakao T., Fujita M., (1973) *J. Biochem. (Tokyo)* **73**, 979—991.
58. Kimelberg H. K., Papahadjopoulos D., (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **282**, 277—292.

WALDEMAR LUTZ *

Kwasy żółciowe

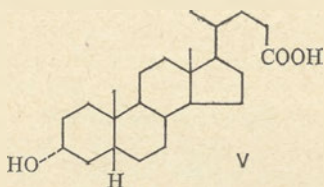
Bile Acids

Kwasy żółciowe, monokarboksyłowe pochodne cholesterolu powstają w wątrobie, a nazwa wynika z ich obecności w żółci. Występujące w żółci kwasy żółciowe są pochodnymi hydroksylowymi kwasu 5 β -cholanowego (wzór I) i różnią się liczbą oraz rozmieszczeniem grup hydroksylowych (1).



* Dr, Zakład Analityki Lekarskiej, Instytut Medycyny Wewnętrznej WAM, Żeromskiego 113, 90-459 Łódź.

Żółć ludzka zawiera kwasy żółciowe pierwotne i wtórne. Kwasy żółciowe pierwotne — cholowy (wzór II) i chenodezoksycholowy (wzór III) powstają w wątrobie z cholesterolu, wtórne zaś z pierwotnych pod działaniem flory bakteryjnej jelit. Są to kwas dezoksycholowy (wzór IV) i kwas lithocholowy (wzór V) (2).

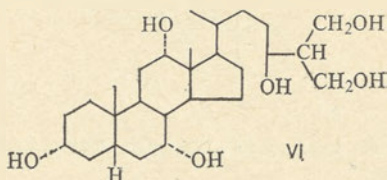


W żółci kwasy żółciowe występują jako amidy glicyny lub tauryny (3). Te pochodne noszą nazwę związanych kwasów żółciowych. W żółci człowieka dominują kwasy żółciowe związane z glicyną, a np. w żółci szczura z tauryną (1). Stosunek ilości kwasów żółciowych związanych z glicyną do związanych z tauryną jest na ogół charakterystyczny dla zwierząt danego gatunku, ale łatwo ulega zmianom w zależności od składu pokarmu, działania niektórych hormonów, itd. (4). Kilka lat temu (5) proponowano nazwać związane kwasy żółciowe „solami żółciowymi” dla odróżnienia od wolnych kwasów żółciowych, ale termin ten się nie przyjął.

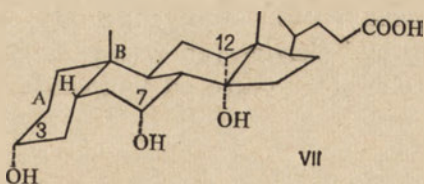
Znaczenie kwasów żółciowych w przemianie materii wynika z dwóch zasadniczych funkcji jakie pełnią one w organizmie. Pierwsza funkcja to, jak wiadomo, właściwość obniżania napięcia powierzchniowego i emulgowania lipidów (7); druga to eliminacja z organizmu pierścienia sterydowego (6).

I. Własności kwasów żółciowych

Pochodne glicynowe i taurynowe kwasów cholowego (kwas 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholanowy), chenodezoksycholowego (kwas 3 α -, 7 α -, dwuhydroksy-5 β -cholanowy) i dezoksycholowego (kwas 3 α -, 12 α -dwohydroksy-5 β -cholanowy) występują w żółci człowieka jako sole sodowe i potasowe. Wykazano także w żółci człowieka obecność (1—2%) soli sodowych i potasowych kwasu lithocholowego (kwas 3 α -hydroksy-5 β -cholanowy) (8). Z żółci innych kręgowców izolowano kilka innych kwasów



i alkoholi żółciowych, jak np. scymnol (wzór VI) z żółci ryb chrzęstnoszkieletowych (9).

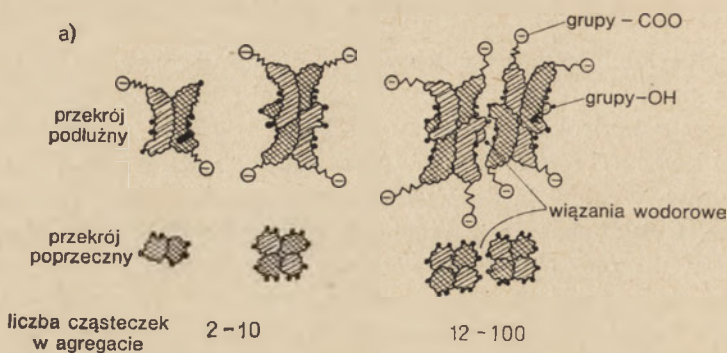


W cząsteczkach kwasów żółciowych występuje nasycony pierścień cyklopentanoperhydrofenantrenowy (steran), do którego dołączone są polarne grupy α -hydroksylowe przy węglach 3, 7 i 12. Przestrzenny wzór cząsteczki kwasu cholowego (wzór VII) pokazuje, że wszystkie trzy grupy hydroksylowe występują poniżej płaszczyzny utworzonej przez pierścień steranowy. Cykloheksanowy pierścień A znajduje się w konfiguracji cis w stosunku do pierścienia B. Podobnie w innych kwasach żółciowych obserwuje się tego typu zależności strukturalne. W ten sposób kwasy żółciowe, w odróżnieniu od ich prekursora — cholesterolu, są 5β -sterolami. Rozmieszczenie hydrofilnych grup hydroksylowych po jednej stronie płaszczyzny cząsteczki a hydrofobowych grup metylowych po stronie przeciwnej warunkuje polaryzację płaszczyznową w cząsteczkach kwasów żółciowych (10).

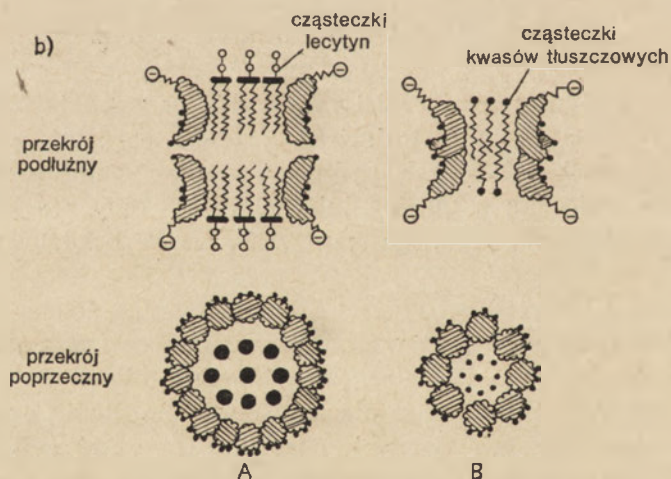
Do pierścienia steranowego przy C-17 dołączony jest krótki alifatyczny łańcuch zakończony zjonizowaną, silnie hydrofilną grupą karboksylową. Zapewnia to znaczną rozpuszczalność kwasów żółciowych w wodzie (11). Ruchomość osiowa bocznego łańcucha alifatycznego pozwala na to, że grupa karboksylowa leży w tej samej płaszczyźnie, co grupy hydroksylowe warunkujące polarność części cząsteczki. Łańcuch boczny związanych kwasów żółciowych jest dłuższy a także bardziej polarny, niż w wolnych kwasach żółciowych, ponieważ zawiera grupę karboksylową kowalencyjnie związaną z glicyną lub tauryną; wolny zaś koniec tego przedłużonego łańcucha bocznego stanowi grupa karboksylowa lub sulfonowa.

Hydrofobne i hydrofilne części cząsteczek kwasów żółciowych nie są tak wyraźnie odgraniczone jak w długołańcuchowych cząsteczkach alifatycznych, takich jak mydła i detergenty (12). Tym niemniej występująca w kwasach żółciowych polarność płaszczyznowa umożliwia im tworzenie agregatów cząsteczkowych zwanych micelami (Ryc. 1a) (13). Mogą też one tworzyć tzw. micelle mieszane (Ryc. 1b), w skład których wchodzi również fosfolipidy (głównie lecytyny) lub monoglicerydy i kwasy tłuszczowe (12, 14, 15). Takie mieszane micelle mogą wiązać cząsteczki trójglicerydów i cholesterolu i w ten sposób rozpuszczać je w roztworach wodnych (16). Krytyczne stężenie micelarne kwasów żółciowych wystarczające aby mógł powstać roztwór micelarny *in vitro* wynosi 2 milimole/litr (7). Stężenie kwasów żółciowych w górnym odcinku jelita po posiłku

waha się w granicach 3-12 milimoli/litr (17), a więc jest znacznie wyższe od krytycznego stężenia micelnarnego. Stężenie to różne jest w przypadku kwasów żółciowych wolnych i związanych; zależy ono ponadto od liczby i rozmieszczenia grup hydroksylowych w cząsteczkach tych kwasów (7). Skład i wielkość miceli zależy także od temperatury oraz pH środowiska (7, 17).



Ryc. 1a. Pierwso- i drugorzędowa struktura miceli prostych tworzonych przez cząsteczki kwasów żółciowych w roztworach wodnych. Powierzchnie hydrofilne (zawierające grupy OH) cząsteczek kwasów żółciowych skierowane są na zewnątrz natomiast hydrofobowe do wnętrza powstałego agregatu cząsteczkowego.



Ryc. 1b. Struktura miceli mieszanych tworzonych przez cząsteczki kwasów żółciowych z cząsteczkami lecytyn (A) oraz z cząsteczkami kwasów tłuszczowych (B) w roztworach wodnych.

Cząsteczki kwasów żółciowych tworzą strukturę walcową na zewnątrz której skierowane są powierzchnie hydrofilne, natomiast do wnętrza powierzchnie hydrofobowe kontaktujące się z łańcuchami węglowodorowymi cząsteczek lecytyn i kwasów tłuszczowych. Polarne fragmenty lecytyn (fosfatydylocholina) i kwasów tłuszczowych (grupy COOH) wystają na zewnątrz powstałego agregatu zwiększając jego właściwości hydrofilne.

II. Biosynteza kwasów żółciowych

II-1. Biosynteza kwasu cholowego

W ciągu reakcji prowadzących do powstania kwasu cholowego można wyróżnić dwa etapy: 1) transformację cząsteczki cholesterolu do 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestanu (wzór XIV); 2) degradację łańcucha bocznego powstałego triolu.

II-1.1. Transformacja cząsteczki cholesterolu w 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestan

Drogę biosyntezy, prowadzącą od cholesterolu do 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestanu przedstawiono na rycinie 2.

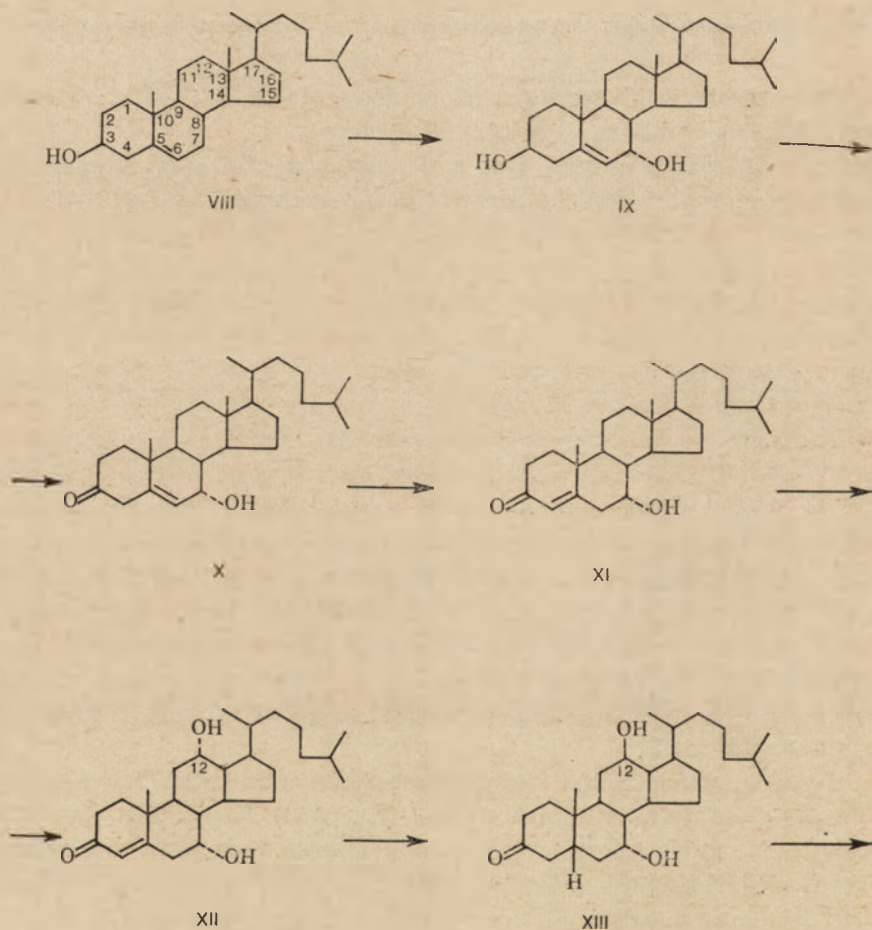
Reakcją zapoczątkowującą jest hydroksylacja cząsteczki cholesterolu (wzór VIII) w pozycji 7 w wyniku czego powstaje 3 β -, 7 α -dwuhydroksycholest-5-en (wzór IX). Reakcja 7 α -hydroksylacji cholesterolu jest prawdopodobnie etapem ograniczającym szybkość syntezy kwasów żółciowych. Reakcję w obecności tlenu oraz NADPH katalizuje mikrosomalny system enzymatyczny (18). Nie jest rozstrzygnięte czy w skład systemu oksygenazy wchodzi cytochrom P-450 (19).

Przekształcenie cząsteczki 3 β -, 7 α -dwuhydroksycholest-5-enu (wzór IX) w 7 α -hydroksycholest-4-en-3-on (wzór XI) odbywa się poprzez utlenienie grupy 3 β -hydroksylowej i przesunięcie wiązania podwójnego z pozycji 5 w 4 pod działaniem enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby (20). Reakcja ta wymaga NAD i wydaje się, że katalizują ją dwa enzymy: 3 β -hydroksy-C₂₇-steroidodehydrogenaza, która katalizuje przejście 3 β -, 7 α -dwuhydroksycholest-5-enu (wzór IX) w 7 α -hydroksycholest-5-en-3-on (wzór X) i Δ^5 -3-keto-C₂₇-steroidoizomeraza, która katalizuje przejście 7 α -hydroksycholest-5-en-3-onu (wzór X) w 7 α -hydroksycholest-4-en-3-on (wzór XI). Są również sugestie, że reakcje te katalizuje tylko jeden enzym (21).

12 α -hydroksylację 7 α -hydroksycholest-4-en-3-onu (wzór XI) i powstanie 7 α -, 12 α -dwuhydroksycholest-4-en-3-onu (wzór XII) katalizuje enzym mikrosomalny, który ma właściwości podobne do tych jakie stwierdzono badając 7 α -hydroksylazę cholesterolową (22). Enzym wymaga obecności NADPH i tlenu a hamuje go tlenek węgla. 12 α -hydroksylaza może spełniać ważną funkcję regulacyjną w określaniu stosunku kwasu cholowego do chenodezoksycholowego w żółci (1).

Stereospecyficzną hydrogenację 7 α -, 12 α -dwuhydroksycholest-4-en-3-onu (wzór XII) do nasyconej pochodnej 7 α -, 12 α -dwuhydroksy-5 β -cholestan-3-onu (wzór XIII) katalizuje Δ^4 -3-keto-C₂₇-steroido-5 β -reduktaza (23). Specyficznym kofaktorem enzymu jest NADPH. Enzym ten redukuje także kilka nienasyconych C₁₉, C₂₁ i C₂₄ sterydów z szybkością przewyższającą szybkość obserwowaną w przypadku 7 α -, 12 α -dwuhydroksycho-

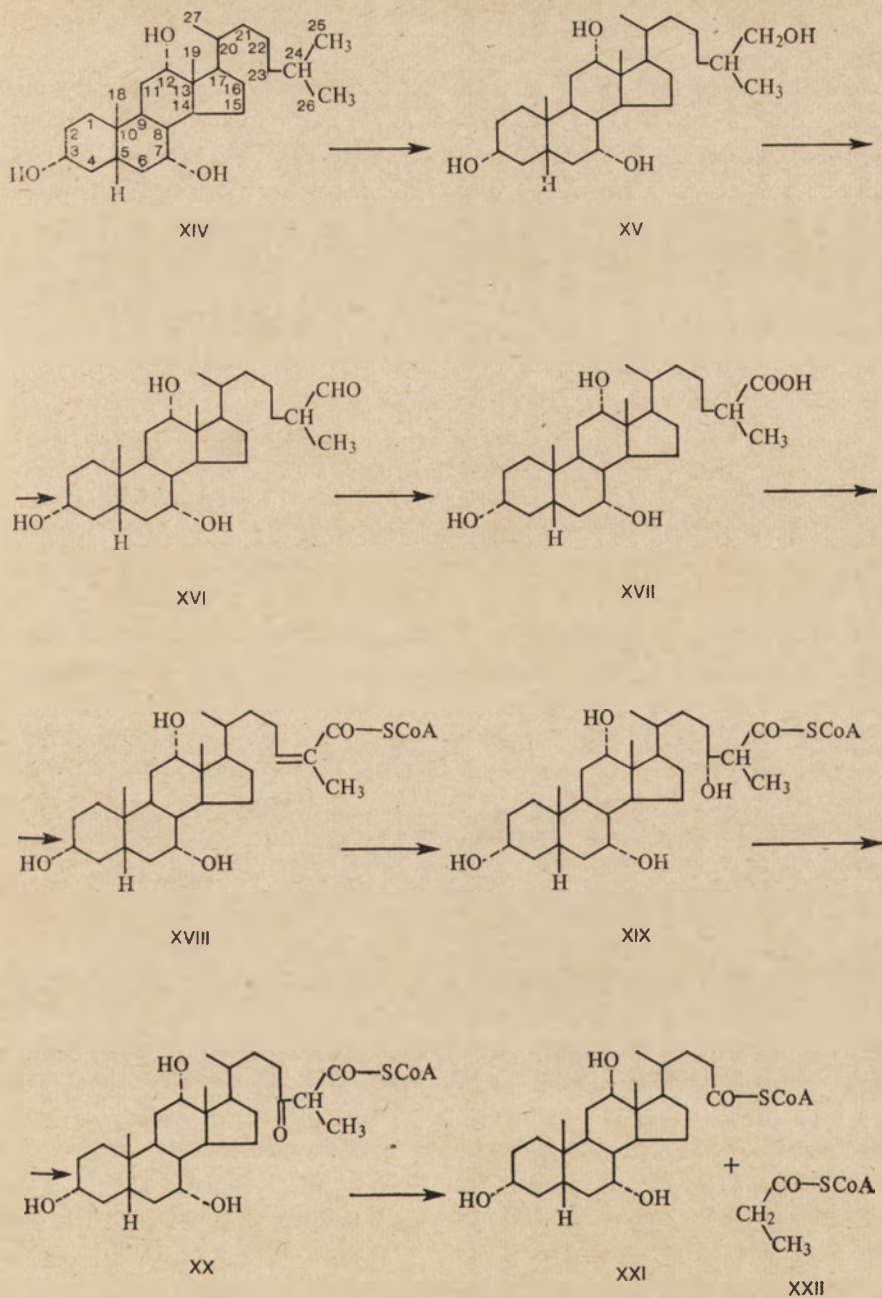
lest-4-en-3-onu (wzór XII). Nie wiadomo dotychczas czy wynika to z niskiej specyficzności substratowej enzymu, czy też obecności kilku reduktaz w preparacie enzymatycznym. 7α -, 12α -dwuhydroksycholest-4-en-3-on (wzór XII) może być wspólnym prekursorem dla kwasu 5α -cholanowego jak i dla kwasu 5β -cholanowego (24). Enzymy, które określają konfigurację przy C-5, różnią się lokalizacją subkomórkową (24, 25). 5β -reduktaza jest obecna w płynie komórkowym, gdy 5α -reduktaza występuje w mikrosomach.



Ryc. 2. Biosynteza kwasu cholowego

Przedstawiono kolejne etapy konwersji cząsteczki cholesterolu do 3α -, 7α -, 12α -trójhydroksy- 5β -cholestanu. Cholesterol (VIII) \rightarrow 3β -, 7α -dwuhydroksycholest-5-en (IX) \rightarrow 7α -hydroksycholest-5-en-3-on (X) \rightarrow 7α -hydroksycholest-4-en-3-on (XI) \rightarrow 7α -, 12α -dwuhydroksycholest-4-en-3-on (XII) \rightarrow 7α -, 12α -dwuhydroksy- 5β -cholestan-3-on (XIII) \rightarrow 3α -, 7α -, 12α -trójhydroksy- 5β -cholestan (XIV, patrz str. 343).

Dehydrogenaza 3α -hydroksy- C_{27} -sterydowa, katalizująca reakcję przejścia 7α -, 12α -dwuhydroksy- 5β -cholestan-3-onu (wzór XIII) w 3α -, 7α -, 12α -trójhydroksy- 5β -cholestan (wzór XIV) znajduje się w superna-



Ryc. 3. Biosynteza kwasu cholowego

Przedstawiono kolejne etapy degradacji łańcucha bocznego 3α-, 7α-, 12α-trójhidroksy-5β-cholestanu. 3α-, 7α-, 12α-trójhidroksy-5β-cholestan (XIV) → 3α-, 7α-, 12α-, 26-czterohidroksy-5β-cholestan (XV) → 3α-, 7α-, 12α-trójhidroksy-5β-cholestan-26-al (XVI) → kwas 3α-, 7α-, 12α-trójhidroksy-5β-cholestan-26-owy (XVII) → 3α-, 7α-, 12α-trójhidroksy-5β-cholestan-24-en-26-yloCoA (XVIII) → 3α-, 7α-, 12α-24-czterohidroksy-5β-cholestan-26-yloCoA (XIX) → 3α-, 7α-, 12α-trójhidroksy-5β-cholestan-24-on-26-yloCoA (XX) → cholyloCoA (XXI) i propionyl-CoA (XXII).

tancie (100 000 g) homogenatu wątroby szczura (23). Oczyszczony enzym wymaga obecności NAD i charakteryzuje się małą specyficznością substratową (1). Katalizuje bowiem nie tylko redukcję 7 α -, 12 α -dwohydroksy-5 β -cholestan-3-onu (wzór XIII) ale także innych nasyconych 3-keto-steroidów z serii C₁₉, C₂₁ i C₂₄.

Prócz omówionej tu istnieją jeszcze wprawdzie inne alternatywne drogi syntezy 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestanu (wzór XIV) (26, 27), ale są one znacznie mniej wydajne i prawdopodobnie nie odgrywają większej roli w wytwarzaniu kwasów żółciowych przez wątrobę.

II-1.2. Degradacja łańcucha bocznego 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestanu

Etapy degradacji łańcucha bocznego 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestanu (wzór XIV) przedstawiono na rycinie 3.

Pierwszym etapem w eliminacji końcowej grupy izopropylowej z bocznego łańcucha izooktylowego 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestanu (wzór XIV) jest hydroksylacja do 3 α -, 7 α -, 12 α -, 26-czterohydroksy-5 β -cholestanu (wzór XV). System enzymatyczny, katalizujący tę reakcję zlokalizowano początkowo we frakcji mitochondrialnej wątroby szczura (28), dopiero ostatnio wykazano (29), że hydroksylacja łańcucha bocznego przebiega znacznie łatwiej w obecności frakcji mikrosomalnej oraz po dodaniu NADPH. Mikrosomalne preparaty przekształcają 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestan (wzór XIV) w 25- i 26-czterohydroksypochodne (29). Jednak tylko z 3 α -, 7 α -, 12 α -czterohydroksy-5 β -cholestanu (wzór XV) może powstawać kwas cholowy. Ustalono ponadto, że w reakcji hydroksylacji bierze udział prawdopodobnie cytochrom P-450 (30).

3 α -, 7 α -, 12 α -, 26-czterohydroksy-5 β -cholestan (wzór XV) ulega dalej przekształceniu w kwas 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestan-26-owy (wzór XVII) pod działaniem enzymów występujących w supernatancie (100 000 g) homogenatu wątroby szczura (31). Transformacja wymaga NAD i prowadzi poprzez związek pośredni 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestan-26-al (wzór XVI). Konwersja 26-olu do kwasu 26-owego jest analogiczna do oksydacji etanolu do aldehydu octowego i kwasu octowego w obecności dehydrogenazy alkoholowej. Są dane wskazujące (31), że dehydrogenaza alkoholowa wątroby i enzym katalizujący syntezę kwasu cholestanowego z czterohydroksycholestanu są identyczne.

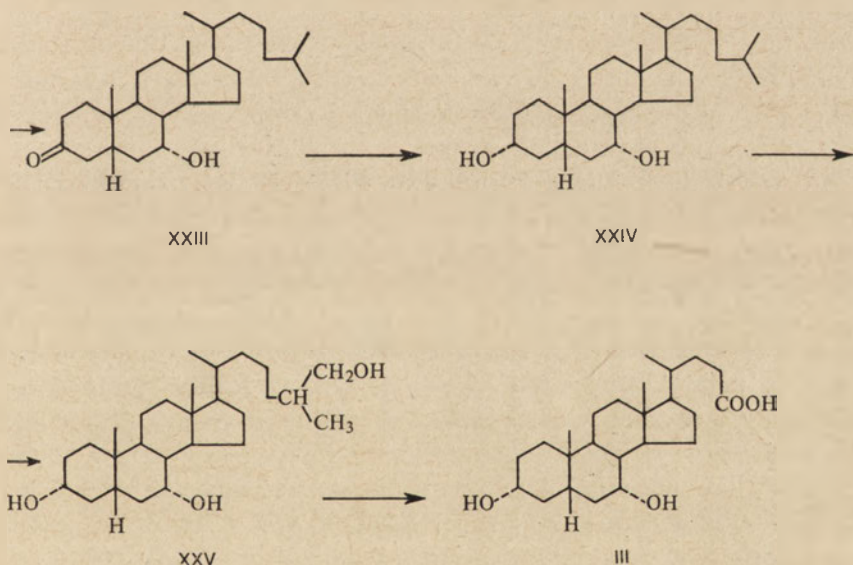
Konwersja kwasu 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestan-26-owego (wzór XVII) do kwasu cholowego i kwasu propionowego zachodzi pod działaniem enzymów frakcji mitochondrialnej, a szybkość reakcji wzrasta po dodaniu frakcji cytoplazmatycznej homogenatu wątroby szczura (1). W końcowych etapach procesu degradacji łańcucha bocznego kwas cholestanowy występuje jako ester koenzymu A (1). β -oksydacja tego kwasu przebiega poprzez związki pośrednie 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestan-24-en-26-yloCoA (wzór XVIII), 3 α -, 7 α -, 12 α -, 24 α -tetrahydroksy-

5 β -cholestan-26-ylo CoA (wzór XIX) i 3 α -, 7 α -, 12 α -trójhydroksy-5 β -cholestan-24-on-26-yloCoA (wzór XX). Końcowymi produktami tego ciągu reakcji są cholyloCoA (wzór XXI) i propionyloCoA (wzór XXII).

II-2. Biosynteza kwasu chenodezoksycholowego

Kwas cholowy i chenodezoksycholowy powstają wprawdzie ze wspólnego prekursora — cholesterolu — istnieją jednak pewne wątpliwości, w którym punkcie rozchodzą się drogi syntezy tych kwasów żółciowych (32).

Wydaje się, że ostatnim wspólnym intermedyatem kwasu cholowego i chenodezoksycholowego jest 7 α -hydroksycholest-4-en-3-on (wzór XI) (33). Jeśli związek ten nie ulegnie 12 α -hydroksylacji (Ryc. 2), to może on następnie być przekształconym w 7 α -hydroksy-5 β -cholestan-3-on (wzór XXIII) i dalej w 3 α -, 7 α -dwohydroksy-5 β -cholestan (wzór XXIV), który z dużą wydajnością ulega hydroksylacji w pozycji 26 do 3 α -, 7 α -, 26-trójhydroksy-5 β -cholestanu (wzór XXV), następnie przekształcanego w kwas chenodezoksycholowy (wzór III). Kolejne etapy syntezy kwasu chenodezoksycholowego poczynając od 7 α -hydroksy-5 β -cholestan-3-onu (wzór XXIII) przedstawiono na rycinie 4. Etapy syntezy od cholesterolu do 7 α -hydroksycholest-4-en-3-onu (wzór XI) są przedstawione na rycinie 2.



Ryc. 4. Biosynteza kwasu chenodezoksycholowego

Przedstawiono reakcje przekształcania 7 α -hydroksy-5 β -cholestan-3-onu (XXIII) w 3 α -, 7 α -dwohydroksy-5 β -cholestan (XXIV) i dalej w 3 α -, 7 α -, 26-trójhydroksy-5 β -cholestan (XXV), który podlega następnie transformacji do kwasu chenodezoksycholowego (III). Etapy biosyntezy od cholesterolu (VIII) do 7 α -hydroksycholest-4-en-3-onu (XI) są identyczne jako podczas biosyntezy kwasu cholowego (rycina 2). Łańcuch boczny 3 α -, 7 α -, 26-trójhydroksy-5 β -cholestanu (XXV) ulega degradacji poprzez ciąg reakcji analogiczny do tego jaki przedstawiono dla 3 α -, 7 α -, 12 α -, 24-czterohydroksy-5 β -cholestanu (XV) (rycina 3).

Przebiegu degradacji łańcucha bocznego 3α -, 7α -, 26 -trójhydroksy- 5β -cholestanu (wzór XXV) niezbadano jeszcze dokładnie, przypuszcza się jednak (30), że są podobne do opisanych przy biosyntezie kwasu cholesterowego (Ryc. 3).

Spostrzeżenie, że 3α -, 7α -dwohydroksycholest-5-en ulega przemianom w kwas 3β -, 7α -dwohydroksycholest-5-enowy w obecności preparatów mitochondrialnych oraz frakcji nadmikrosomalnej (100 000 g) homogenatu wątroby szczura (34) sugeruje możliwość występowania innej alternatywnej drogi syntezy kwasu dezoksycholesterowego. Utworzony kwas 3β -, 7α -dwohydroksycholest-5-enowy ulega następnie łatwo przekształceniu w kwas chenodezoksycholesterowy.

II-3. Powstawanie związanych kwasów żółciowych

Nowosyntetyzowane kwasy żółciowe występują wewnątrz komórki wątrobowej, jako estry z CoA (1), gdzie również CoA estryfikuje powracające z jelita do wątroby poprzez żyłę wrotną wolne kwasy żółciowe (35). Doświadczalnie wykazano to stosując enzym mikrosomalny w obecności ATP i jonów Mg^{++} . Wiązanie kwasów żółciowych z glicyną i tauryną katalizuje następnie lizosomalna acylotransferaza (3).

II-4. Biosynteza kwasów żółciowych w wątrobie człowieka

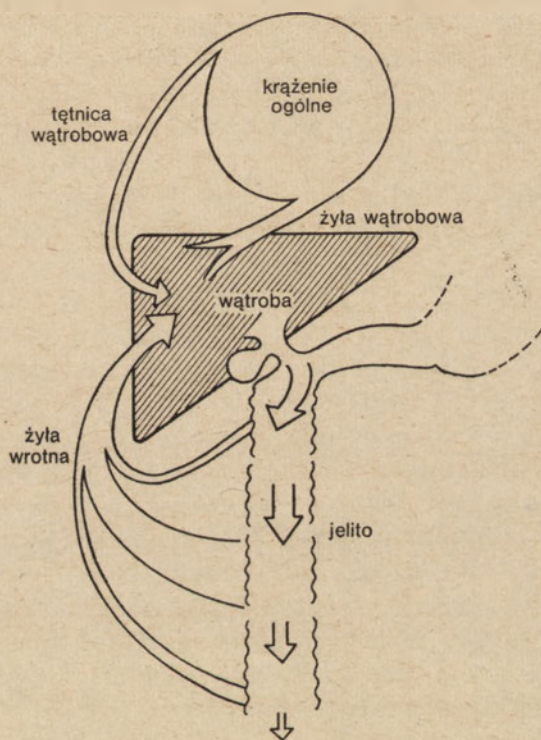
Wczesne etapy syntezy kwasów żółciowych w wątrobie ludzkiej (36, 37) obejmujące syntezę 3α -, 7α -, 12α -trójhydroksy- 5β -cholestanu (wzór XIV) i 3α -, 7α -dwohydroksy- 5β -cholestanu (wzór XXIV) są analogiczne do stwierdzonych w wątrobie szczura.

Żółć człowieka zawiera stosunkowo więcej kwasów dezoksycholesterowego i chenodezoksycholesterowego, niż żółć szczura, w której ponadto znaleziono kwasy muricholowe (1). Te różnice gatunkowe są konsekwencją obecności systemów enzymatycznych w wątrobie szczura, nie występujących w wątrobie ludzkiej (1). Pierwszy z nich katalizuje 7α -hydroksylację kwasu taurodezoksycholesterowego i w ten sposób regeneruje kwas taurocholesterowy, decydując o niskiej zawartości kwasu dezoksycholesterowego w żółci szczura. Drugi system enzymatyczny przekształca kwas chenodezoksycholesterowy poprzez 6β -hydroksylację w kwas α -muricholowy, który z kolei może ulec epimeryzacji w pozycji 7 i przekształcić się w kwas α -muricholowy. Reakcji 6β -hydroksylacji kwasów żółciowych nie stwierdzono dotychczas w wątrobie ssaków naczelnych.

II-5. Kontrola szybkości biosyntezy kwasów żółciowych w wątrobie

Pierwotne kwasy żółciowe powstające w wątrobie i wydzielone z żółcią do jelita cienkiego uczestniczą w emulgacji i absorpcji tłuszczów. Zresorbowane ze światła jelita poprzez system żyły wrotnej wracają do wątroby co skutecznie zachowuje ich pulę w organizmie (35), (Ryc. 5).

W normalnych warunkach szybkość syntezy kwasów żółciowych w wątrobie jest niska i wynosi 200 do 500mg/dobę u człowieka i 5 do 10mg na dobę u szczura (1). Jest ona zupełnie wystarczającą dla pokrycia dobowej utraty kwasów żółciowych z kałem. Podanie żywności cholestyraminowej wiążącej kwasy żółciowe i uniemożliwiającej ich zwrotną resorpcję zmniejsza pulę kwasów żółciowych co prowadzi do 5—10-krotnego wzmożenia ich biosyntezy (38). Ta oraz inne obserwacje doprowadziły do wniosku, że biosyntezę kwasów żółciowych kontroluje mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego, to znaczy, że szybkość biosyntezy kwasów żółciowych zmienia się odwrotnie do wielkości ich napływu do wątroby (39).



Ryc. 5. Krążenie wątrobowo-jelitowe kwasów żółciowych.

Pierwszym enzymem kontrolującym biosyntezę kwasów żółciowych jest 7α -hydroksylaza cholesterolu. Enzym ten wykryto we frakcji mikrosomalnej, a poziom jego aktywności ulega zwiększeniu w wątrobie szczurów z przetoką żółciową lub szczurów, którym podawano żywicę cholestyraminową (40, 41). Inne etapy reakcji prowadzących od cholesterolu do kwasu cholowego w tych warunkach nie ulegały aktywacji. Jedynym wyjątkiem była reakcja 12α -hydroksylacji 7α -hydroksycholest-4-en-3-onu (wzór XI) (41). Enzym 12α -hydroksylaza może odpowiadać za drugi proces

regulacyjny i być może decyduje o stosunku kwasu cholowego do cheno-dezoksycholowego.

Badania przeprowadzone *in vitro* sugerowały, że głównym enzymem regulującym biosyntezę kwasów żółciowych jest zapewne 7 α -hydroksylaza cholesterolowa. To przypuszczenie znalazło swoje potwierdzenie również w badaniach *in vivo* na szczurach (42) oraz na izolowanej perfundowanej wątrobie królika (43). W badaniach tych oznaczano szybkość włączania czterech znakowanych prekursorów 1-¹⁴C-octanu, 2-¹⁴C-mewalonianu, 4-¹⁴C-cholesterolu i 3 α -, 7 α -dwuhydroksy-4-¹⁴C-cholestenu (wzór IX) w kwasy żółciowe. Włączanie znakowanego octanu, mewalonianu lub cholesterolu do kwasów żółciowych było niższe w obecności normalnej ilości krążących kwasów żółciowych, a ulegało znacznemu zwiększeniu w warunkach zmniejszonego napływu kwasów żółciowych do wątroby, intensywność włączania 3 α -, 7 α -dwuhydroksy-4-¹⁴C-cholest-5-enu (wzór IX) natomiast nie ulegała zmianom w zależności od dostawy kwasów żółciowych do wątroby. Wysznuo zatem wniosek, że pod kontrolą sprzężenia zwrotnego znajduje się tylko synteza 3 α -, 7 α -dwuhydroksy-cholest-5-enu (wzór IX), nie podlegają jej zaś dalsze etapy biosyntezy kwasów żółciowych.

Nie wiadomo dotąd czy i jakie etapy syntezy kwasów żółciowych poprzedzające 7 α -hydroksylację cholesterolu podlegają specyficznej kontroli. Tworzenie kwasów żółciowych zależy od ilości cholesterolu syntetyzowanego przez wątrobę lub też dostarczonego do tego narządu (6). Należałoby zatem oczekiwać, że zahamowanie biosyntezy cholesterolu powinno prowadzić do obniżenia szybkości syntezy kwasów żółciowych. Ponieważ enzymem ograniczającym szybkość syntezy cholesterolu jest reduktaza 3-hydroksy-3-metylo-glutaryloCoA (44), czynniki wpływające na zmniejszenie aktywności tego enzymu (lub zmniejszające jego stężenie), na przykład głódzenie (1), mogłyby zapewne prowadzić także do zmniejszenia wytwarzania kwasów żółciowych. Nie można również dotychczas wykluczyć możliwości kontroli aktywności reduktazy 3-hydro-3-metylo-glutaryloCoA przez krążące kwasy żółciowe.

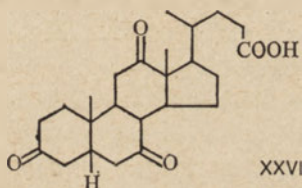
III. Wydzielanie kwasów żółciowych przez wątrobę

Wspomniano wyżej, że pula kwasów żółciowych pochodzi nie tylko z syntezy *de novo* lecz stanowi w dużej mierze materiał reabsorbowany z jelita dostarczany do wątroby przez system żyły wrotnej (45).

Kwasy żółciowe występują w osoczu w formie związanej z białkami (46). Istnieją pośrednie, ale dość przekonujące dowody, że pobieranie związanych z białkami kwasów żółciowych przez komórki wątrobowe zależy od obecności nośnika, który został zlokalizowany w błonie komórkowej (45). Wychwytywanie kwasów żółciowych przez komórki wątrobowe

zachodzi z dużą wydajnością (47). Ze względu na wysoki wskaźnik oczyszczania przez wątrobę, stężenie kwasów żółciowych znajdujących w osoczu ludzi zdrowych jest niskie. Ponieważ ponadto wskaźnik oczyszczania przez nerki jest bardzo niski (48), zawarte w osoczu kwasy żółciowe powracają w niemal całości do wątroby i wchodzą ponownie w cykl jelitowo-wątrobowy.

Bakterie znajdujące się w świetle jelita powodują różne chemiczne modyfikacje kwasów żółciowych, między innymi rozszczepienie wiązania peptydowego między kwasem żółciowym a glicyną i tauryną (1). Reabsorbowane z jelita kwasy żółciowe powracające do wątroby w formie niezwiązanej po sprzężeniu z glicyną lub tauryną (49) są ponownie wydzielane do żółci. Wiązanie kwasów żółciowych z glicyną lub tauryną nie jest jednak konieczne aby komórka wątrobowa mogła je wydzielić do żółci (50).



Badania nad półsyntetycznym kwasem 3, 7, 12-trójketocholanowym (wzór XXVI) pobudzającym komórki wątrobowe do zwiększonego wydzielania żółci (45) wykazały, że kwas ten pobrany przez komórki wątrobowe człowieka zostaje nie tylko wysycony przez glicynę lub taurynę, lecz także ulega modyfikacji w efekcie redukcji jednej lub kilku grup ketonowych (51). Dominującymi pochodnymi powstałymi w tym procesie są kwas 3 α -hydroksy-7, 12-dwuketocholanowy i kwas 3 α -, 7 α -dwohydroksy-12-ketocholanowy. Stwierdzono również, że niewielka ilość kwasu dehydrocholowego (około 5%) ulega redukcji do kwasu cholowego (kwasu 3 α -, 7 α -, 12-trójhdroksychocholowego). Nie wykazano jednak wydalania podanego kwasu dehydrocholowego w formie związanej z glicyną lub tauryną.

Nie znamy dotąd mechanizmu „zagęszczania” kwasów żółciowych wewnątrz komórek wątrobowych. Inne, podane z zewnątrz aniony, takie, jak sulfobromoftaleina i fluoresceina, ulegają znacznemu zagęszczeniu wewnątrz komórek wątrobowych przed sekrecją do kanalików żółciowych (45). Wewnątrzkomórkowe gromadzenie substancji wbrew gradientowi stężeń może wynikać z aktywnego ich pobierania, może także być spowodowane wewnątrzkomórkowym wiązaniem tych substancji. Koncepcja wiązania wewnątrzkomórkowego niektórych anionów organicznych znalazła potwierdzenie przez wykrycie w komórkach wątrobowych dwóch białek (nazwanych Y i Z) odznaczających się wysokim i specyficznym powinowactwem do sulfobromoftaleiny i bilirubiny (52, 53). Czy te białka,

lub inne podobne, uczestniczą w pobieraniu i przechowywaniu kwasów żółciowych w komórce wątrobowej pozostaje dotychczas kwestią nie rozstrzygniętą.

IV. Toksyczne właściwości kwasów żółciowych

Zgromadzone obserwacje wydają się wskazywać, że toksyczność kwasów żółciowych w nadmiarze wynika z interakcji z lipidami błon biologicznych (54). Uszkodzający wpływ kwasów żółciowych zależy jest od liczby grup hydroksylowych obecnych w cząsteczce. Badając wpływ kwasów żółciowych na hemolizę krwinek czerwonych stwierdzono, że najsilniejsze właściwości hemolityczne mają pochodne monohydroksylowe kwasu cholanowego, jak na przykład kwas litocholowy (55), podczas gdy kwas chenodezoksycholowy ma nieco słabsze właściwości hemolityczne, ale znacznie większe niż kwas cholowy.

Innym przykładem właściwości toksycznych, zależących od liczby grup hydroksylowych w cząsteczce kwasu żółciowego, może być rozpręganie procesu oksydatywnej fosforylacji w mitochondriach (56). I w tym przypadku kwas chenodezoksycholowy okazał się bardziej aktywnym niż kwas cholowy, być może z powodu różnej zdolności wiązania się z białkami mitochondrialnymi (54). Toksyczne oddziaływanie kwasów żółciowych na mitochondria jest zastanawiające, ponieważ utlenianie łańcucha bocznego cholesterolu (podczas syntezy kwasów żółciowych) odbywa się właśnie w mitochondriach (29). Związane kwasy żółciowe są mniej aktywne w hamowaniu funkcji mitochondriów (54). Przypuszczalnie ma to związek z łatwiejszym przechodzeniem niezwiązanych kwasów żółciowych przez błony mitochondrialne.

Interakcja dwu- i trójhydroksylowych pochodnych kwasu cholanowego z mikrosomalnym cytochromem P-450 jest szczególnie ważną, ponieważ cytochrom ten katalizuje hydroksylację wielu związków steroidowych (57), a także kwasów żółciowych (1). W strukturze cytochromu P-450 wyróżnia się dwa regiony przestrzenne: hydrofobowy (przypuszczalnie bogaty w fosfolipidy) wiążący składniki rozpuszczalne w tłuszczach takie, jak sterydy i region zawierający pierścień hemowy, który wiąże związki zasadowe takie jak na przykład nikotynoamid (58). Kwasy żółciowe dwuhydroksylowe i w znacznie mniejszym stopniu kwasy trójhydroksylowe wiążą się z fragmentem lipoproteidowym, gdzie kompetytywnie hamują wiązanie substratów właściwych dla tego regionu (59). Jeśli 7 α - i 12 α -hydroksylacje odbywają się także z udziałem cytochromu P-450, na co wskazują wyniki niektórych badań (19, 22), to zahamowanie jego aktywności może doprowadzić do powstania bezpośrednio z cholesterolu monohydroksylowych kwasów żółciowych.

Kwas lithocholowy w odróżnieniu od dwu- i trójhydroksylowych pochodnych kwasu cholanowego wywołuje neoplastyczną transformację hepatocytów (54). Kwas ten i jego pochodna glicynowa mają ponadto silne właściwości pyrogenne, indukując uwalnianie pyrogenu z leukocytów (60). Ponadto związanie z tauryną lub glicyną nie zmniejsza cytotoksycznych właściwości kwasu lithocholowego (61), co obserwowano badając kwasy dwu- i trójhydroksylowe (54).

Te szczególne właściwości mogą wynikać ze stosunkowo niskiej rozpuszczalności wolnego kwasu lithocholowego w wodzie oraz jego połączeń z glicyną i tauryną (62). Kwas lithocholowy wiąże się z białkami transportowymi osocza ze znacznie większym powinowactwem niż kwasy dwu- i trójkarboksylowe (63). Niewielkie ilości kwasu lithocholowego, jakie są absorbowane przez jelito, występują w osoczu w postaci związanej z białkami. Po wychwyceniu przez wątrobę może on ulec hydroksylacji, a także związaniu z glicyną lub tauryną (35). Pochodne glicynowe kwasu lithocholowego nie różnią się toksycznymi właściwościami od kwasu wolnego. Estryfikacja zaś grupy hydroksylowej przez kwas siarkowy redukuje w znacznym stopniu toksyczne właściwości tego kwasu (64). Przypuszczalnie estryfikacja w pozycji 3 stwarza efekt przestrzennej zawady w wiązaniu pierścienia sterydowego kwasu lithocholowego ze strukturami hydrofobowymi błon i organelli komórkowych (54). Siarczan kwasu lithocholowego ze względu na wysoki stopień oczyszczania przez nerki (65), znacznie wyższy niż w przypadku innych kwasów żółciowych, jest szybko wydalany do moczu. Sądzi się, że estryfikacja kwasu lithocholowego stanowi proces odtruwania.

Uwagi końcowe

Jedną z zasadniczych funkcji jaką pełnią kwasy żółciowe w organizmie człowieka i zwierząt jest ich udział w procesie trawienia i absorpcji tłuszczów pokarmowych. Związki te umożliwiają emulgację tłuszczów, stymulują proces lipolizy, ułatwiają wchłanianie a także biorą udział w procesie transportu wchłoniętych tłuszczów z komórek śluzówki jelita do limfy (66). Ponadto kwasy żółciowe odgrywają istotną rolę w sprawnym przebiegu wielu procesów metabolicznych. Zakłócenia w metabolizmie kwasów żółciowych zapoczątkowują lub nasilają nieraz istniejące już schorzenia organizmu. Poznanie mechanizmów, za pośrednictwem których kwasy żółciowe wpływają na prawidłowe funkcjonowanie tkanek i narządów otwiera przeto nowe perspektywy w zakresie profilaktyki i terapii wielu schorzeń metabolicznych, wśród nich kamicy żółciowej (8, 67) oraz miażdżycy (38).

PIŚMIENICTWO

1. Mosbach E. H., (1972), *Arch. Intern. Med.*, **130**, 478—487.
2. Lewis R., Gorbach S., (1972), *Arch. Intern. Med.*, **130**, 545—549.
3. Schersten T., (1967), *Acta Chirurg. Scand.*, suppl. **373**, 3—38.
4. Garbutt J. T., Lach L., Tyor M. P., (1971), *Amer. J. Clin. Nutr.* **24**, 218—228.
5. Hofmann A. F., Small D. M., (1967), *Ann. Rev. Med.*, **18**, 333—376.
6. Wilson J. D., (1972), *Arch. Intern. Med.*, **130**, 493—505.
7. Holt P. R., (1972), *Arch. Intern. Med.*, **130**, 574—583.
8. Wójcicki J., (1974), *Pol. Tyg. Lek.*, **29**, 415—416.
9. Haselwood G. A. D., (1964), *Biol. Rev.*, **39**, 537—574.
10. Carey M. C., Small D. M., (1972), *Arch. Intern. Med.*, **130**, 506—527.
11. Small D. M., (1971), w *The Bile Acids, Chemistry, Physiology and Metabolism*, red. Nair D. P. i Kritchevsky D., t. I, str. 249—356, Plenum Publishing Company, New York.
12. Green F. A., (1971), *J. Colloid Interface Sci.*, **35**, 475—480.
13. Kratochvill J. P., Delli Colli H. T., (1970), *Fed., Proc.*, **20**, 1335.
14. Carey M. C., (1970), *Gastroenterology*, **58**, 1057.
15. Carey M. C., Small D. M., (1970), *Amer. J. Med.*, **49**, 590—608.
16. Dietschy J. M., Salomon H. S., Siperstein M. O., (1966), *J. Clin. Invest.*, **45**, 832—846.
17. Weiss J. B., Holt P. R., (1971), *J. Clin. Invest.*, **50**, 80a.
18. Boyd G. S., Brown M. J. G., Hattersley N. G., Suckling K. E., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **337**, 132—135.
19. Shefer S., Hauser S., Mosbach E. H., (1972), *J. Lipid Res.*, **13**, 69—70.
20. Björkhem J., Karlmar K. E., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **337**, 129—131.
21. Danielsson H., (1969), w *Bile Salt Metabolism*, red. Schiff L., Carey J. B. i Dietschy J. M., str. 252—276, Charles C. Thomas Publishers, Springfield.
22. Einarsson K., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **5**, 101—108.
23. Berséus O., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **2**, 493—502.
24. Hoshita T., Shefer S., Mosbach E. M., (1968), *J. Lipid Res.*, **9**, 237—243.
25. Björkhem J., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **8**, 345—351.
26. Borséus O., Danielsson H., Einarsson K., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1211—1219.
27. Björkhem J., Danielsson H., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **2**, 403—413.
28. Okuda K., Hoshita N., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **164**, 381—388.
29. Björkhem J., Gustafsson J., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **36**, 201—212.
30. Cronholm T., Johansson G., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **16**, 373—381.
31. Okuda K., Takigawa N., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **220**, 141—148.
32. Trietjakova K. A., (1974), *Usp. Sovr. Biol.*, **77**, 35—50.
33. Björkhem J., Danielsson H., Einarsson K., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **2**, 294—302.
34. Ayaki Y., Yamasaki K., (1970), *J. Biochem.*, **63**, 341—346.
35. Small D. M., Dowling M. D., Redinger R. N., (1972), *Arch. Intern. Med.*, **130**, 552—573.
36. Björkhem K., Danielsson H., Einarsson K., (1968), *J. Clin. Invest.*, **47**, 1573—1582.
37. Anderson K. A., Kok E., Javitt N. B., (1972), *J. Clin. Invest.*, **51**, 112—117.

38. Grundy S. M., (1972), *Arch. Intern. Med.*, **130**, 638—648.
39. Dietschy J. M., Wilson J. D., (1970), *New. Eng. J. Med.*, **282**, 1241—1249.
40. Danielsson H., Einarsson K., Johansson G., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **2**, 44—49.
41. Johansson G., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **17**, 292—295.
42. Shefer S., Hauser S., Bekersky J., (1970), *J. Lipid Res.*, **11**, 404—411.
43. Mosbach E. H., Rothschild M. A., Bekersky J., (1971), *J. Clin. Invest.*, **50**, 1720—1730.
44. Frantz J. D., Schroeffer G. J., (1967), *Ann. Rev. Biochem.*, **36**, 691—726.
45. Wheeler H. O., (1972), *Arch. Intern. Med.*, **130**, 533—541.
46. Burke C. W., Lewis B., Panveliwalla D., (1971), *Clin. Chim. Acta.*, **32**, 207—214.
47. O'Maille E. R. L., Richards T. G., Short A. H., (1967), *J. Physiol.*, **189**, 337—350.
48. Weiner I. M., Glessner J. E., Lack L., (1964), *Amer. J. Physiol.*, **207**, 964—970.
49. O'Maille E. R. L., Richards T. G., Short A. H., (1969), *Quart. J. Exper. Physiol.*, **54**, 296—310.
50. O'Maille E. R. L., Richards T. G., Short A. H., (1965), *J. Physiol.*, **180**, 67—79.
51. Soloway R. D., Hoffman A. F., Thomas P. J., (1971), *Gastroenterology*, **60**, 754.
52. Levi A. J., Gatmaitan Z., Arias I. M., (1969), *J. Clin. Invest.*, **48**, 2156—2167.
53. Kaplowitz N., Percy Robb I. W., Javitt N. B., (1973), *J. Exp. Med.*, **138**, 483—487.
54. Palmer R. H., (1972), *Arch. Intern. Med.*, **130**, 606—617.
55. Weissmann G., Keiser H., (1965), *Biochem. Pharmacol.*, **14**, 537—546.
56. Lee M. J., Whitehouse M. H., (1965), *Biochem. Biophys. Acta*, **100**, 317—328.
57. Ramseyer J., Harding B. W., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **315**, 306—316.
58. Remmer H., (1970), *Amer. J. Med.*, **49**, 617—629.
59. Denk H., Schenkman J. B., Bacchin P. G., (1971), *Exp. Mol. Path.*, **14**, 263—276.
60. Dillard G. M., Bodel P., (1970), *J. Clin. Invest.*, **49**, 2418—2426.
61. Dawson A. M., Isselbacher K. J., (1960), *J. Clin. Invest.*, **39**, 730—740.
62. Small D. M., Admirand W., (1969), *Nature*, **221**, 265—267.
63. Rudman D., Kendall F. E., (1957), *J. Clin. Invest.*, **36**, 538—542.
64. Palmer R. H., Bolt M. G., (1971), *J. Lipid Res.*, **12**, 671—679.
65. Palmer R. H., (1971), *J. Lipid Res.*, **12**, 680—687.
66. Borgström B., (1974), *Acta Med. Scand.*, **196**, 1—10.
67. Redinger R. N., Small D. M., (1972), *Arch. Intern. Med.*, **130**, 618—630.

SPRAWOZDANIE

Krajowa konferencja bioenergetyczna

Warszawa, 10 — 11 luty 1975 r.

W dniach 10 i 11 lutego 1975 r. odbyła się w Warszawie krajowa konferencja bioenergetyczna, zorganizowana przez Zakład Biochemii Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego wspólnie z niedawno utworzoną Sekcją Bioenergetyczną Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Konferencja ta była kolejnym z serii spotkań polskich bioenergetyków. Dwie podobne konferencje miały miejsce w ubiegłych latach w Warszawie, a jedna w 1974 r. w Gdańsku. Podobnie jak poprzednie także obecna konferencja miała charakter roboczo-dyskusyjny. Udział w niej wzięło ponad 50 osób z 5 ośrodków akademickich (Białystok, Gdańsk, Poznań, Szczecin i Warszawa), przy czym 24 uczestników przedstawiło doniesienia z bieżąco wykonywanych badań. Głównymi reprezentowanymi problemami były: transport jonów i metabolitów przez błony biologiczne, wpływ różnych czynników na oksydacyjną fosforylację i stany energetyczne mitochondriów oraz regulacja metabolizmu na poziomie mitochondrialnym. Jedyny gość zagraniczny konferencji, doc. L. Kováč z Bratysławy, przedstawił sprawozdanie z odbytego wcześniej w Lenigradzie sympozjum na temat genetycznych funkcji mitochondriów. Ze względu na roboczy charakter konferencji i prezentowanie badań nieukończonych postanowiono nie publikować żadnych materiałów sprawozdawczych. Wydaje się, że byłoby celowe coroczne organizowanie podobnych konferencji.

L. Wojtczak

SPIS TREŚCI

J. Duszyński — Transport nukleotydów adeninowych w mitochondriach	
W. Michalski — Dysmutaza ponadtlenkowa	275
B. L. Slomiany, A. Slomiany, J. Badurski — Budowa i funkcja glikolipidów siarczanowych	295
W. Lutz — Kwasy żółciowe	319
Sprawozdanie — Krajowa konferencja Bioenergetyczna, Warszawa 10—11.II.1975	337
(L. Wojtczak)	355

POSTĘPY BIOCHEMII

September 1975

ARTICLES IN POLISH

Volume 21	Number 3
J. Duszyński — Transport of Adenine Nucleotides in Mitochondria (Dept. Cell. Biochem., Nencki Inst. Exp. Biol., Warszawa)	275
W. Michalski — Superhydroxyl Dismutase (Dept Enzym., Inst. Biochem., University of Warsaw, Warszawa)	295
B. L. Słomiány, A. Słomiány, J. Badurski — Structure and Function of Sulfated Glycolipids (New York Medical College, Dept Biochem., Valhalla, New York, Dept Med. Acad. Med., Białystok)	319
W. Lutz — Bile Acids (Dept Med. Anal. Inst. Inter. Med., Military Medical Academy, Łódź)	337
Communication	355

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

Piśmiennictwo: W artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postępkach 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 Biochemików (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 stronę 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 pierwszego 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 „górną” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny w druku podejmuje wydawca.

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

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

SPIS TREŚCI

J. Duszyński — Transport nukleotydów adeninowych w mitochondriach	275
W. Michalski — Dysmutaza ponadtlenkowa	295
B. L. Slomiany, A. Slomiany, J. Badurski — Budowa i funkcja glikolipidów siarczanowych	319
W. Lutz — Kwasy żółciowe	337
Sprawozdanie — Krajowa konferencja Bioenergetyczna, Warszawa 10—11.II.1975 (L. Wojtczak)	355