

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 29 (2)
(97-244) (1983)

1983

tom 29 nr 2

PL ISSN 0032-5422

Polonia



Pw

<http://rcin.org.pl>

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy, oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny w sposób syntetyczny omawiać wybrany temat na podstawie możliwie pełnego piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu na podstawie piśmiennictwa z ostatnich dwu lat. Objętość takich artykułów nie powinna przekraczać 25 stron maszynopisu (nie licząc ilustracji i piśmiennictwa). Kwartalnik publikuje także artykuły typu *minireviews*, do 10 stron maszynopisu, z dziedziny zainteresowań autora, opracowane na podstawie najnowszego piśmiennictwa, wystarczającego dla zilustrowania problemu. Ponadto kwartalnik publikuje krótkie noty, do 3 stron maszynopisu, informujące o nowych, interesujących osiągnięciach biochemii i nauk pokrewnych oraz noty przybliżające historię badań w zakresie różnych dziedzin biochemii. 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 podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

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

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, adresy prywatne, 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), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i jego (ich) 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 obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły rzeczowo winny informować o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I-1.). 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. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. 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 niewprowadzanie do tekstu tworzonych doraźnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

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

Polimery

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

TOM 29 ZESZYT 2
1983

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 29 (2)
(97-244) (1983)

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)

Zastępca przewodniczącego: I. Szumiel (Warszawa), Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa).

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Chorąży (Gliwice), E. Czuryło (Warszawa), W. Drabikowski (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), E. Gąsior (Lublin), J. Gregorczyk (Szczecin), M. Gumińska (Kraków), D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawelkiewicz (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa), L. Wojtczak (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa).

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

SEKRETARZ REDAKCJI

M. Skup

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (Warszawa), J. Rytka (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa).

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1983

Nakład 1810	Oddano do składania 31.III.1983 r.
Ark. wyd. 11,5, ark. druk. 9,25	Podpisano do druku w listopadzie 1983 r.
Papier druk. sat. kl. V 70 g, 70×100	Druk ukończono w grudniu 1983 r.
Zam. 4437/12/83	Cena zł 90.—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

<http://rcin.org.pl>

Od Rady Redakcyjnej „Postępów Biochemii”

Pragnąc choć w części zaradzić brakom w dostępie do informacji naukowej i wynikłym stąd stratom Rada Redakcyjna zwraca się do Czytelników z apelem o nadsyłanie — obok tradycyjnych obszernych artykułów monograficznych — krótkich prac przeglądowych, objętością i formą zbliżonych do „*mini-reviews*” zamieszczanych w takich czasopismach jak *Cell*, *Life Sciences*, *Cell Biology International Reports*, *Trends in Biochemical Sciences*. Chodzi nam o to, by wykorzystać kontakty osobiste i zbiory odbitek tych, którzy pasjonują się jakąś dziedziną biochemii, niekiedy dość wąską, ale mogącą liczyć na oddźwięk i zainteresowanie Czytelników ze względu na znaczenie poznawcze i praktyczne.

Proponowana objętość pracy — od 5 do 10 stron maszynopisu, 1-2 ryciny (tylko wtedy, gdy w istotny sposób ułatwiają zrozumienie tekstu) oraz od kilku do kilkunastu najważniejszych pozycji piśmiennictwa. Przykładem może być drukowany w bieżącym zeszycie artykuł J. Zborowskiego na str. 101. Sądzymy, że taka forma publikacji wzbogaci i urozmaici tematykę artykułów w „*Postępach Biochemii*”, a także przyczyni się do rozszerzenia kręgu autorów i szybszego upowszechnienia ciekawych problemów współczesnej biochemii.

Tych, którzy zechcieliby podzielić się w formie krótkich prac przeglądowych swoimi zasobami informacji, Rada Redakcyjna prosi o wcześniejsze zgłaszanie tematów do Redakcji, aby uniknąć ich wielokrotnego opracowywania przez różnych autorów.

MINI-REVIEW

JÓZEF ZBOROWSKI *)

Cytoplazmatyczne białka transportujące fosfolipidy

Cytoplasmic Proteins Transferring Phospholipids

Wykazanie przez Wirtza i Zilversmita (1, 2) stymulacji wymiany fosfolipidów pomiędzy mitochondriami a mikrosomami wątroby przez frakcję cytoplazmatyczną tej tkanki zapoczątkowało nowy kierunek badań nad wewnątrzkomórkowymi białkami zdolnymi do wiązania i transportu fosfolipidów. Obecność białek przenoszących fosfolipidy wykazano później w wielu tkankach. Szereg białek oczyszczono do stanu homogenności i określono ich specyficzność względem transportowanych fosfolipidów. Podstawowe informacje na ten temat zawarte są m.in. w artykule przeglądowym autora niniejszego opracowania opublikowanym na łamach „Postępów Biochemii” (3). Obecnie lista białek przenoszących fosfolipidy powiększyła się znacznie. Oprócz białek bezwzględnie specyficznych, jak białko transportujące fosfatydylocholinę oczyszczone z wątroby wołu (4) lub z wątroby szczura (5), względnie specyficznych, jak białka przenoszące fosfatydyloinozytol i fosfatydylocholinę oczyszczone z mózgu wołu (6), czy wątroby szczura (7) lub serca wołu (8), wyizolowano ciepłotrwałe białko niskocząsteczkowe z wątroby szczura (9) (masa cząsteczkowa ok. 13 500) niespecyficznie przenoszące różne fosfolipidy, w tym fosfatydyloetanoloaminę, dla której białko transportującego poszukiwano od dawna. Ścisłej, frakcja cytoplazmatyczna wątroby szczura zawiera dwa białka, z których jedno oczyszczono 876 razy. Białko to było zdolne również do transportu cholesterolu. Dwa niskocząsteczkowe, niespecyficzne względem przenoszonych fosfolipidów białka o bardzo zbliżonej masie cząsteczkowej zostały wyizolowane także z wątroby wołu (10). Białka te podobnie jak białko z wątroby szczura nie transportują i nie wiążą kardiolipiny.

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

W tkance płucnej oprócz białek: specyficznie transportującego fosfatydylocholinę i niskocząsteczkowego niespecyficznie transportującego fosfolipidy, w tym także i fosfatydyloglicerol, wykazano obecność białka o jeszcze mniejszej masie cząsteczkowej specyficznie przenoszącego fosfatydyloglicerol (11). Białko to nie występuje jednak w pęcherzykowych komórkach nabłonkowych typu II (12), które odpowiedzialne są za syntezę (13, 14) wydzieliny nabłonkowej (ang. termin *surfactant*), w skład której wchodzi dwunasycone fosfolipidy, dwupalmitylofosfatydylocholina i dwupalmitylofosfatydyloglicerol. Rola tych fosfolipidów polega na obniżaniu napięcia powierzchniowego, przez co pęcherzyki płucne chronione są przed zapadaniem się podczas wydechu. W komórkach nabłonkowych typu II występują unikalne struktury (ang. termin *lamellar bodies*) będące miejscem przechowywania wydzieliny przed jej sekrecją na powierzchnię pęcherzyka. Mechanizm, w jaki sposób fosfolipidy wydzieliny nabłonkowej przedostają się z miejsca ich syntezy do miejsca ich przechowywania, nie jest znany. Bardzo prawdopodobny jest tu udział białek transportujących fosfolipidy. Za sugestią tą przemawia stwierdzenie, że komórki typu II w porównaniu z całą tkanką są bardzo wzbogacone w niskocząsteczkowe białko niespecyficzne względem przenoszonych fosfolipidów (12).

Dużo uwagi poświęcono ostatnio białkom przenoszącym fosfolipidy występującym w tkankach nowotworowych. Pierwsze dane dotyczą guza nowotworowego hepatoma 27, o którym wiadomo, iż błony jego wewnątrzkomórkowych organelli mają prawie identyczny skład fosfolipidowy (15). Z guza tego oczyszczono niskocząsteczkowe białko transportujące fosfolipidy (16). Białko to testowane w układzie liposomy — mitochondria nie wykazywało różnic w aktywności transportującej względem sfingomieliny, fosfatydylocholinę lub fosfatydyloinozytolu. Natomiast, frakcja cytoplazmatyczna hepatomy 27 (pozbawiona lipoprotein przez wytrącenie ich w pH 5,1) użyta jako źródło białka wykazywała w porównaniu z frakcją cytoplazmatyczną wątroby znacznie większą aktywność transportującą względem fosfatydylocholinę, fosfatydyloinozytolu i fosfatydyloetanolaminy w układzie mikrosomy — mitochondria wątroby lub mikrosomy — mitochondria hepatomy. Przenoszenie fosfolipidów z mikrosomów do mitochondriów zachodziło poprzez ich wymianę, nie stwierdzono bowiem zmian zawartości fosfolipidów w badanych błonach. Interesujące jest, że frakcja cytoplazmatyczna hepatomy zdolna była ponadto do transportu netto sfingomieliny do mitochondriów w obydwu układach, a także do pośredniczenia w wymianie kardiolipiny pomiędzy mikrosomami a mitochondriami hepatomy (16).

Zastosowanie w późniejszych badaniach (17) techniki chromatografii powinowactwa i żeli z kowalencyjnie związaną fosfatydylocholiną lub sfingomieliną pozwoliło na stwierdzenie znacznie większego powinowactwa białka z hepatomy względem sfingomieliny, aniżeli względem

fosfatydylocholino. Przeciwciała otrzymane przeciwko niskocząsteczkowemu, transportującemu sfingomielinę, białku z hepatoma 27 dawało w doświadczeniach immunodyfuzyjnych precypitat nie tylko z frakcją cytoplazmatyczną hepatomy 27, ale również z frakcją cytoplazmatyczną innych nowotworów, takich jak sarkoma 45, sarkoma Jensena, nefroma RA, a także z frakcją cytoplazmatyczną wątroby płodowej szczura. Świadczy to o występowaniu w nich takiego samego lub strukturalnie podobnego białka. Precypitat nie tworzył się natomiast w przypadku frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura dorosłego i wątroby regenerującej. Ciekawe jest stwierdzenie, że mitochondria komórek nowotworów, których frakcja cytoplazmatyczna dawała precypitat z przeciwciałem przeciwko transportującemu sfingomielinę białku z hepatomy 27, zawierają znaczne ilości tego fosfolipidu, podczas gdy nie występuje on w mitochondriach wątroby szczura dorosłego i szczurzej wątrobie regenerującej (17). Najwyższą aktywność transportującą sfingomieliny wykazywała frakcja cytoplazmatyczna z hepatomy 27 i wątroby płodowej szczura. Mitochondria komórek tych tkanek są też najbardziej bogate w sfingomielinę. Inne tkanki, których frakcja cytoplazmatyczna dawała odpowiedź immunologiczną pozytywną, wykazywały też aktywność transportującą sfingomielinę. Nie wykazywała jej natomiast frakcja cytoplazmatyczna wątroby szczura dorosłego. Omówione wyżej wyniki wyraźnie wskazują na udział białka niskocząsteczkowego w tkankach nowotworowych w transporcie sfingomieliny z endoplazmatycznego retikulum do mitochondriów. Można też alternatywnie wnioskować, że w mitochondriach tkanek nowotworowych zachodzi synteza sfingomieliny, która nie zachodzi w tkankach normalnych. Kwestia ta wymaga dalszych badań.

Interesujące wyniki dotyczące obecności i aktywności różnych białek transportujących fosfolipidy w rosnących z różną szybkością hepatomach Morrisa otrzymano w laboratorium Wirtza (5, 18, 19). Okazało się (5), że o ile frakcja cytoplazmatyczna komórek wątroby szczurów kontrolnych i tkanki gospodarza nowotworu nie różni się pod względem aktywności transportu fosfatydylocholino, to frakcja cytoplazmatyczna szybko rosnącej hepatomy Morrisa 7777 wykazuje ponad 2,5-krotny wzrost aktywności. Podobnie, ok. 2-krotny wzrost aktywności uzyskano mierząc transport fosfatydyloinozytolu. W przypadku rosnącej z mniejszą szybkością hepatomy Morrisa 7787 wzrost aktywności transportującej tych fosfolipidów był znacznie mniejszy, a w przypadku bardzo wolno rosnącej hepatomy Morrisa 9633 nie był obserwowany. Warto podkreślić, że aktywność transportująca frakcji cytoplazmatycznej komórek wszystkich wymienionych wyżej nowotworów względem fosfatydyloetanoloaminy nie przekraczała 15⁰% aktywności transportującej frakcji cytoplazmatycznej komórek wątroby szczura, co praktycznie wskazuje na nie-

obecność w komórkach nowotworowych niskocząsteczkowego, niespecyficznego białka transportującego fosfolipidy.

Zastosowanie przeciwciała przeciwko wysokocząsteczkowemu białku wątroby szczura, transportującemu /wyłącznie fosfatydylocholinę, pozwoliło na określenie jego udziału w całkowitej aktywności (względem tego fosfolipidu) frakcji cytoplazmatycznej komórek wątroby normalnej, a także wszystkich wspomnianych wyżej nowotworów. I tak w przypadku frakcji cytoplazmatycznej komórek wątroby normalnej białko to jest w 50% odpowiedzialne za transport fosfatydylocholiny mierzony w układzie mikrosomy — liposomy. Podobnie, białko to odpowiada za 50% aktywności transportującej fosfatydylocholinę frakcji cytoplazmatycznej komórek gospodarza nowotworu. W przypadku komórek hepatomy 7777 białko to odpowiedzialne jest w 60%, natomiast w przypadku komórek wolno rosnącej hepatomy 9633 jedynie w 30% (5). Oznaczona aktywność wysokocząsteczkowego białka przenoszącego fosfatydylocholinę w komórkach badanych hepatom Morrisa była proporcjonalna do ich zawartości oznaczonej specjalnie opracowanym testem radioimmunologicznym z użyciem podwójnych przeciwciał (18). W przypadku komórek normalnej wątroby szczurzej test ten wykazał znacznie większą zawartość białka, aniżeli wynikałoby to z aktywności określonej przez miareczkowanie przeciwciałem, co sugeruje możliwość występowania białka częściowo w formie nieaktywnej (18). Wspomniany wyżej test radioimmunologiczny pozwolił też na stwierdzenie tożsamości białka specyficznie przenoszącego fosfatydylocholinę występującego w różnych tkankach szczura oraz na określenie jego zawartości, która najwyższa jest w wątrobie i śluzówce jelita, a następnie w nerce, śledzionie i płucu. Białko to nie występuje natomiast w mózgu i sercu szczura (19). W tkance wątrobowej, przy frakcjonowanym wirowaniu 10% sacharozowego homogenatu, 60% białka znaleziono we frakcji cytoplazmatycznej, a 40% poza nią, co sugeruje, że białko w tkance może być związane z błonami wewnątrzkomórkowymi (19).

Według danych Hostetlera i wsp. (20) mitochondria szybko rosnących hepatom Morrisa 7777 i 7787 wykazują znacznie wyższą niż mitochondria wątroby szczura zawartość fosfatydylocholiny wyrażoną w nmolach fosforu fosfolipidowego na mg białka. Prawie dwukrotny wzrost ilości fosfatydylocholiny (a także fosfatydyloinozytolu) stwierdzono w przypadku hepatomy 7777. W hepatomie 7787 zawartość fosfatydylocholiny jest o połowę wyższa niż w wątrobie normalnej. W mitochondriach obu hepatom znacznie wyższa też jest ilość fosfatydyloetanoloaminy. Opierając się na tych danych, a także na stwierdzonej przez siebie wyższej aktywności białek transportujących fosfatydylocholinę i fosfatydyloinozytol, Wirtz i wsp. (5) wskazują na możliwą rolę tych białek w transporcie fosfatydylocholiny i fosfatydyloinozytolu *in vivo* z miejsca syntezy, tj. z endoplazmatycznego retikulum do mito-

chondriów. Natomiast wzrost zawartości fosfatydyloetanolaminy w mitochondriach komórek szybko rosnących hepatom, przy nieobecności białka transportującego ten fosfolipid (białko niskocząsteczkowe, niespecyficzne), może wskazywać na inną drogę syntezy, która w mitochondriach wątroby normalnej w ogóle nie zachodzi. Za taką możliwością przemawia stwierdzenie syntezy fosfatydyloseryny w mitochondriach hepatomy Morrisa 7777 (21) w reakcji wymiany zasady (patrz poz. 22), która w mitochondriach tkanek normalnych nie zachodzi. Nowoutworzona fosfatydyloseryna może ulegać dekarboksylacji do fosfatydyloetanolaminy. Enzym katalizujący tę reakcję znajduje się w mitochondriach (23).

Znacznie wyższą zawartość fosfatydylocholine, sfingomieline, a także innych fosfolipidów, niż w mitochondriach normalnej wątroby kurczęcia, wykazano niedawno też w mitochondriach hepatomy indukowanej białczkowym wirusem MC-29 (24). Z frakcji cytoplazmatycznej tkanki nowotworowej wyodrębniono białko niespecyficzenie przenoszące fosfolipidy o dość dużej aktywności transportowej względem sfingomieline. W tkance normalnej obok tego białka występuje inne niskocząsteczkowe, specyficzenie transportujące sfingomielinę (24).

Jak już wspomniano, żadne z niskocząsteczkowych białek dotychczas izolowanych z tkanek zwierzęcych nie ma zdolności przenoszenia kardiolipiny. Białko takie natomiast, a ściślej dwie frakcje białkowe, oczyszczono częściowo z *Bacillus subtilis* (25). Frakcja pierwsza transportuje z większą efektywnością fosfatydyloetanolaminę, frakcja druga fosfatydyloglicerol i kardiolipinę. Występowanie takich właśnie białek u *Bacillus subtilis* wydaje się być uzasadnione, jeśli weźmie się pod uwagę skład fosfolipidowy błon tej bakterii (kardiolipina stanowi 63% ogólnej zawartości fosfolipidów, fosfatydyloglicerol 22%, fosfatydyloetanolamina 12%) (25).

Innym, szeroko podjętym w ostatnim okresie problemem jest udział białek transportujących fosfolipidy w ich transporcie netto. Szczególną uwagę zwrócono na białko transportujące fosfatydyloinozytol. Białko to, jak już wspomniano wyżej, jest zdolne również do wiązania i transportu fosfatydylocholine. We wcześniejszych pracach przy użyciu frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura (26), a także oczyszczonego białka z mózgu (27), wykazano niezależnie transport jednokierunkowy fosfatydyloinozytoli z mikrosomów lub mitochondriów do liposomów fosfatydylocholinowych. W obydwu pracach stwierdzono także, że wprowadzenie fosfatydyloinozytoli do liposomów hamowało transport tego fosfolipidu z mikrosomów, podobnie jak to ma miejsce w przypadku białka transportującego fosfatydylocholinę (28). Z jednej strony wskazuje to na zależność transportu od składu fosfolipidowego liposomów i na hamujący wpływ ujemnego ładunku, jaki wnoszony jest z fosfatydyloinozytolem, z drugiej jednak potwierdza, że obecność fosfatydyloinozytoli w błonie

akceptorowej nie jest konieczna dla transportu tego fosfolipidu z mikrosomów. Przy użyciu białka izolowanego z mózgu stwierdzono również transport fosfatydyloinozytolu z błony monomolekularnej do liposomów zbudowanych z fosfatydylocholine (29). Wykazanie jednokierunkowego transportu fosfatydyloinozytolu (26, 27, 29) nie przesądzało jednak kwestii, czy transport ten nie jest kompensowany transportem fosfatydylocholine w kierunku przeciwnym. Za tym, że tak jest przemawiało stwierdzenie, że transport fosfatydyloinozytolu zachodzi do liposomów zawierających fosfatydylocholinę, a nie zachodzi do liposomów zbudowanych z fosfatydyloseryny lub sfingomieline (30). O ile w przypadku fosfatydyloseryny można myśleć o hamującym działaniu ujemnego ładunku, to w przypadku sfingomieline (fosfolipid o zerowym wypadkowym ładunku elektrycznym) nie może to mieć miejsca. Uzyskane wyniki można jednak tłumaczyć bądź wymianą fosfatydyloinozytolu na fosfatydylocholinę, bądź koniecznością obecności fosfatydylocholine w błonie liposomalnej, aby białko transportujące mogło uwolnić fosfatydyloinozytol. Interesujące jest też, że mimo znacznego podobieństwa struktury grupy polarnej fosfatydylocholine i sfingomieline, białko transportujące fosfatydyloinozytol nie może go transportować do liposomów zbudowanych ze sfingomieline. Jak wykazano później przy użyciu techniki błon monomolekularnych, białko transportujące fosfatydyloinozytol nie wiąże sfingomieline, a co więcej, sfingomielina wbudowana do liposomów fosfatydylocholinowych jest inhibitorem transportu fosfatydyloinozytolu (31).

Ostatecznie kwestia, czy transport fosfatydyloinozytolu jest kompensowany transportem fosfatydylocholine w kierunku przeciwnym rozstrzygnięta została przy użyciu techniki błon monomolekularnych. Analogicznie do doświadczenia, w którym mierzono wymianę fosfatydylocholine pomiędzy dwiema błonami monomolekularnymi tego fosfolipidu ((32), badania te przedstawione były także w artykule przeglądowym (poz. 3)), wykonano doświadczenie z białkiem transportującym fosfatydyloinozytol (33). Błona monomolekularna I zbudowana była z radioaktywnego fosfatydyloinozytolu, błona monomolekularna II z nieradioaktywnej fosfatydylocholine w ilości ekwimolarnej. Błony te miały styczność ze sobą jedynie poprzez fazę wodną. Oprócz zmian radioaktywności powierzchniowej obu błon śledzono ewentualne zmiany napięcia powierzchniowego. Po wstrzyknięciu białka transportującego izolowanego z mózgu wykazano obniżanie się radioaktywności błony fosfatydyloinozytolowej i pojawianie się piętna w fazie wodnej i warstwie początkowo zbudowanej wyłącznie z fosfatydylocholine. Po 5 godzinach 25% radioaktywnego fosfatydyloinozytolu pozostało w błonie monomolekularnej fosfatydyloinozytolowej, ok. 70% znaleziono w fazie wodnej w formie związanej z białkiem i ok. 4% w warstwie początkowo zbudowanej wyłącznie z fosfatydylocholine. Wynik ten wobec braku zmiany napięcia powierzchniowego obu błon monomolekularnych świadczy o wymianie

fosfatydyloinozytolu na fosfatydylocholinę pomiędzy obu błonami, w czym pośredniczy dodane białko (33).

Izolowane białko z mózgu może zawierać związany fosfatydyloinozytol lub fosfatydylocholinę. Wiadomo, że białko to wykazuje znaczniejsze powinowactwo względem fosfatydyloinozytolu niż fosfatydylocholinę (29). Jednakże wiązanie tych fosfolipidów w warunkach *in vivo* na pewno zależy od ich stosunku i stężenia w błonie. „Ładując” białko fosfatydyloinozytolem lub fosfatydylocholiną wykazano, że szybkość wymiany fosfatydyloinozytolu z błony monomolekularnej na fosfatydyloinozytol związany z białkiem (lub fosfatydylocholinę na fosfatydylocholinę) jest ponad 7-krotnie niższa niż fosfatydyloinozytolu z błony monomolekularnej na fosfatydylocholinę związaną z białkiem. Doświadczenie to jest dodatkowym argumentem przemawiającym za wymianą dwóch rodzajów fosfolipidów i potwierdza także większe powinowactwo białka względem fosfatydyloinozytolu (33). Białko oczyszczone z mózgu może, jak okazało się, oprócz fosfatydyloinozytolu i fosfatydylocholinę transportować także i fosfatydyloglicerol (33).

Transport fosfatydyloinozytolu z błony monomolekularnej przy udziale „mózgowego” białka przenoszącego hamowany jest przez obecność ujemnego ładunku w liposomach. Transport ten nie zachodzi, jeśli liposomy zawierają 20 mol^o% fosfatydyloinozytolu lub kwasu fosfatydowego. Podobnie, fosfatydyloinozytol nie jest transportowany do liposomów fosfatydyloserynowych lub fosfatydyloglicerolowych (33).

Białko transportujące fosfatydyloinozytol wykazuje też określone wymagania względem długości kwasów tłuszczowych w „akceptorowej” fosfatydylocholinie. W przeciwieństwie do danych Helmkampa (34), w badaniach z zastosowaniem techniki błon monomolekularnych nie stwierdzono różnic w transporcie fosfatydyloinozytolu do liposomów dwupalmitylofosfatydylocholinowych poniżej i powyżej temperatury przejścia fazowego tego ostatniego fosfolipidu. Liposomy fosfatydylocholinowe dwu-eterowe i dwu-alkilowe mogą również służyć jako „błona akceptorowa” (50% szybkości transportu) (33).

Jak przedstawiono wyżej, transport fosfatydyloinozytolu przy udziale wysokocząsteczkowego białka przenoszącego izolowanego z mózgu odbywa się na drodze wymiany z fosfatydylocholiną. Według danych Craina i Zilvermita (35) „wątrobowe” białko specyficznie przenoszące fosfatydylocholinę oraz „sercowe” przenoszące fosfatydyloinozytol (mogące także przenosić fosfatydylocholinę) transportowały bardzo małe ilości właściwych sobie fosfolipidów do odlipidowanych lipoprotein o dużej gęstości, podczas gdy znaczne ilości fosfolipidów transportowane były do lipoprotein nieodlipidowanych. W tych samych warunkach inkubacji niespecyficzne, niskocząsteczkowe białko izolowane z wątroby wołu pośredniczyło w transporcie netto fosfatydylocholinę na dużą skalę do lipoprotein odlipidowanych. Białko to mogło również dostarczyć lipo-

somalną fosfatydylocholinę do mitoplastów (mitochondriów pozbawionych błony zewnętrznej).

Na podstawie przedstawionych wyżej danych można myśleć o próbie pewnego uogólnienia odnośnie mechanizmu transportu fosfolipidów przy udziale białek przenoszących. I tak wydaje się, że białka o dużej masie cząsteczkowej pośredniczą w transporcie głównie poprzez wymianę fosfolipidów między błonami (wyjątkiem mogą być białka transportujące fosfolipidy w szybko rosnących hepatomach Morrisa 7777 i 7787), białka zaś o małej masie cząsteczkowej (niespecyficzne) uczestniczą raczej w transporcie netto fosfolipidów.

Zaakceptowano do druku 19.1.1983

PIŚMIENNICTWO

1. Wirtz K. W. A., Zilversmit D. B., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3596—3602.
2. Wirtz K. W. A., Zilversmit D. B., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 105—116.
3. Zborowski J., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 541—557.
4. Kamp H. H., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **318**, 313—325.
5. Poorthuis B. J. H. M., van der Krift T. P., Teerlink T., Akeroyd R., Hostetler K. Y., Wirtz K. W. A., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 376—386.
6. Helmkamp G. M., Jr., Harvey M. S., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6382—6389.
7. Lumb R. H., Kloosterman A. D., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **69**, 15—22.
8. DiCorleto P. E., Warach J. B., Zilversmit D. B., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7795—7802.
9. Bloj B., Zilversmit D. B., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1613—1619.
10. Crain R. C., Zilversmit D. B., (1980), *Biochemistry*, **19**, 1433—1439.
11. Van Golde L. M. G., Oldenburg V., Post M., Batenburg J. J., Poorthuis B. J. H. M., Wirtz K. W. A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6011—6013.
12. Post M., Batenburg J. J., Schuurmans E. A. J. M., van Golde L. M. G., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **620**, 317—321.
13. Goerke J., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **344**, 241—261.
14. Batenburg J. J., van Golde L. M. G., (1979), w *Reviews in Perinatal Medicine*, red. Scarpelli E. M., Cosmi E. V., t. **3**, str. 73—114. Raven Press, New York.
15. Bergelson L. D., Dyatlovitskaya E. V., Torkhovskaya T. I., Sorokina I. B., Gorkowa N. P., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **210**, 287—298.
16. Dyatlovitskaya E. V., Timofeeva N. G., Bergelson L. D., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **82**, 463—471.
17. Dyatlovitskaya E. V., Timofeeva N. G., Yakimenko E. F., Barsukov L. I., Muzya G. I., Bergelson L. D., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **123**, 311—315.

18. Teerlink T., Poorthuis B. J. H. M., van der Krift T. P., Wirtz K. W. A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **665**, 74—80.
19. Teerlink T., van der Krift T. P., Post M., Wirtz K. W. A., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **713**, 61—67.
20. Hostetler K. Y., Zenner B. D., Morris H. P., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 2978—2983.
21. Hostetler K. Y., Zenner B. D., Morris H. P., (1979), *J. Lipid Res.*, **20**, 607—613.
22. Zborowski J., Sarzała M. G., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 23—34.
23. Dennis E. A., Kennedy E. P., (1972), *J. Lipid Res.*, **13**, 263—267.
24. Koumanov K., Boyanow A., Neicheva T., Markowska T., Momchilova A., Gavazova E., Chelibonova-Lorer H., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **713**, 23—28.
25. Lemaesquier H., Bureau G., Mazliak P., Kader J-C., (1982), *Int. J. Biochem.*, **14**, 71—74.
26. Zborowski J., Wojtczak L., (1975), *FEBS Lett.*, **51**, 317—320.
27. Harvey M. S., Helmkamp G. M., Jr., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1974), *FEBS Lett.*, **46**, 260—262.
28. Wirtz K. W. A., Geurts van Kessel W. S. M., Kamp H. H., Demel R. A., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **61**, 515—523.
29. Demel R. A., Kalsbeek R., Wirtz K. W. A., van Deenen L. L. M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **466**, 10—22.
30. Zborowski J., (1979), *FEBS Lett.*, **107**, 30—32.
31. Demel R. A., van Bergen B. G. M., van den Eeden A. L. G., Zborowski J., Defize L. H. K., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **710**, 264—270.
32. Demel R. A., Wirtz K. W. A., Kamp H. H., Geurts van Kessel W. S. M., van Deenen L. L. M., (1973), *Nature New Biology*, **246**, 102—105.
33. Zborowski J., Demel R. A., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 381—387.
34. Helmkamp G. M., Jr., (1980), *Biochemistry*, **19**, 2050—2056.
35. Crain R. C., Zilversmit D. B., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **620**, 37—48.

PIOTR MASŁOWSKI *), HALINA MASŁOWSKA **)

Właściwości, struktura i funkcja chloroplastowego czynnika sprzęgającego (CF₁)

Properties, Structure and Function of a Chloroplast Coupling Factor (CF₁)

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Właściwości rozpuszczalnego CF₁
- III. Struktura i funkcje podjednostek
- IV. Właściwości CF₁ związanego z błoną
- V. Zmiany konformacyjne
- VI. Wiązania nukleotydów
- VII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Properties of soluble CF₁
- III. Subunits, structure and function
- IV. Properties of membrane-bound CF₁
- V. Conformational changes
- VI. Nucleotide binding
- VII. Concluding remarks

I. Wstęp

Od czasu stwierdzenia przez Lipmanna (1), że ATP jest nośnikiem wiązań wysokoenergetycznych wiele uwagi poświęcono mechanizmowi syntezy tego związku. Wykrycie sprzężenia pomiędzy transportem

*) Prof. dr hab. Instytut Biologii, Zakład Biochemii UMK, Toruń.

***) Dr, Instytut Biologii, Zakład Biochemii UMK, Toruń.

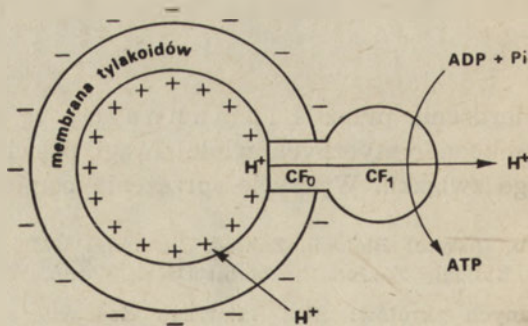
Wykaz stosowanych skrótów: SDS — siarczan dodecylu sodu; DCCD-N,N — dwucykloheksylokarbodwuimid; NBD — 7-chloro-4-nitrobenzeno-2-oksyo-1, 3 diazolo; POH — H₃PO₄; ADPOH — ADP; Pi — ortofosforan; DOC — dezoksychofan sodu; EEDQ — 1-etoksy karbonylo-2-etoksy-1,2-dwuhydro-quinolina; DTT — dwutiotreitol.

elektronów a fosforylacją ADP zarówno w mitochondriach jak chloroplastach stało się podstawą dla sformułowania przez Mitchella (2, 3) hipotezy chemiosmotycznej, zgodnie z którą przepływ elektronów wzdłuż łańcucha przenośników oksydoredukcyjnych wytwarza elektrochemiczny gradient protonowy, który stanowi źródło energii do syntezy ATP, katalizowanej przez specyficzny kompleks H^+ -ATPazy związany z błoną. Kompleks ten składa się z części peryferyjnej łatwo dysocjującej odwracalnie z błon i w zależności od pochodzenia, zwanej czynnikiem sprzęgającym F_1 — w przypadku błon mitochondrialnych (4), CF_1 — błon chloroplastowych (5) i BF_1 — błon bakteryjnych (4), oraz z części integralnie związanej z błoną zwanej F_0 .

Jakkolwiek mechanizm akumulacji energii transportu elektronów poprzez przenośniki oksydoredukcyjne i wykorzystanie jej jako siły napędowej do syntezy ATP nie budzi większych zastrzeżeń, struktura i mechanizm funkcjonowania kompleksu H^+ -ATPazy ($CF_1 \cdot CF_0$) nie jest jeszcze w pełni wyjaśnione. Niniejszy artykuł stanowi próbę omówienia wyników dotychczasowych badań nad właściwością i rolą czynnika sprzęgającego fosforylację fotosyntetyczną u roślin wyższych.

II. Izolowanie i właściwości rozpuszczalnego CF_1

Jagendorf i Smith (6) wykazali po raz pierwszy, że chloroplasty szpinaku po przemyciu rozcieńczonym EDTA tracą zdolność do fosforylacji, którą można przywrócić przez ponowne połączenie ekstraktu z przemytymi chloroplastami w obecności jonów Mg^{+2} (7). W wyniku dalszych badań stwierdzono, że izolowany za pomocą roztworu EDTA czynnik sprzęgający fosforylację stanowi ok. 10% białek tylakoidów i w mikroskopie elektronowym daje się obserwować jako kulka o średnicy 90—95 Å (8, 9) połączona z powierzchnią błony za pomocą cylindrycznego trzonu (Ryc. 1). Do ekstrakcji CF_1 najczęściej używa się



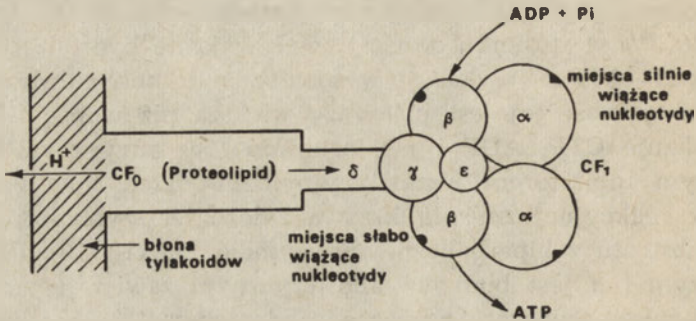
Ryc. 1 Schemat związanego z błoną kompleksu $CF_0 \cdot CF_1$ i jego udział w odwracalnym transporcie protonów, zgodnie z chemiosmotyczną teorią Mitchella (89).

0,75 mM EDTA (5), rozcieńczonego roztworu pirofosforanu (10) względnie chloroformu (11, 12), a dalej można go oczyścić chromatograficznie (13) lub w gradiencie stężeń sacharozy (14). Wyizolowany CF_1 utraciłszy łączność z gradientem protonów nie syntetyzuje ATP. Wykazuje niską aktywność ATPazy, która intensywnie wzrasta pod wpływem temperatury (15) po łagodnym trawieniu trypsyną (16) lub w obecności dwutiotreitolu (17). Najwyższą aktywność przejawia w obecności jonów Ca^{2+} (16, 18), podczas gdy inne kationy dwuwartościowe w nieznacznym tylko stopniu (ok. 3% w stosunku do Ca^{2+}) wpływają na hydrolizę ATP. Rozpuszczalna CF_1 -ATPaza wykazuje wysoką specyficzność substratową. Wobec ATP aktywność jej jest pięć razy większa niż wobec GTP i ITP. Nie hydrolizuje CTP, ADP i pirofosforanu (16), przy czym ADP jest potencjalnym inhibitorem kompetycyjnym. Dodatek tego związku do mieszaniny reakcyjnej zmienia krzywą zależności szybkości reakcji od stężenia substratu z hiperbolicznej na sigmoidalną (18, 19). Przypuszcza się, że enzym ten jest białkiem allosterycznym zawierającym przynajmniej dwa miejsca wiążące nukleotydy adeninowe (18). K_M homogennego preparatu w pH 8,0 i w obecności 8 mM Ca^{2+} wynosi 0,8 mM a V_{max} 0,45 μ moli ATP/mg/min (18). Farron (15) ustalił skład aminokwasowy homogennej CF_1 -ATPazy. Nie stwierdził tryptofanu i N-końcowych aminokwasów (prawdopodobnie na skutek ich zablokowania). Wykazano ponadto występowanie 14 grup SH, w tym 6 z nich tworzy w podjednostkach β , δ , γ wewnątrzpeptydowe wiązanie dwusiarczkowe (14, 20), a 8 wolnych grup SH występuje we wszystkich podjednostkach w stosunkach ilościowych: 4:2:0:0:2 (20). Aktywacja ATPazy przez DTT powoduje wzrost ilości wolnych grup SH z 8 do 10 na podjednostkach γ , podczas gdy aktywacja cieplna związana jest z redukcją na tych podjednostkach wiązań dwusiarczkowych (17, 21). Rozpuszczalny CF_1 traci aktywność w niskiej temperaturze, szczególnie w obecności soli ulega łatwo dysocjacji (5, 22). Lipidy chloroplastowe (23), jak też nukleotydy (ADP, ATP, GTP) zapobiegają inaktywacji i ich wpływ ochronny zależy od obecności jonów Mg^{2+} , lub innych kationów dwuwartościowych (24, 25).

III. Skład i funkcja podjednostek

Homogeny preparat CF_1 jest białkiem oligomerycznym o masie cząsteczkowej 325000 (15, 26). Racker i wsp. (25, 26) metodą elektrofo-rezy w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS uzyskali rozdział CF_1 na pięć frakcji: α , β , γ , δ i ϵ . Na podstawie względnej intensywności barwy poszczególnych frakcji w żelu poliakryloamidowym (14), oraz względnej inkorporacji ^{14}C w podjednostki CF_1 (27, 28) zaproponowano ich stosunki ilościowe jako: 2α , 2β , 1γ , 1δ i 2ϵ , chociaż nie można wykluczyć występowania innych stosunków ilościowych. Na przykład ostatnio Süss

i Schmidt (29, 30) na podstawie rozmieszczenia radioaktywności w podjednostkach CF₁, grochu i wyki, rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym ustalili stosunek ilościowy tych podjednostek jako: 3α, 3β, γ, δ i ε o ciężarach cząsteczkowych: 59000, 56000, 54000, 21000, 16000. Powszechnie przyjęty układ podjednostek CF₁ ilustruje schemat przedstawiony na Ryc. 2. Binder i wsp. (14) wyizolowali i oczyścili poszcze-



Ryc. 2 Schemat podjednostkowej struktury i funkcji rozpuszczalnego CF₁.

gólne polipeptydy na kolumnie z hydroksyloapatytem i Bio-Gelem 300 w obecności SDS. Spośród pięciu uzyskanych polipeptydów tylko ε zachowuje prawdopodobnie swą aktywność natywną (31). Ma ona kształt kulki o przekroju 32 Å (28) i ciężarze cząsteczkowym 13000 (14). W środowisku wodnym bez detergentów lub mocznika, podjednostka ε ulega łatwo agregacji (18). Hamuje ona aktywność CF₁-ATPazy, przeto uważa się ją za potencjalny inhibitor tego enzymu (27); prawdopodobnie bierze ona udział w „utajeniu” ATPazy *in vitro*, jak też w regulacji jej aktywności *in vivo* (22), chociaż nie wiadomo na czym taka regulacja polega.

Aktywację ATPazy *in vitro* tłumaczy się usunięciem ε z centrum katalitycznego za pomocą trypsyny, lub też zmianami konformacyjnymi CF₁ pod wpływem temperatury lub ditiotretolu (26). Przedłużona inkubacja CF₁-ATPazy z trypsyną prowadzi jednak do dysocjacji wszystkich podjednostek z wyjątkiem α i β, przy czym enzym traci zdolność do wiązania się z błonami, przy zachowaniu pełnej aktywności katalitycznej (32). Na tej podstawie przypuszcza się, że małe podjednostki nie uczestniczą bezpośrednio w aktywacji CF₁-ATPazy. Nie można jednak wykluczyć udziału w tym procesie podjednostki γ. Świadczy o tym fakt, że do rekonstrukcji CF₁, poza ATP, α i β, niezbędna jest również podjednostka γ, a maleimidy hamują fosforylację w wyniku specyficznej reakcji z tą podjednostką (33, 34). Przeciwciała w stosunku do poszczególnych podjednostek nie wpływają na aktywność ATPazy, podczas gdy anty α i anty γ razem wzięte hamują zarówno aktywność enzymu jak i fosforylację (35). Przypuszcza się, że γ uczestniczy w przenoszeniu protonów przez kanał CF₀ do centrum katalitycznego H⁺-ATPazy (36).

Ekstrakcja tylakoidów szpinaku chloroformem uwalnia CF_1 o zdolności sprzęgającej fosforylację i pełnym składzie podjednostkowym. Jednakże po oczyszczeniu go chromatograficznie zostaje usunięta podjednostka δ , przy czym CF_1 traci zdolność sprzęgającą, którą można przywrócić po ponownym przyłączeniu tej podjednostki. Dane te sugerują, że δ wiąże rozpuszczalny CF_1 z błoną tylakoidów (11). Posiada ona kształt spłaszczonej elipsoidy o półosiach 25Å i 90Å (28) i masie cząsteczkowej 17500 (14).

Chromatofory *R. rubrum* po usunięciu podjednostki β roztworem 2M LiCl, tracą zdolność do syntezy i hydrolizy ATP (36) a NBD hamuje aktywność ATPazy w wyniku modyfikacji tyrozyny na tej podjednostce (32). Dane te, jak i wyniki badań immunologicznych (32, 35) wskazują, że centrum katalityczne CF_1 -ATPazy znajduje się na podjednostce α lub β i one prawdopodobnie grają główną rolę w fosforylacji fotosyntetycznej.

Tabela 1.

Charakterystyka podjednostek rozpuszczalnego CF_1

Podjednostka	Masa cząsteczkowa*	Stechiometria**	Sugerowana funkcja
α	59 000	2	Regulacja fosforylacji
β	56 000	2	Centrum katalityczne H^+ -ATPazy
γ	37 000	1	Przenoszenie H^+ do centrum katalitycznego
δ	17 500	1	Wiązanie CF_1 z błoną
ϵ	13 000	2	Inhibitor ATPazy, wiązanie CF_1 z błoną

* Wg Bindera i wsp. (14)

** Wg Bairda i Hammesa (41)

Skład i funkcje podjednostek rozpuszczalnego CF_1 podano w Tabeli 1.

IV. Właściwości czynnika sprzęgającego związanego z błoną

Początkowe badania nad czynnikiem sprzęgającym ograniczały się raczej do izolowania i oczyszczania poszczególnych jego składników. Ostatnio jednak wiele uwagi poświęca się izolowaniu, oczyszczaniu i funkcji całego kompleksu H^+ -ATPazy ($CF_1 \cdot CF_0$) w formie aktywnej. Kompleks ten po raz pierwszy został wyizolowany roztworem DOC z mitochondriów zwierzęcych i drożdży (37). Był on następnie wbudowany w pęcherzyki liposomalne, które uzyskiwały zdolność wymiany ^{32}P -ATP, a w obecności fragmentów łańcucha oddechowego lub bakteriorodopsyny — źródło elektrochemicznego gradientu protonów (39) — ka-

talizowały syntezę ATP (38, 39). Od tej pory wyizolowano aktywne kompleksy związanej z błoną ATPazy z różnych błon sprzęgających fosforylację ADP, włącznie z błonami tylakoidów. Zawiera on poza rozpuszczalnym F_1 , białka hydrofobowe (F_0) nadające F_1 -ATPazie wrażliwość na oligomycynę. Carmeli i Racker (40) wyodrębnili podobny kompleks 0,2% cholanem z błon tylakoidów szpinaku, który po usunięciu cholanu tworzył spontanicznie pęcherzyki katalizujące wymianę ^{32}P -ATP. Częściowo oczyszczony przez Wingeta i wsp. (41), zawierał on poza pięcioma polipeptydami rozpuszczalnego CF_1 , osiem podjednostek białkowych nadających H^+ -ATPazie wrażliwość na DCCD. Ostatnio Pick i Racker (42) udoskonalili metodę izolowania i oczyszczania związanego z błoną czynnika $\text{CF}_1 \cdot \text{CF}_0$. Ekstrahując go mieszaniną cholanu i oktyloglukozydu a następnie oczyszczając drogą wysalania siarczanem amonu i wirowania w gradiencie gęstości sacharozy w obecności Tritonu X-100, uzyskali preparat o dużej zdolności wymiany ^{32}P -ATP, złożony z pięciu podjednostek rozpuszczalnego CF_1 (α , β , γ , δ i ϵ) oraz trzech podjednostek CF_0 (I, II, III) o stosunkach stechiometrycznych: 0,3 I, 1 II, 5 III i masach cząsteczkowych: 20000; 17000; 75000 (43, 44).

Powyższe wyniki stały się podstawą do podjęcia badań nad określeniem fizjologicznej funkcji czynnika CF_0 . Już wcześniej było wiadomo, że częściowe usunięcie CF_1 z błon tylakoidów zwiększa przepuszczalność ich na protony (5,45). Proces ten można zahamować przez ponowne związanie go z błonami, względnie poprzez traktowanie DCCD. DCCD jest inhibitorem syntezy ATP z ADP i Pi jak i aktywności ATPazy. Jeśli więc czynnik przenoszący protony występuje w CF_0 powinien zawierać białka reagujące z DCCD. Początkowo Winget i wsp. (41) stwierdzili wiązanie się DCCD z częściowo oczyszczonym kompleksem $\text{CF}_1 \cdot \text{CF}_0$, a ostatnio Nelson i wsp. (46) wyizolowali i oczyścili polipeptyd o masie cząsteczkowej 8000 silnie wiążący DCCD, który po rekonstrukcji tej pory grupa funkcyjna uczestnicząca w przewodzeniu protonów Wykazali ponadto, iż podjednostka I CF_0 i podjednostki α , β , γ i ϵ CF_1 syntetyzowane są w chloroplastach, pozostałe natomiast (III i δ) powstają w cytoplazmie. Przypuszcza się, że jeden ze składników $\text{CF}_1 \cdot \text{CF}_0$ działa jako kanał protonowy. Pozostałe, wraz z podjednostką δ uczestniczą prawdopodobnie w wiązaniu CF_1 z błoną i regulacji przepływu protonów (47, 48), chociaż problem ten jest nadal otwarty (49). Nie znana jest do tej pory grupa funkcyjna uczestnicząca w przewodzeniu protonów przez kanał CF_0 , jakkolwiek badania nad czynnikiem sprzęgającym *E. Coli*, *Neurospora*, bakterii termofilowych i drożdży sugerują, że w wiązaniu DCCD z F_0 i przewodzeniu protonów uczestniczą grupy karboksylowe kwasu asparaginowego, glutaminowego (50) oraz reszty tyrozyny i argininy (51). Wykazano ponadto, że inhibitorami H^+ -ATPazy i przepływu protonów przez kanał CF_0 mogą być poza DCCD również EEDQ i UDQ (52).

V. Zmiany konformacyjne

Ryrie i Jegendorf (53) stwierdzili, że CF_1 wyodrębniony z błon tylakoidów szpinaku poddanych działaniu promieni świetlnych w obecności 3H_2O zawierał aż 100 moli $^3H/mol$ CF_1 . Reakcja ta była hamowana przez rozpręgacze fosforylacji i nukleotydy adeninowe i mogła przebiegać również w ciemności jedynie w obecności sztucznego gradientu pH poprzez błony. Na tej podstawie autorzy sugerują, że energia świetlna wywołuje w czynniku sprzęgającym fosforylację zmiany konformacyjne prowadzące do ujawnienia wymieniających wodorów, a rozpręgacze fosforylacji, na skutek zniesienia gradientu protonowego stabilizują strukturę enzymu, podobnie jak i nukleotydy adeninowe. Sugestie te znalazły również potwierdzenie w badaniach nad zróżnicowaną modyfikacją grup SH lub lizyny. Na przykład N-etyloamid lub o-fenylobismaleimid modyfikują grupy SH na podjednostce γ , ujawniającej się po naświetleniu chloroplastów (58). Podobnie lizyna ulega modyfikacji trójnitrobenzenosulfonianem na podjednostkach α lub β tylko w błonach energizowanych (33, 34). Czynniki modyfikujące powyższe związki hamują zarówno aktywność ATPazy jak i fosforylację fotosyntetyczną (13). Zmianami konformacyjnymi tłumaczy się również niektóre właściwości związanej z błonami ATPazy, której aktywność ujawnia się jedynie na świetle w obecności grup sulfhydrylowych (54, 55). Przypuszcza się, że w wyniku zależnych od energii zmian konformacyjnych zostaje usunięta z CF_1 podjednostka ϵ , potencjalny inhibitor CF_1 -ATPazy, a równocześnie odsłonięte grupy dwusiarczkowe zredukowane są przez związki sulfhydrylowe. Ponadto związana z błonami ATPaza jest zależna od jonów Mg^{2+} , a po uwolnieniu z błon hydrolizuje ATP jedynie w obecności jonów wapnia (45, 56, 57). Aktywowana światłem Mg^{2+} -ATPaza katalizuje zarówno syntezę jak i hydrolizę ATP, przy czym hydroliza związana jest z translokacją protonów do wewnątrz (58) i na skutek zniesienia gradientu protonowego (ryc. 1) spada aktywność ATPazy, co wskazuje, że aktywna forma związanej z błonami ATPazy wymaga odpowiedniej konformacji indukowanej światłem (13). Mocno związane z kompleksem CF_1 -ATPazy nukleotydy adeninowe wymieniają się z ADP i ATP środowiska jedynie na świetle (59). Prawdopodobnie w wyniku zależnych od energii zmian konformacyjnych, miejsca silnie wiążące nukleotydy zostają skierowane do środowiska reakcyjnego (60, 61). Zmiany konformacyjne czynnika sprzęgającego odgrywają również poważną rolę w regulacji przepływu elektronów poprzez kanał CF_0 . W braku bowiem nukleotydów adeninowych w środowisku, w związanym z błoną CF_0 przy wysokich wartościach Δ pH następuje wyraźny wzrost transportu protonów, a ADP lub ATP stabilizując strukturę H^+ -ATPazy zmniejszają przepuszczalność protonów z równoczesnym przyspieszeniem transportu elektronów (62). Podobny efekt wykazuje również DCCD, na skutek blokowania kanału protono-

wego CF₀ (54). Według Boyera (63) i Slatera (64) zmiany strukturalne H⁺-ATPazy stanowią integralną część mechanizmu jej działania.

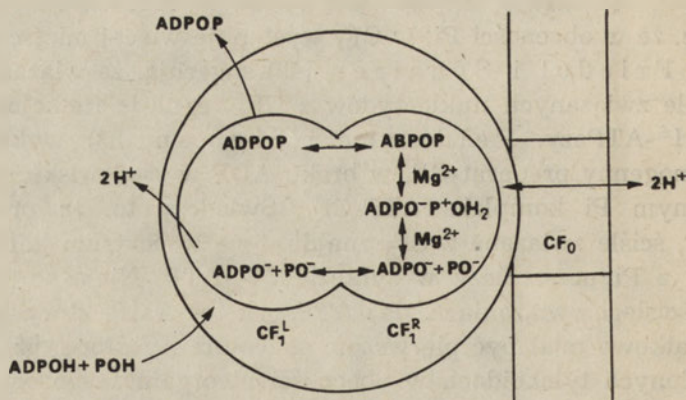
VI. Wiązanie nukleotydów

Wiązanie nukleotydów z czynnikiem sprzęgającym było szeroko badane przy zastosowaniu różnych metod (55, 65—68). Uzyskane wyniki wskazują, że CF₁ podobnie jak czynniki sprzęgające innych struktur subkomórkowych (69) zawiera kilka klas miejsc wiążących. Jedną z tych klas określa się jako silnie wiążącą nukleotydy, ponieważ nie daje się ich usunąć ani na drodze wyczerpującej dializy, ani też metodą sączenia molekularnego. Druga klasa, to miejsca słabo wiążące, z których związane nukleotydy łatwiej dysocjują do środowiska. Ilość miejsc wiążących w obrębie każdej klasy, ich specyficzność jak też rola fizjologiczna nie są jeszcze dostatecznie wyjaśnione. Roy i Maudrianakis (65) oraz Tiefert i wsp. (55) wykazali, że oczyszczony CF₁ z tylakoidów szpinaku po dwugodzinnej inkubacji z (¹⁴C)ATP wiąże od 1,5 do 2 moli ¹⁴C nukleotydu. Dwa miejsca wiążące nukleotydy w rozpuszczalnym CF₁ stwierdzili również Cantley i Hammes (66) oraz Girault i Galmiche (9) przy zastosowaniu innych metod. Wykazali ponadto, że wiązanie nukleotydu w miejscu drugim, uwarunkowane było zmianami konformacyjnymi enzymu wywołanymi wiązaniem nukleotydu w miejscu pierwszym. Przypuszcza się, że jedno z tych miejsc, słabo wiążące nukleotydy adeninowe, stanowi centrum katalityczne CF₁-ATPazy (70). Zawiera ono aktywne grupy karboksylowe, których modyfikacja hamuje zarówno fosforylację fotosyntetyczną jak i sprzężony transport elektronów (71). Magnusson i McCarty (72) sugerują występowanie dwóch miejsc katalitycznych. Jedno dla syntezy a drugie dla hydrolizy ATP i wymiany ATP-Pi (73, 74). Miejsca silnie wiążące nukleotydy stanowią prawdopodobnie nieaktywną część CF₁ (73, 75, 76—78). Wymiana w tych miejscach nukleotydów z ADP przebiega wolno i wymaga energii (70—73, 75, 77). Przypuszcza się, że miejsca te występują na podjednostkach α (70, 79). Biorąc pod uwagę, że ADP wiążąc się z tymi podjednostkami inaktywuje a ATP stymuluje ATPazę, przypuszcza się, że odgrywają one pewną rolę w regulacji aktywności tego enzymu (66, 76, 80). Ostatnie lata dostarczyły szereg danych potwierdzających słuszność tej hipotezy. Wykazano mianowicie, że energia świetlna przyspiesza dysocjację ADP z miejsc ściśle wiążących nukleotydy, a równocześnie aktywuje ATPazę. W ciemności, w braku energii ADP wiążąc się z CF₁ hamuje aktywność enzymu (78, 81). Przypuszcza się, że jedna cząsteczka ATP inaktywuje trzy miejsca aktywne ATPazy (80, 82). Natomiast ortofosforan hamując wiązanie się z ADP z CF₁

w ciemności, stabilizuje aktywowaną światłem ATPazę (80, 82). Przypuszcza się, że w obecności Pi, w CF₁ występuje więcej miejsc wiążących ADP (80). Friedel i Schairer (49) sugerują, że wiązanie i uwalnianie ściśle związanych nukleotydów z CF₁ reguluje funkcjonalną konformację H⁺-ATPazy. Feldmann i Sigman (83) wykazali ostatnio, że homogeny preparat CF₁ w braku ADP w środowisku syntetyzując z egzogennym Pi kompleks ATP-CF₁. Świadczy to, że przynajmniej część ADP, ściśle związana z CF₁ znajduje się w centrum katalitycznym i wspólnie z Pi uczestniczy w syntezie CF₁-ATP. Niejasne jest jednak znaczenie ścisłego wiązania ADP i ATP, jak też AMP, który jak sugerowano początkowo miał być pierwszym akceptorem fosforu (65), ponieważ w naświetlonych tylakoidach w obecności nieorganicznego ortofosforanu i AMP stwierdzono powstawanie silnie związanego ATP. Zgodnie z tą tezą ADP winien „piętnować” się szybciej w początkowej fazie fosforylacji niż ATP, czego niestety nie potwierdzono (84). Wykazano natomiast, że zależna od światła (84) lub sztucznego gradientu pH (85) fosforylacja może przebiegać bez znacznej fosforylacji AMP. Stwierdzono ponadto, że rekonstrukcja CF₁-ATPazy z jej podjednostek wymaga ATP, a usunięcie nukleotydów hamuje fosforylację (60). Dane te sugerują, że mocno związane ADP i ATP biorą udział w „zmontowaniu” funkcjonalnej konformacji kompleksu H⁺-ATPazy, chociaż jak dotychczas kwestia ta jest nadal otwarta.

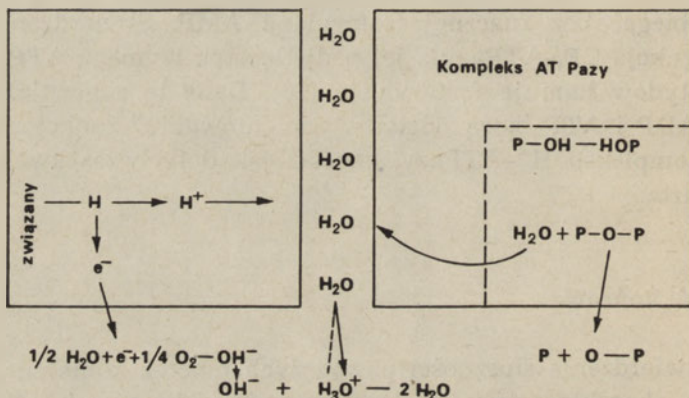
VII. Uwagi końcowe

Dla potwierdzenia słuszności powyższych hipotez konieczna jest jeszcze bliższa charakterystyka zarówno rozpuszczalnego jak i związanego z błoną CF₁ oraz CF₀. Niemniej jednak biorąc pod uwagę zmiany konformacyjne CF₁ oraz dzięki wykryciu miejsc wiążących nukleotydy adeninowe, jak też na podstawie badań wymiany ¹⁸O między wodą a Pi podczas hydrolizy ATP w mitochondriach, Boyer (84, 86) zaproponował „konformacyjny” mechanizm fosforylacji. Zgodnie z tym mechanizmem energia niezbędna jest jedynie do uwolnienia nowo utworzonego ATP w centrum katalitycznym CF₁-ATPazy. Natomiast jego synteza przebiega spontanicznie, a wiązanie ADP i Pi w jednym miejscu przyspiesza uwalnianie ATP w miejscu drugim. Całkiem odmienna jest koncepcja Mitchella (87), według którego (Ryc. 3) podczas fosforylacji ADP w centrum katalitycznym (region CF₁^L) oddysocjują 2H⁺ z ADPOH i POH. Z anionu PO²⁻ zostaje następnie oderwany jon O²⁻ (region CF₁^R), który z protonami wprowadzonymi przez kanał CF₀ tworzy H₂O. Powstałe centrum fosforowe P⁺ (fosforylium) łączy się z ADPO⁻ tworząc ATP. Hipoteza protonowo-bezwodnikowa Williamsa (88) zakłada, że jony H⁺ pośredniczą jedynie w przenoszeniu energii z łańcucha oksydoreduk-



Ryc. 3 Mechanizm fosforylacji wg Mitchella (87).

Łańcuch oksydoredukcyjny



Ryc. 4 Mechanizm fosforylacji wg Williamsa (88).

cyjnego na pobliski kompleks ATPazy, a energia służy tylko do usunięcia wody z centrum katalitycznego enzymu, podczas gdy synteza ATP w środowisku bezwodnym przebiega spontanicznie. Mechanizm fosforylacji wg Williamsa ilustruje schemat przedstawiony na Ryc. 4. Która z tych hipotez okaże się słuszną, wykaże przyszłość. Duży jednak postęp w tej dziedzinie badań rokuje nadzieję, że najbliższe lata pozwolą wyjaśnić jeden z najważniejszych problemów współczesnej bioenergetyki.

Zaakceptowano do druku 29.12.1982

PIŚMIENICTWO

1. Lipmann F., (1965), w *The Origins of Prebiological Systems*, red. Fox S. W., str. 259—265, Acad. Press. N. Y.
2. Mitchell P., (1961), *Nature*, **191**, 114—148.

3. Mitchell P., (1974), *FEBS Lett.*, **43**, 189—194.
4. Penefsky H. S., (1974), *The Enzymes*, **10**, 375—394.
5. McCarty R., Racker E., (1966), *Brookhaven Symp. Biol.*, **19**, 202—214.
6. Jagendorf A. T., Smith M., (1962), *Plant Physiol.*, **37**, 135—141.
7. Avron M., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 699—702.
8. Garber M. P., Steponkis P. L., (1974), *J. Cell. Biol.*, **63**, 24—34.
9. Girault G., Galmiche J. M., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **77**, 501—510.
10. Strotmann H., Hesse H., Edelmann K., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 202—210.
11. Younis H., Winget D. G., Racker E., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1814—1818.
12. Masłowska H., Masłowski P., (1981), *Streszcz. XVIII Zjazdu P. T. Bioch.*, Warszawa, str. 171.
13. Bakker-Grunwald T., (1977), *Encyclopedia of Plant Physiol. New Series*, wyd. Trebst A., Avron M., **5**, str. 369—373, Berlin, Springer-Verlag.
14. Binder A., Jagendorf A. T., Ngo E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3094—3100.
15. Farron F., (1970), *Biochemistry*, **9**, 3823—3828.
16. Vambutas V. K., Racker E., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2660—2667.
17. McCarty R. E., Racker E., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 129—137.
18. Nelson N., Nelson H., Racker E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6506—6510.
19. Datta D. B., Ryrie I. J., Jagendorf A. T., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4404—4411.
20. Ravizzini R. A., Andreo C. S., Vallejos R. H., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **591**, 135—141.
21. Andreo C. S., Ravizzini R. A., Vallejos R. H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **547**, 370—379.
22. Lien S., Berzborn R. J., Racker E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3520—3524.
23. McEvoy F. A., Lynn W. S., (1973), *Arth. Biochem. Biophys.*, **156**, 335—341.
24. Paradies H. H., Zimmerman J., Schmidt U. D., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8972—8979.
25. Racker E., Hauska G. A., Lien S., Berzborn R. J., Nelson N., (1971), *Proc. Int. Congr. Photosynth. 2nd.*, Stresa, 1097—1113.
26. McCarty R. E., (1979), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 79—104.
27. Nelson N., (1981), *Curr. Top. Bioenerg.*, **11**, 1—33.
28. Baird B. A., Hammes G. G., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6953—6962.
29. Süß K. H., (1980), *FEBS Lett.*, **112**, 255—259.
30. Süß K. H., Brecht E., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **592**, 369—374.
31. Horak A., Hill R. D., (1971), *Can. J. Biochem.*, **49**, 207—209.
32. Deters D. W., Racker E., Nelson N., Nelson H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1041—1047.
33. McCarty R. E., Pittman P. R., Tsuchiya Y., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3048—3051.
34. McCarty R. E., Fagan J., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1503—1507.
35. Nelson N., Deters D. W., Nelson H., Racker E., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2049—2055.
36. Philosoph S., Binder A., Gromet-Elhanan Z., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 8747—8752.
37. Kagawa Y., Racker E., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5477—5487.

38. Serrano R., Konner N., Racker E., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2453—2461.
39. Racker E., Stoeckenius W., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 662—663.
40. Carmeli C., Racker E., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8281—8287.
41. Winget G. D., Kanner N., Racker E., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **460**, 490—502.
42. Pick U., Racker E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2793—2799.
43. Süß K. H., Schmidt O., (1982), *FEBS Lett.*, **144**, 213—218.
44. Paradies H. H., Mertens G., Schmidt R., Schneider E., Alten-dorf K., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**, 595—606.
45. McCarty R. E., Racker E., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 3435—3439.
46. Nelson N., Nelson H., Schutz, (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1361—1364.
47. Nelson N., Eytan E., Natsami B. E., Sigirst H., Sigirst-Nel-son K., Gilter C., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2375—2378.
48. Ho Y. K., Lin C. J., Saunders D. R., Wang J. H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **547**, 149—160.
49. Friedel A., Schairer H. U., (1981), *FEBS Lett.*, **128**, 261—264.
50. Sebald W., Wachter E., (1978), *Colloq. Ges. Biol. Chem.*, **29**, 228—236.
51. Ikeba K., Kagawa Y., (1979), *FEBS Lett.*, **98**, 276—280.
52. Ho Y. K., Wang J. H., (1980), *Biochemistry*, **19**, 2650—2655.
53. Ryrie Y. J., Jagendorf A. T., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4453—4459.
54. Marchant R. H., Packer L., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **75**, 458—466.
55. Tiefert M. A., Roy H., Maudrianakis E. N., (1977), *Biochemistry*, **16**, 2396—2404.
56. Petrack B., Lipmann F., (1961) w *Light and Life*, wyd. W. D. McEvoy, H. B. Glass, str. 621—624, Baltimore.
57. Vallejos R. H., Andreo C. S., (1976), *FEBS Lett.*, **61**, 95—99.
58. Carmeli C., (1970), *FEBS Lett.*, **7**, 297—300.
59. Harris D. A., Slater E. C., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 335—348.
60. Magnusson R. P., McCarty R. E., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7417—7422.
61. Strotmann H., Bickel-Sandkötter S., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **400**, 126—135.
62. Portis A. R., Magnusson R. P., McCarty R. E., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 877—884.
63. Boyer P. D., Stockes B. O., Walcott R., Degani G., (1975), *Fed. Proc.*, **34**, 1711—1717.
64. Slater E. C., (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 1015—1026.
65. Roy H., Maudrianakis E. N., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2720—2724.
66. Cantley L. C., Hammes G. G., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2976—2981.
67. Vander Meulen D. L., Govindjee L., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **78**, 585—598.
68. Girault G., Galmiche J. M., Vermeglia A., (1974), *Proc. Int. Congr. Photosynth.*, 3 rd. Rehovot str. 839—847.
69. Baird B. A., Gordon G., Hammes G., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 31—53.
70. Bickel-Sandkötter S., Strotmann H., (1976), *FEBS Lett.*, **65**, 102—106.

71. Arana J. L., Vallejos R. H., (1980), *FEBS Lett.*, **113**, 319—322.
72. Magnusson R. P., McCarty R. E., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 1283—1289.
73. Bar-Zvi D., Shavit N., (1980), *FEBS Lett.*, **119**, 68—72.
74. Franek U., Strotmann H., (1981), *FEBS Lett.*, **126**, 5—8.
75. Shavit N., Lien S., San Pietro A., (1977), *FEBS Lett.*, **73**, 55—58.
76. Strotmann H., Bickel-Sandkötter S., Shoshan V., (1979), *FEBS Lett.*, **101**, 316—320.
77. Shavit N., (1980), *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 111—138.
78. Bickel-Sandkötter S., Strotmann H., (1981), *FEBS Lett.*, **125**, 188—192.
79. Strotmann H., Bickel S., Huchzermeyer B., (1976), *FEBS Lett.*, **61**, 194—198.
80. Dunham K. R., Selman B. R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10044—10049.
81. Shoshan V., Strotmann H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 996—999.
82. Dunham K. R., Selman B. R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 212—218.
83. Feldmann R. I., Sigmann D. S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 1676—1683.
84. Cross R. L., Boyer P. D., (1975), *Biochemistry*, **14**, 392—398.
85. Smith D. J., Stokes B. O., Boyer P. D., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4165—4171.
86. Boyer P. D., (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 957—966.
87. Mitchell P., (1977), *FEBS Lett.*, **78**, 1—19.
88. Williams R. J. P., (1975), *FEBS Lett.*, **53**, 123—125.
89. Mitchell P., (1961), *Nature*, **191**, 144—148.

KOMUNIKAT I

II Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego odbędzie się w Łodzi, w dniach 19—21 września 1984 r.

TEMAT ZJAZDU: „ZAGROŻENIE CHEMICZNE A OCHRONA ZDROWIA CZŁOWIEKA”

W ramach tego tematu organizatorzy proponują następujące sesje:

I. TOKSYCZNOŚĆ I MECHANIZMY DZIAŁANIA SUBSTANCJI CHEMICZNYCH (toksyczność ostra i przewlekła; odległe efekty toksyczne: kancerogeneza, mutageneza, teratogeneza chemiczna; toksykokinetyka; biotransformacja ksenobiotyków; narządowe, komórkowe, subkomórkowe i biochemiczne efekty narażenia; niezbędny zakres badań toksyczności w zależności od stosowania substancji).

II. METODYKA OCENY NARAŻENIA NA CZYNNIKI TOKSYCZNE (analityka powietrza, żywności, wody, gleby i materiału biologicznego; kompleksowa ocena narażenia — monitoring biologiczny).

III. TOKSYKOLOGIA ZAWODOWA I ŚRODOWISKOWA (ocena narażenia zawodowego i środowiskowego na substancje toksyczne, kliniczna i epidemiologiczna ocena zdrowotnych skutków narażenia, profilaktyka i jej podstawy prawno-organizacyjne w ochronie zdrowia człowieka).

IV. TOKSYKOLOGIA KLINICZNA I SĄDOWA (diagnostyka i leczenie zatruc ostrych; toksykologiczna analityka sądowo-lekarska).

Przewidziane są sesje referatowe i plakatowe, a także wykłady plenarne.

Warunkiem udziału w Zjeździe jest zgłoszenie uczestnictwa (do 30 listopada 1983 r.) i wniesienie opłaty zjazdowej w wysokości 1.000 zł (do 31 stycznia 1984 r.) na konto Komitetu Organizacyjnego Zjazdu: NBP I Oddz. Łódź nr 47513—63946—132.

Osobom, które dokonują zgłoszenia zostanie przesłany Komunikat II informujący o trybie nadsyłania streszczeń, możliwościach rezerwowania noclegów, wyżywienia oraz udziału w imprezach towarzyszących.

Wszelkich informacji dotyczących Zjazdu udziela Komitet Organizacyjny: Oddział Łódzki Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, Zakład Chemii Toksykologicznej Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Narutowicza 120a; 90-145 Łódź, tel. 822-60 w. 1 lub 853-52.

Serdecznie zapraszamy do Łodzi.

PRZEWODNICZĄCY KOMITETU ORGANIZACYJNEGO

prof. dr hab. Jadwiga Chmielnicka

ELŻBIETA KARZMAREWICZ *)

Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa

Phosphoenolpyruvate Carboxykinase

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Rozmieszczenie subkomórkowe karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej
- III. Synteza enzymu w rozwoju ontogenetycznym pod wpływem hormonów
- IV. Czynniki bezpośrednio modulujące aktywność karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej
 - IV-1. Wpływ anionów i kationów dwuwartościowych na aktywność enzymu
 - IV-2. Ferroaktywator
 - IV-3. Wpływ niektórych pochodnych pirydyny na aktywność karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej
- V. Mechanizm reakcji katalizowanej przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową
- VI. Centrum aktywne karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej
- VII. Mechanizmy regulacji aktywności karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej *in vivo*
- VIII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Subcellular distribution of phosphoenolpyruvate carboxykinase
- III. Hormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity
- IV. Factors altering directly phosphoenolpyruvate carboxykinase activity
 - IV-1. Effect of anions and divalent metal ions on the enzyme
 - IV-2. Ferroactivator
 - IV-3. Effects of some pyridine derivatives on phosphoenolpyruvate carboxykinase activity
- V. The mechanism of reaction catalysed by phosphoenolpyruvate carboxykinase
- VI. Active center of the phosphoenolpyruvate carboxykinase
- VII. Mechanism of regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity *in vivo*
- VIII. Concluding remarks

*) Mgr, Zakład Biochemii i Medycyny Doświadczalnej, Centrum Zdrowia Dziecka, Al. Dzieci Polskich 20, 04-736 Warszawa — Międzylesie.

Wykaz stosowanych skrótów: PEP — fosfoenolpirogrońian; OAA — szczawiooctan; ITP — inozynotrójfosforan; GDP — guanozynodwufosforan; NADH i NAD⁺ — dwunukleotydy nikotynamidoadeninowe w formie zredukowanej i utlenionej; FMN — mononukleotyd flawinowy; Mn-GTP²⁻ — jednozasadowa sól manganowa guanozynotrójfosforanu; m-RNA — informacyjny kwas rybonukleinowy.

I. Wstęp

Karboksykinaza fosfoenolpirogrońianowa (karboksykinaza GTP: szczawiooctan, transfosforylująca, E.C.4.1.1.32) po raz pierwszy została opisana i scharakteryzowana przez Uttera i Kurahashi (1, 2) w 1953 roku. Enzym ten katalizuje reakcję odwracalnej fosforylacji (z jednoczesną dekarboksylacją) kwasu szczawiooctowego z wytworzeniem kwasu fosfoenolpirogrońianowego:



Reakcja ta jest jednym z etapów szlaku glukoneogenezy. Jej stała równowagi wynosi 2.69 (30°C) (3), a więc może to być reakcja „ograniczająca”, to znaczy warunkująca szybkość glukoneogenezy (4—8). Głodzenie, cukrzyca eksperymentalna oraz zmiany hormonalne wpływają na szybkość syntezy i degradacji karboksykinazy fosfoenolpirogrońianowej oraz jej białkowego regulatora — ferroaktywatora (9—21). Aktywność karboksykinazy fosfoenolpirogrońianowej może ulegać także bardzo szybkim zmianom, następującym na skutek bezpośredniego oddziaływania cząsteczki enzymu z białkowymi modulatorami oraz kationami Fe²⁺ i Mn²⁺ (22—26, 35, 40). Przemianę katalizowaną przez karboksykinazę fosfoenolpirogrońianową Utter określił jako „kluczową” reakcję glukoneogenezy.

Wiele prac ostatnich lat poświęconych było badaniu regulacyjnej roli karboksykinazy fosfoenolpirogrońianowej w glukoneogenezie. Poszukiwano efektora lub kofaktora zmieniającego aktywność enzymu (15, 16, 27, 28). Wykazano po raz pierwszy występowanie enzymu w dwóch formach: aktywnej i nieaktywnej, znajdujących się w równowadze dynamicznej (30, 31, 33, 35, 40—42). Wydaje się także, że wyizolowane ostatnio białko nazwane ferroaktywatorem, a umożliwiające aktywację enzymu jonami żelazowymi Fe²⁺, odgrywa istotną rolę w regulacji syntezy fosfoenolpirogrońianu *in vivo* (15, 16). Dyskutowana jest również rola peptydu o masie 29000 oraz jonów manganowych jako modulatorów aktywności enzymu (41—43). Przy użyciu oczyszczonych, jednorodnych preparatów enzymu zbadano rolę kationów (szczególnie manganowego) w mechanizmie reakcji katalizowanej przez karboksykinazę fosfoenolpirogrońianową (29—45).

W niniejszym artykule podjęto próbę podsumowania i dyskusji poglądów dotyczących własności karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej jako „kluczowego” enzymu glukoneogenezy. Należy zaznaczyć, że większość zgromadzonych dotychczas obserwacji przeprowadzono używając jako modelu doświadczalnego, enzymu izolowanego z frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura. Choć nie jest to model doskonały, uogólnianie wniosków z otrzymanych wyników może być pomocne w badaniach szczegółowych, uwzględniających różnice w subkomórkowym rozmieszczeniu enzymu w tkankach zwierząt różnych gatunków.

II. Rozmieszczenie subkomórkowe karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej

Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa w wątrobie i nerce występuje zarówno we frakcji cytoplazmatycznej jak i mitochondrialnej. Zaobserwowano gatunkowe różnice w ilościowym rozmieszczeniu enzymu w tych dwóch przedziałach komórkowych. W wątrobie gołębi i kurcząt karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa występuje głównie w mitochondriach (19, 46—48), natomiast w wątrobie szczura, myszy i chomika zlokalizowana jest we frakcji cytoplazmatycznej (14, 19, 48—50). W wątrobie człowieka (55—58), małpy (59), świnki morskiej, królika, owcy (19, 48, 51—54, 75) enzym występuje w obu przedziałach komórkowych.

Wiele badań poświęcono porównaniu właściwości enzymów wyizolowanych z frakcji mitochondrialnej i cytoplazmatycznej komórek wątroby zwierząt o niejednorodnym rozmieszczeniu enzymu. Zakładano, że enzymy z frakcji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej powinny posiadać różne właściwości, gdyż podlegają różnym mechanizmom kontrolnym. Zdolności adaptacyjne wykazuje bowiem jedynie enzym z frakcji cytoplazmatycznej. Jego aktywność zmienia się pod wpływem diety i zmian hormonalnych zgodnie z aktywnością całego szlaku glukoneogenezy (7, 9, 13, 60—64). Głodzenie nie ma wpływu na aktywność enzymu z frakcji mitochondrialnej wątroby gołębia i mitochondriów wątroby świnki morskiej (13, 60). Synteza fosfoenolopirogronianu w mitochondriach wydaje się być kontrolowana przez poziom NADH i NAD^+ (65—67, 74, 75) oraz dostępność szczawiooctanu (32, 54, 56, 59, 68). Ballard i Hanson wykazali ponadto, że karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa z frakcji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej wątroby szczura posiadają zupełnie różną charakterystykę antygenową, a więc są immunologicznie różnymi białkami (57).

Własności fizykochemiczne enzymów pochodzących z frakcji mitochondrialnej i cytoplazmatycznej są podobne. Wszystkie badane preparaty enzymu miały ciężar cząsteczkowy około 70000 (9, 29, 51, 57, 69—

71), a ich punkt izoelektryczny wyznaczony metodą elektroogniskowania odpowiada wartości pH około 5 (57). Porównano katalityczne własności karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej z frakcji mitochondrialnej i cytoplazmatycznej wątroby mały (59), świnki morskiej (39, 52), owcy (72), świni (39), wołu (39) i kurczęcia (39). Pod wieloma względami oba enzymy we wszystkich przypadkach okazały się bardzo podobne. Enzymy z frakcji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej wątroby owcy wykazywały różnice w wartości stałej Michaelisa dla szczawiooctanu i stałej inhibitorowej dla jabłczanu. Stymulowanie aktywności enzymu przez jony metali oraz hamowanie przez AMP było różne dla karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej z frakcji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej wątroby świnki morskiej. Porównując enzymy z frakcji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej wątroby mały stwierdzono, że różnią się one optimum pH dla reakcji dekarboksylacji, aktywnością w obecności jonów metali i inhibitorów oraz mają różne stałe Michaelisa dla IDP, GDP i ITP. Sposób oddziaływania kationów (manganawego i żelazawego) oraz inhibitorów (kwasu chinolinowego oraz kwasu 3-merkaptopikolinowego) na karboksykinazę fosfoenolopirogronianową z frakcji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej pozwala wnioskować, że na cząsteczkach obu enzymów mogą występować specyficzne miejsca wiążące jony metali dwuwartościowych (39, 40). Wartości optimum pH reakcji dekarboksylacji szczawiooctanu i karboksylacji fosfoenolopirogronianu katalizowanych przez enzymy z frakcji cytoplazmatycznej i mitochondrialnej wątroby różnych zwierząt przedstawia Tabela 1.

Tabela 1.

Optima pH reakcji katalizowanych przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową

Źródło enzymu	Optimum pH		Piśmiennictwo
	reakcja karboksylacji	reakcja dekarboksylacji	
Wątroba mały frakcja cytoplazmatyczna	6,8	7,0—8,0	59
mitochondria	7,0	7,0—7,2	
Wątroba świnki morskiej frakcja cytoplazmatyczna	7,4	8,2	52
mitochondria	7,4	7,8—8,4	
Wątroba owcy mitochondria	6,5—7,5		51
Wątroba wieprza mitochondria	6,6	6,6—8,0	69
Wątroba kurczaka mitochondria	6,2	7,0—8,0	65

Optimum pH reakcji dekarboksylacji jest o około jedną jednostkę pH wyższe od optimum pH reakcji karboksylacji. Różnice w optimum pH enzymów z frakcji mitochondrialnej i cytoplazmatycznej są nieznaczne.

Na podstawie dotychczasowych badań postuluje się, że karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa z frakcji cytoplazmatycznej oraz karboksykinaza z frakcji mitochondrialnej, to dwa odrębne enzymy o podobnych właściwościach kinetycznych i fizykochemicznych. Wydają się to potwierdzać prace nad oczyszczaniem karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej z wątroby kurczęcia (73). Wykazano, że w mitochondriach enzym ten występuje w dwóch formach nazwanych Mt-1 i Mt-2, natomiast we frakcji cytoplazmatycznej w trzech formach nazwanych Sol-1, Sol-2 i Sol-3. Izoenzym Mt-1, Mt-2 oraz Sol-1 i Sol-2 mają taki sam ciężar cząsteczkowy (72000 wyznaczoną metodą elektroforezy z SDS, 42000 metodą sączenia molekularnego), są identyczne immunologicznie, a ich mapy peptydowe są bardzo podobne. Formy karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej Sol-1 i Sol-2 są prekursorami form Mt-1 i Mt-2, transportowanymi po syntezie na cytorybosomach do mitochondriów, zgodnie z regułami mechanizmów post-translacyjnych (73). Izoenzym Sol-3 jest specyficzną dla frakcji cytoplazmatycznej formą karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej i różni się immunochemicznie od form Mt-1, Mt-2, Sol-1 i Sol-2. Forma Sol-3 z frakcji cytoplazmatycznej wykazuje zdolności adaptacyjne. Jej aktywność rośnie pod wpływem hydrokortizonu i izoproterenolu. Masa cząsteczkowa tego izoenzymu wyznaczona metodą sączenia molekularnego wynosi 30000.

Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa z frakcji cytoplazmatycznej wykazuje zdolności adaptacyjne, a jej aktywność zmienia się zgodnie z aktywnością całego szlaku glukoneogenezy w ontogenezie (49). Dlatego właśnie enzym z frakcji cytoplazmatycznej stał się głównym obiektem badań mechanizmów regulacyjnych karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej.

III. Synteza enzymu w rozwoju ontogenetycznym pod wpływem hormonów

Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa nie występuje we frakcji cytoplazmatycznej wątroby płodów szczurzych (76—78). Enzym syntetyzowany jest w momencie urodzenia zwierzęcia. Synteza enzymu indukowana jest na poziomie transkrypcji m-RNA (78—79). Czynnikiem wpływającym na transkrypcję jest c-AMP (78—79). W momencie urodzenia wzrasta poziom glukagonu oraz c-AMP w wątrobie. Synteza karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej u płodu hamowana jest przez wysoki poziom insuliny. c-AMP i glukagon znoszą hamowanie przez

insulinę i umożliwiając rozpoczęcie syntezy enzymu *de novo* na poziomie transkrypcji (78, 82—86).

Synteze enzymu i odpowiedniego m-RNA można zaindukować u płodu szczura przed urodzeniem podając domacicznie glukagon lub butyrylo-c-AMP (78, 87, 89). Glukokortykoidy nie wywołują powstawania enzymu w wątrobie płodów szczurzych (76).

W wątrobie szczurów dorosłych ilość enzymu frakcji cytoplazmatycznej rośnie 2-3-krotnie pod wpływem głodzenia i 4-7-krotnie w cukrzycy doświadczalnej (17, 21, 90—92). Podawanie glukozy lub insuliny szczurom z cukrzycą powoduje gwałtowny spadek ilości karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej (93—96). Glukagon i c-AMP wpływają na wzrost syntezy enzymu frakcji cytoplazmatycznej wątroby (78, 80, 96). Glukokortykoidy zwiększają aktywność enzymu w wątrobie i nerce, natomiast obniżają aktywność karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej w białej tkance tłuszczowej (95, 97—104).

c-AMP działa szybciej niż glukokortykoidy. Szybkie zahamowanie syntezy enzymu wątroby po podaniu pożywienia zwierzętom głodczonym (96—105) lub podanie insuliny zwierzętom z cukrzycą związane jest ze zmianą poziomu c-AMP w wątrobie (106, 107). Nie jest jasne, czy szybkie działanie c-AMP jest związane z jego hamującym wpływem na degradację m-RNA karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej (108—110). Wykazano, że pod wpływem c-AMP szybkość degradacji m-RNA karboksykinazy może dziesięciokrotnie zmniejszyć się w ciągu jednej godziny (108).

Badano również zmiany aktywności karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej w rytmie okołodobowym (111, 112). We frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura aktywność enzymu zmienia się w czasie doby tak samo jak aktywność całego szlaku glukoneogenezy i ściśle związana jest z rytmem aktywności życiowej zwierzęcia. Maksimum aktywności karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej obserwujemy około godziny 14, a minimum około godziny 8.

IV. Czynniki bezpośrednio modulujące aktywność karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej

IV-1. Wpływ anionów i kationów dwuwartościowych na aktywność enzymu

Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa do maksymalnej aktywności wymaga obecności dwóch kationów: Mg^{2+} w stężeniu wystarczającym do wytworzenia stechiometrycznego kompleksu z nukleotydem (ITP lub GTP) (22, 45, 52, 65) oraz jednego z dwuwartościowych jonów metali w stężeniu mikromolowym, takich jak Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , lub Cd^{2+} (23, 45). Fe^{2+} jest jonem, który w największym stopniu stymuluje reakcję two-

rzenia fosfoenolopirogronianu, jego maksymalne działanie obserwujemy już w stężeniu 1 μM (23, 113).

Oczyszczenie karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej powoduje zanik stymulacji aktywności enzymu w kierunku syntezy fosfoenolopirogronianu przez Fe^{2+} , Co^{2+} i Cd^{2+} , stymulacja przez Mn^{2+} zostaje zachowana (15, 113, 114). Niskie stężenia SO_4^{2-} w mieszaninie inkubacyjnej przywracają stymulujący wpływ Fe^{2+} i Co^{2+} na aktywność enzymu i wzmagają wpływ Mn^{2+} (22, 113). W tych samych warunkach obecność PO_4^{3-} wraz z Fe^{2+} silnie hamuje aktywność enzymu. Aktywujący wpływ SO_4^{2-} całkowicie znosi hamowanie enzymu przez PO_4^{3-} w obecności Fe^{2+} (113).

Tak więc, aktywatorem enzymu jest anion siarczanowy a inhibitorem anion fosforanowy, przy czym ich oddziaływanie na enzym możliwe jest tylko w obecności Fe^{2+} . Aktywujący wpływ mieszaniny jonów siarczanowych i żelazawych trwa około 12 minut i znosi hamowanie mieszaniną jonów fosforanowych i żelazawych.

Badania kinetyczne (36, 41, 42, 44) analizujące reakcję karboksylacji katalizowaną przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową z wątroby szczura i tasiemca *Hymenolepis diminuta* sugerują, że jony manganawe odgrywają ważną rolę w przyłączaniu fosfoenolopirogronianu do enzymu. Sygnały elektronowego rezonansu paramagnetycznego manganu karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej z wątroby świni (115), nerki owcy (116) i wątroby kurczęcia (35, 117) wskazują także, że fosfoenolopirogronian nie jest związany bezpośrednio z cząsteczką enzymu, lecz poprzez mangan z kompleksem enzym-mangan. Istotne wydaje się także, że zdolność wiązania manganu przez enzym jest zależna od stopnia utlenienia grup SH białka enzymatycznego (35, 41).

Ostatnio wyizolowano białko o masie 29000, które w pewnych warunkach oczyszczania enzymu migruje z karboksykinazą fosfoenolopirogronianową w postaci kompleksu (41, 42). *In vitro* białko to stabilizuje stan utlenienia cząsteczki enzymu warunkujący możliwość aktywacji przez jony manganawe. Głównym efektem aktywacji przez jony manganawe jest wzrost szybkości maksymalnej (V_{max}) wytwarzania produktów reakcji (41, 42).

Ostatnie badania Reynoldsa (33) rzuciły również nowe światło na rolę jonów żelazawych w regulacji aktywności karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej. Wykazał on, że preinkubacja oczyszczonego enzymu z jonami żelazawymi powoduje jego nieodwracalną, postępującą w czasie inaktywację. Czynniki cytoplazmatyczny zwany ferroaktywatorem chroni oczyszczony enzym przed inaktywacją jonami Fe^{2+} . Doświadczenia Reynoldsa nie zostały dotąd potwierdzone. Poniżej przedstawiono dane pochodzące z pracowni Lardy'ego, gdzie wykryto i scharakteryzowano ferroaktywator.

IV-2. Ferroaktywator

Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa oczyszczona z frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura nie jest stymulowana przez jony Fe^{2+} (113). Po podaniu frakcji cytoplazmatycznej do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej $30 \mu\text{M Fe}^{2+}$ aktywność enzymu wzrasta trzykrotnie (15). Za aktywację tę wydaje się być odpowiedzialne białko frakcji cytoplazmatycznej nazwane ferroaktywatorem karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej. Białko to łatwo oddziela się od enzymu już w czasie pierwszego etapu jego oczyszczania na kolumnie Sephadex G-100 (15). Ferroaktywator otrzymano z frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura w postaci jednorodnego białka (16). Jego masa cząsteczkowa wyznaczona metodą sączenia molekularnego wynosiła 126000, a metodą sedymentacji 82000 (16). Ferroaktywator nie wpływa na aktywność enzymu inkubowanego z Fe^{3+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} lub Ca^{2+} . Obecność ferroaktywatora znosi hamujący wpływ jonów $\text{PO}_4^{3-} + \text{Fe}^{2+}$ na aktywność enzymu. Jedna jednostka ferroaktywatora, to taka jego ilość, która podnosi aktywność karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej o 50% w obecności $30 \mu\text{M Fe}^{2+}$ (15).

W wątrobie człowieka, wołu, wieprza, szczura, świnki morskiej, królika, gołębia i kurczaka ponad 85% całkowitej ilości ferroaktywatora (mierzone zarówno jego aktywność jak i ilość przy pomocy metody radioimmunologicznej) stwierdzono we frakcji pozamitochondrialnej (15, 17). U szczura ferroaktywator występuje w wątrobie, korze nerki, erytrocytach oraz w niewielkiej ilości w trzustce i sercu (17).

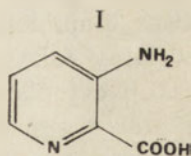
Ilość ferroaktywatora rośnie we frakcji cytoplazmatycznej wątroby i nerki szczura oraz we frakcji cytoplazmatycznej wątroby świnki morskiej pod wpływem głodzenia, podawania hydrokortizonu oraz w cukrzycy doświadczalnej tak samo jak aktywność karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej (17).

W różnych stanach metabolicznych zmiany ilości ferroaktywatora w wątrobie szczura są mniejsze niż zmiany aktywności enzymu. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że stwierdzone zmiany ilości ferroaktywatora są wystarczające do utrzymania pełnej aktywacji karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej *in vivo* (17).

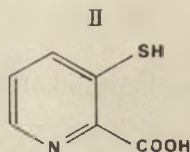
IV-3. Wpływ niektórych pochodnych pirydyny na aktywność karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej

Trzy pochodne pirydyny, specyficznie oddziałują na aktywność karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej zarówno *in vivo* jak i *in vitro* (17, 18, 32, 118—126), są to:

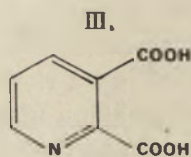
- kwas 3-aminopikolinowy (I)



- kwas 3-merkaptopikolinowy (II)



- kwas chinolinowy (III)



Wiele innych badanych pochodnych pirydyny nie miało żadnego wpływu na aktywność enzymu (23, 127).

Kwas 3-aminopikolinowy podany szczurom wywołuje hyperglikemię (121), natomiast kwas chinolinowy i kwas 3-merkaptopikolinowy wywołują u tych zwierząt hypoglikemię (122, 123).

Badania *in vitro* wykazały, że kwas 3-aminopikolinowy umożliwia aktywację oczyszczonego enzymu z frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura przez jony żelazawe (około trzykrotnie) i stymuluje aktywację przez jony manganawe (18). Związek ten znosi także hamowanie enzymu przez mieszaninę $\text{PO}_4^{3-} + \text{Fe}^{2+}$.

McDaniel (123) zbadał *in vitro* wpływ chinolinianu na częściowo oczyszczony enzym z wątroby szczura. Chinolinian jest inhibitorem niewspółzawodniczącym względem szczawiooctanu ($K_i = 500 \mu\text{M}$), ale jego kompleks z jonem żelazawym wykazuje współzawodnictwo względem szczawiooctanu ($K_i = 100 \mu\text{M}$). Hamuje on karboksykinazę fosfoenolopirogronianową aktywowaną przez Fe^{2+} zarówno w obecności ferroaktywatora (18), jak i kwasu 3-aminopikolinowego (17). Chinolinian nie hamował enzymu aktywowanego przez Mn^{2+} , a nawet nieznacznie stymulował tę aktywację (17).

Bardzo silnym inhibitorem karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej okazał się kwas 3-merkaptopikolinowy (31, 128—129), gdyż K_i dla tego związku wynosi $3 \mu\text{M}$. Jest to inhibitor niewspółzawodniczący za-

równowzględem szczawiooctanu jak i MnGTP^{2-} (32, 122, 130). Hamowanie przez kwas 3-merkaptopikolinowy występuje niezależnie od uprzedniej aktywacji przez kwas 3-aminopikolinowy. W obecności Fe^{2+} oczyszczony enzym mitochondrialny tak samo ulega hamowaniu przez ten inhibitor jak enzym z frakcji cytoplazmatycznej (przebadano 4 gatunki zwierząt) (39).

Nie jest jasne, w jaki sposób omówione wyżej trzy pochodne pirydyny oddziałują na karboksykinazę fosfoenolopirogronianową. Wpływ tych związków na enzym przez usuwanie związanego z nim Mn^{2+} wykluczono badając sygnały elektronowego rezonansu paramagnetycznego manganu (18). Nie jest możliwe również, aby oddziaływały one przez usuwanie Fe^{2+} , gdyż w przypadku 3-merkaptopikolinianu jon ten nawet wzmacnia działanie inhibitora.

Wykazano, że kompleksy pochodnych pirydyny z jonem żelazawym mają wpływ na enzym (27, 39). Skład kompleksu jest charakterystyczny dla kompleksów pochodnych kwasu pikolinowego, to znaczy stosunek ilości metalu do ilości związku kompleksującego wynosi 1:2 (37, 39). Wydaje się, że hamujący wpływ kompleksu jon żelazawy : kwas 3-merkaptopikolinowy następuje głównie na skutek obniżenia szybkości uwalniania produktu, to znaczy fosfoenolopirogronianu (36, 32). Zaobserwowano także duże różnice w wartościach stałej Michaelisa K_m dla fosfoenolopirogronianu oraz stałych inhibitorowych w obecności różnych jonów metali (36). Reynolds sugeruje, że dwuwartościowe jony metali biorą udział w wiązaniu fosfoenolopirogronianu oraz inhibitorów (36).

Badania przy pomocy elektronowego rezonansu paramagnetycznego wykazały, że Mn^{2+} może tworzyć pomost pomiędzy cząsteczką enzymu i cząsteczką produktu, fosfoenolopirogronianu (35, 115, 116, 131, 132). Dane kinetyczne wydają się przemawiać za hipotezą, że zastąpienie metalu kompleksem metal-inhibitor w wiązaniu fosfoenolopirogronianu przez enzym może dawać efekt hamowania aktywności enzymu (36, 32).

V. Mechanizm reakcji katalizowanej przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową

Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa katalizuje reakcję z dwoma substratami (szczawiooctan i kompleks MnGTP^{2-}), powstają natomiast trzy produkty: fosfoenolopirogronian, dwutlenek węgla i GTP. Badania mechanizmu tej reakcji, a więc porządku przyłączania przez enzym substratów i uwalniania produktów były przedmiotem szeregu doniesień (31, 131—133). W przypadku enzymów otrzymanych z mitochondriów wątroby proponowano mechanizmy:

— typu ordered bi-ter (133) według nomenklatury Cleland (134—

136), to znaczy „uporządkowany” (wersja polska wg Śliwowskiego 137, 138), gdzie kolejność przyłączania substratów i uwalniania produktów jest określona, z dwoma substratami i trzema produktami (symbol „bi-ter” oznacza dwa substraty i trzy produkty),

— typu ordered-random tzn. „uporządkowano-nieuporządkowany” (131), gdzie kolejność przyłączania substratów i uwalniania produktów jest częściowo określona,

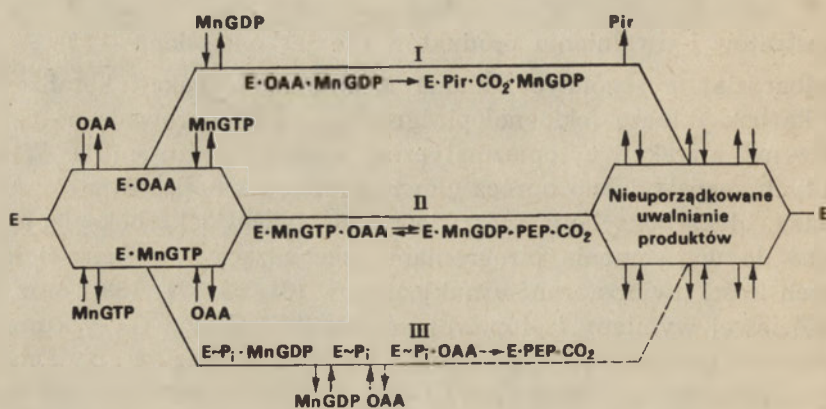
— typu random, tzn. „nieuporządkowany”, gdzie kolejność przyłączania substratów i uwalniania produktów nie jest określona (123).

Najbardziej szczegółowe badania mechanizmu reakcji katalizowanej przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową przeprowadzono ostatnio dla enzymu z frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura (31). W badaniach tych rozpatrywano oprócz głównej reakcji katalizowanej przez enzym, tzn. dekarboksylacji szczawiooctanu, także dekarboksylację prowadzącą do wytworzenia pirogronianu (zachodzącą w obecności katalitycznych ilości dwufosforanów nukleotydów (31, 69—71, 139)) oraz reakcję częściowej wymiany izotopowej między (^{14}C) GDP i GTP, które karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa również katalizuje. Badania wymiany izotopowej w stanie równowagi pozwoliły odróżnić mechanizm sekwencyjny uporządkowany od mechanizmu sekwencyjnego o dowolnej kolejności (w mechanizmie sekwencyjnym pierwszy produkt może pojawiać się dopiero po przyłączeniu obu substratów). Na podstawie tych badań mechanizm reakcji katalizowanej przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową z frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura określono jako „nieuporządkowany” z dwoma substratami i trzema produktami, czyli według nomenklatury Clelanda typu random bi-ter. W mechanizmie tym, przekształcenie kompleksu trójskładnikowego do czteroskładnikowego ($\text{EMn}\cdot\text{GTP}\cdot\text{szczawiooctan}\rightleftharpoons\text{E}\cdot\text{Mn}\cdot\text{GDP}\cdot\text{fosfoenolopirogronian}\cdot\text{CO}_2$) nie jest etapem najwolniej przebiegającym. Wydaje się, że etapem ograniczającym szybkość reakcji jest uwalnianie fosfoenolopirogronianu lub związane z tym zmiany konformacyjne enzymu (31). W systemie Clelanda (135) graficznego zapisu mechanizmów złożonych reakcji enzymatycznych, schemat reakcji katalizowanej przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową można zapisać tak, jak na Ryc. 1.

Jeśli reakcja przebiega według mechanizmu nieuporządkowanego, możliwych jest kilka różnych sekwencji zdarzeń między przyłączeniem substratów i uwolnieniem produktów. Dla reakcji katalizowanej przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową wykazano trzy możliwe sekwencje reakcji.

I sekwencja reakcji zachodzi po połączeniu MnGDP^- . Jest to nieodwracalna dekarboksylacja szczawiooctanu z wytworzeniem pirogronianu. Uwolnienie pozostałych produktów, MnGDP^- i CO_2 , zachodzi w sposób nieuporządkowany.

Główny ciąg przemian to II sekwencja reakcji. Nieuporządkowane przyłączenie substratów prowadzi do powstania kompleksu trójskładnikowego ($E \cdot Mn \cdot GTP \cdot$ szczawiooocetan), który ulega przekształceniu do kompleksu czteroskładnikowego ($E \cdot Mn \cdot GDP \cdot$ fosfoenolopirogronian $\cdot CO_2$). Uwalnianie produktów odbywa się również w sposób nieuporządkowany. Wydaje się, że uwalnianie fosfoenolopirogronianu z kompleksu



Ryc. 1. Schemat reakcji katalizowanej przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową (mechanizm random bi-ter) oparty na badaniach enzymu frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura (31) opracowany według graficznego systemu zapisu Clelanda (135).

I, II, III, — trzy możliwe sekwencje reakcji; I — dekarboksylacja szczawiooocetanu z wytworzeniem pirogronianu (mechanizm sekwencyjny), II — dekarboksylacja szczawiooocetanu z wytworzeniem fosfoenolopirogronianu (mechanizm sekwencyjny), III — wymiana $GDP \rightleftharpoons GTP$ (mechanizm niesekwencyjny), OAA — szczawiooocetan, PEP — fosfoenolopirogronian, Pir — pirogronian, E — enzym. Szczególny opis ryciny w tekście.

$E \cdot Mn \cdot GDP \cdot$ fosfoenolopirogronian $\cdot CO_2$ jest etapem ograniczającym szybkość całej reakcji katalizowanej przez enzym. Sekwencje I i II reakcji zachodzą według mechanizmu sekwencyjnego, to znaczy, że pierwszy produkt może pojawić się dopiero po przyłączeniu obu substratów.

III sekwencja reakcji, w której następuje wymiana $GDP \rightleftharpoons GTP$ zachodzi według mechanizmu niesekwencyjnego (31). Pierwszy produkt $MnGDP^-$ pojawia się przed przyłączeniem drugiego substratu — szczawiooocetanu. III sekwencja reakcji nie jest dostatecznie udokumentowana doświadczalnie i na rycinie przedstawiona jest linią przerywaną.

Zjawisko katalizowania przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową reakcji o mechanizmie zarówno sekwencyjnym jak i niesekwencyjnym sugeruje, że przekształcenie kompleksu $E \cdot Mn \cdot GTP \cdot$ szczawiooocetan w kompleks $E \cdot Mn \cdot GDP \cdot$ fosfoenolopirogronian $\cdot CO_2$ może następować poprzez stadium pośrednie ufosforylowanego enzymu (31).

VI. Centrum aktywne karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej

Na podstawie badań nad mechanizmami reakcji i doświadczeń śledzących zmiany parametrów fizykochemicznych enzymu, wnioskować można o budowie centrum aktywnego danego enzymu. Miller i współautorzy (115, 132) na podstawie takich badań zaproponowali ogólny mechanizm odwracalnej karboksylacji fosfoenolopirogronianu oparty na utworzeniu potrójnego kompleksu enzym, Mn^{2+} , fosfoenolopirogronian. Wykazali oni, że Mn^{2+} wiąże się bezpośrednio z cząsteczką enzymu w stosunku 1 : 1 i przez ten metal następuje związanie fosfoenolopirogronianu. Badania te zostały później potwierdzone na innych preparatach enzymu (35, 116). Przyłączenie IDP prowadzi do utworzenia poczwórnego kompleksu, gdzie Mn^{2+} jest przyłączony zarówno do reszty fosforanowej IDP jak i grupy fosforanowej fosfoenolopirogronianu. Miller sugeruje, że mechanizm reakcji katalizowanej przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową jest analogiczny do mechanizmu reakcji katalizowanej przez kinazę pirogronianową. W reakcjach tych grupa fosforanowa fosfoenolopirogronianu atakowana jest nukleofilowo, po czym następuje tautomeryzacja i przejście odpowiednio naładowanej reszty przez trzeci atom węgla fosfoenolopirogronianu.

Badania polegające na modyfikacji cząsteczki enzymu przez związki specyficznie reagujące z różnymi resztami aminokwasowymi wykazały, że najistotniejsze dla aktywności karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej są dwie sąsiadujące ze sobą grupy sulfhydrylowe (29, 30, 51, 131, 140—144). Jedna z nich, występująca w obrębie centrum aktywnego, jest niezbędna do aktywności enzymu i prawdopodobnie bezpośrednio bierze udział w przekształceniu substratów w produkty. Świadczą o tym następujące fakty: a. wszystkie substraty osłaniają tę grupę SH przed reakcją z odczynnikami sulfhydrylowymi, b. taką samą zdolność inaktywacji enzymu mają odczynniki sulfhydrylowe o dużych i małych cząsteczkach, c. aktywność enzymu po zablokowaniu jednej grupy SH jest bardzo mała lub równa zero, d. jedna grupa sulfhydrylowa centrum aktywnego enzymu kilkanaście razy szybciej niż inne grupy SH enzymu reaguje z badanymi odczynnikami.

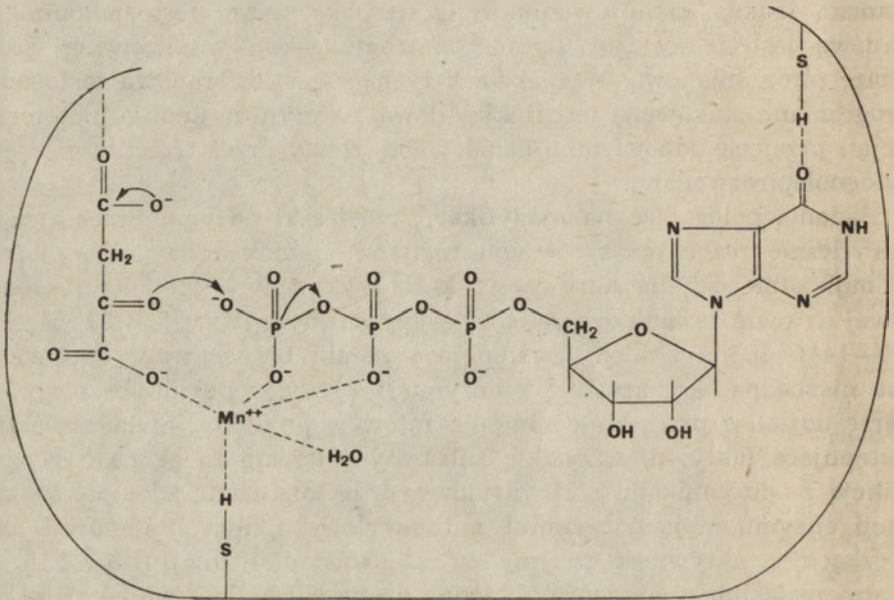
Tę grupę sulfhydrylową nazwano „krytyczną” i „katalityczną” dla aktywności karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej (29, 30). Z katalityczną grupą sulfhydrylową sąsiaduje druga grupa sulfhydrylowa osłaniana przez jony manganawe.

Występowanie dwóch sąsiadujących ze sobą grup sulfhydrylowych istotnych dla aktywności enzymatycznej zostało stwierdzone także w przypadku innych enzymów, między innymi heksokinazy mózgu, dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego i kinazy pirogronianowej mięśni królika (145—147).

Silverstein i współautorzy (142, 143, 148) rozróżniają w cen-

trum aktywnym karboksykinazy fosfoenolpirogrońianowej dwa miejsca, jedno wiążące enolpirogrońian i istotne w przypadku reakcji karboksylacji i dekarboksylacji, a drugie o szczególnym powinowactwie do nukleotydów. Modyfikacja jednej grupy sulfhydrylowej hamuje zarówno wiązanie nukleotydów jak i reakcję dekarboksylacji. Podobny efekt daje modyfikacja karboksykinazy fosfoenolpirogrońianowej 1-anilinonaftaleno-8-sulfonianem (ANS), co wskazuje, że w centrum aktywnym enzymu istotną resztą jest także reszta aminokwasowa o charakterze hydrofobowym (143, 148).

Na podstawie powyższych badań oraz modeli centrum aktywnego innych enzymów (149, 150) schemat centrum aktywnego karboksykinazy fosfoenolpirogrońianowej dla reakcji dekarboksylacji można przedstawić następująco (Ryc. 2):



Ryc. 2. Schemat centrum aktywnego karboksykinazy fosfoenolpirogrońianowej (opracowano wg 29, 30, 65, 113, 115, 116, 132, 140, 141, 149, 150).

VII. Mechanizmy regulacji karboksykinazy fosfoenolpirogrońianowej *in vivo*

Jak już wspomniano, karboksykinaza fosfoenolpirogrońianowa jest kluczowym enzymem glukoneogeny (151, 152), ponieważ ulega procesom regulacyjnym w zależności od stanu metabolicznego komórki. Uważa się, że zmiany aktywności karboksykinazy fosfoenolpirogrońianowej we frakcji cytoplazmatycznej mogą następować na skutek: zmiany cał-

kowej ilości enzymu we frakcji cytoplazmatycznej (7, 9, 14), zmiany całkowitej ilości ferroaktywatora we frakcji cytoplazmatycznej (17), bezpośredniego modulowania aktywności enzymu (15, 16, 17, 18), bezpośredniego modulowania aktywności ferroaktywatora (18).

Regulacja oparta na zmianie ilości enzymu jak i ferroaktywatora nie może zapewniać szybkiej zmiany aktywności karboksykinazy fosfoenolopirogronianu *in vivo*, gdyż czas degradacji i syntezy obu tych białek wynosi około kilkunastu godzin (17, 19—21). Stwierdzono, że głodzenie, cukrzyca eksperymentalna oraz zmiany hormonalne (9, 21, 64, 153—155) przyspieszają szybkość syntezy enzymu i ferroaktywatora, przy czym wzrost ilości ferroaktywatora jest zawsze proporcjonalny do wzrostu ilości karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej (17).

Liczne prace wykazały, że oprócz powyższych powolnych procesów regulacyjnych związanych z syntezą enzymu *de novo*, aktywność karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej może ulegać bardzo szybkim zmianom (kilka - kilkanaście minut), co przypisuje się procesom bezpośredniej zmiany aktywności enzymu (22, 23, 25—27). Wykluczono dotychczas wiele sugerowanych dawniej (46, 57, 156) mechanizmów bezpośredniej zmiany aktywności enzymu we frakcji cytoplazmatycznej. I tak nie wydaje się możliwe, aby aktywność enzymu była regulowana przez dostępność substratów, gdyż ich stężenie we frakcji cytoplazmatycznej przekracza wartości wyznaczonych dla nich stałych Michaelisa. Zarówno stężenie GTP (100-600 μM) (157—158) jak i szczawiooctanu (5-10 μM) (15) jest stężeniem wysycającym dla karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej we frakcji cytoplazmatycznej; $K_m = 16 \mu\text{M}$ dla GTP (32), $K_m = 9 \mu\text{M}$ dla szczawiooctanu (32). Wykluczono również, że jony SO_4^{2-} mogą być aktywatorami enzymu *in vivo*. Stężenie SO_4^{2-} w wątrobie szczura wynosi 0.2 mM, a więc jest dziesięć razy za niskie aby aktywować enzym w obecności Fe^{2+} (113). Mn^{2+} , Fe^{2+} , i PO_4^{3-} oraz ferroaktywator są jedynymi fizjologicznie występującymi znanymi efektorami, które *in vitro* bezpośrednio zmieniają szybkość reakcji katalizowanej przez karboksykinazę fosfoenolopirogronianową (113). Jony PO_4^{3-} występują we frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura w stężeniu wystarczającym do silnego hamowania aktywności enzymu *in vivo* (16). Stężenie Mn^{2+} we frakcji cytoplazmatycznej wątroby szczura wynosi 1.8 μM (160). Jest to stężenie niewystarczające do aktywacji karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej gdyż stężenie enzymu w wątrobie wynosi 3 μM (57), a w warunkach głodzenia i cukrzyca eksperymentalnej rośnie dwa do sześciu razy (9, 17, 57). Całkowite stężenie żelaza w wątrobie wynosi 186 μM (160). Nawet jeżeli tylko niewielka jego część występuje w formie jonu żelazawego, ilość ta wydaje się wystarczająca do maksymalnej aktywacji enzymu w obecności ferroaktywatora (16). Biorąc pod uwagę podobieństwo w spo-

sobie oddziaływania na oczyszczony enzym kwasu 3-aminopikolinowego (związku hyperglikemicznego *in vivo*) i ferroaktywatora (15, 16, 121, 161) postuluje się, że aktywacja enzymu *in vivo* we frakcji cytoplazmatycznej odbywa się z udziałem Fe^{2+} i ferroaktywatora. Nie zbadano dotychczas jaki jest mechanizm bezpośredniej regulacji aktywności karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej w układzie enzym-ferroaktywator- Fe^{2+} . Biorąc pod uwagę, że ferroaktywator występuje w dużym nadmiarze w stosunku do stężenia enzymu (16) diskutowane są dwa możliwe sposoby regulacji:

- przez dostępność Fe^{2+}
- z udziałem dodatkowego mechanizmu umożliwiającego występowanie ferroaktywatora w formie aktywnej (zdolnej do aktywacji Fe^{2+}) i nieaktywnej.

Mechanizm oparty na dostępności Fe^{2+} postulowano porównując układ karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa - ferroaktywator - Fe^{2+} z pozornie analogicznym układem fosfodwuesteraza c-AMP (lub cykloazy adenylowa) - białko aktywujące - Ca^{2+} (162, 163). Czynnikiem regulującym dostępność Fe^{2+} z ferrytyny jest układ reduktazy FMN zależnej od NADH (164—169). Dotychczas nie podjęto badań mających na celu zweryfikowanie tego hipotetycznego modelu. Nie otrzymano także żadnych dowodów doświadczalnych na to, że ferroaktywator występuje w formie aktywnej i nieaktywnej.

Są natomiast dane wskazujące na występowanie karboksykinazy w formie „aktywnej” i „nieaktywnej”, które znajdują się w równowadze dynamicznej (30, 31, 33, 35, 38, 40—42). Forma „aktywna” to taki stan cząsteczki enzymu, w którym możliwe jest zwiększenie jego aktywności w stosunku do aktywności podstawowej. Czynnikiem aktywującym według niektórych autorów jest jon żelazawy (38), według innych jon manganawy (35, 41, 42). Stan utlenienia grup sulfhydrylowych cząsteczki enzymu wydaje się decydować o jego aktywności (30, 33, 35, 38, 41, 42). Nie jest jasne jaką rolę fizjologiczną w stabilizacji cząsteczki karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej odgrywa odkryty niedawno peptyd o masie 29000, oraz jaką rolę regulacyjną posiadają kationy dwuwartościowe.

VIII. Uwagi końcowe

Kluczową rolę karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej w glukoneogenezie wykazano badając enzym z wątroby szczura. Wiadomo jednak, że w wątrobie szczura karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa występuje prawie wyłącznie we frakcji cytoplazmatycznej i podlega regulacji pod wpływem zmian hormonalnych i dietetycznych (7, 9, 13, 60—64). Badania glukoneogenezy w wątrobie innych gatunków ssaków, takich jak: człowiek, świnka morska, królik i kot, u których 50-60% karbo-

ksykinazy fosfoenolpirogronianowej znajduje się w mitochondriach, wykazały istotną rolę enzymu frakcji mitochondrialnej w produkcji glukozy (13, 56, 124, 170). Regulacyjna rola karboksykinazy fosfoenolpirogronianowej z frakcji mitochondrialnej w glukoneogenezie jest inna niż enzymu z frakcji cytoplazmatycznej (13, 124, 159). Kwasy tłuszczowe, które są uwalniane w czasie głodzenia stymulują wytwarzanie glukozy u szczura lecz hamują wytwarzanie fosfoenolpirogronianu w mitochondriach człowieka, świnki morskiej czy kota. Wydaje się, że aktywność mitochondrialnej karboksykinazy fosfoenolpirogronianowej regulowana jest przez poziom NADH oraz dostępność szczawiooctanu (32, 54, 56, 59, 65—68).

Karboksykinaza fosfoenolpirogronianowa występuje nie tylko w tkankach gdzie zachodzi glukoneogeneza jak wątroba i nerka. Jej aktywność stwierdzono również w mięśniach i białej tkance tłuszczowej (171—174). Wykazano, że w mięśniach enzym ten bierze udział w przekształcaniu waliny i izoleucyny w alaninę (171—172). W białej tkance tłuszczowej aktywność karboksykinazy fosfoenolpirogronianowej decyduje o szybkości wytwarzania α -glicerofosforanu na drodze gliceroneogenezy (63, 173—175).

Na podstawie dotychczasowych badań ustalono, że o aktywności karboksykinazy fosfoenolpirogronianowej decyduje stopień utlenienia grup sulfhydrylowych enzymu. Ferroaktywator wraz z jonami żelazowymi i fosforanowymi wpływa na aktywność całego szlaku glukoneogenezy poprzez modulowanie aktywności karboksykinazy fosfoenolpirogronianowej we frakcji cytoplazmatycznej. Wydaje się, że dalsze badania w tym kierunku mogą wyjaśnić szereg nierozwiązanych dotychczas problemów regulacji glukoneogenezy, między innymi ciekawe zjawisko stymulacji glukoneogenezy i stymulacji karboksykinazy fosfoenolpirogronianowej w nerce pod wpływem hiperkalcemii (176—178), jak również rolę insuliny w regulacji glukoneogenezy wątrobowej w stanie hypoglikemii (179—181).

Zaakceptowano do druku 16.12.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Utter M. F., Kurahashi K., (1953), *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 758—768.
2. Utter M. F., Kurahashi K., (1954), *J. Biol. Chem.*, **207**, 787—802.
3. Utter M. F., Kurahashi K., (1954), *J. Biol. Chem.*, **207**, 821—825.
4. Young J. W., Shrago E., Lardy H. A., (1964), *Biochemistry*, **3**, 1687—1689.
5. Keech D. B., Utter M. F., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 2609—2614.
6. Utter M. F., Keech D. B., Scrutton M. C., (1964), *Adv. Enzyme Regul.*, **2**, 49—68.
7. Lardy H. A., Foster D. O., Shrago E., Ray P. D., (1964), *Adv. Enzyme Regul.*, **2**, 39—47.
8. Lipmann F., (1941), *Adv. Enzymol.*, **1**, 99—162.

9. Shrago E., Lardy H. A., Nordlie R. C., Foster D. O., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3188—3191.
10. Wagle S. R., Ashmore J., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **74**, 564—569.
11. Wagle S. R., Ashmore J., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 1289—1291.
12. Reshef L., Hanson R. W., Ballard F. J., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5979—5984.
13. Garber A. J., Hanson R. W., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 589—591.
14. Hanson R. W., Garber A. J., (1972), *Am. J. Clin. Nutr.*, **25**, 1010—1012.
15. Bentle L. A., Snoke R. E., Lardy H. A., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2922—2928.
16. Bantle L. A., Lardy H. A., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1431—1440.
17. MacDonald M. J., Bentle L. A., Lardy H. A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 116—124.
18. MacDonald M. J., Lardy H. A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2300—2307.
19. Ballard F. J., Hopgood M. F., (1976), *Biochem. J.*, **154**, 717—724.
20. Tilghman S. M., Hanson R. W., Reshef L., Hopgood M. F., Ballard F. J., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1304—1308.
21. Ballard F. J., Hopgood M. F., (1973), *Biochem. J.*, **136**, 259—264.
22. Foster D. O., Lardy H. A., Ray P. D., Johnston J. B., (1967), *Biochemistry*, **6**, 2120—2128.
23. Snoke R. E., Johnston J. B., Lardy H. A., (1971), *eur. J. Biochem.*, **24**, 342—346.
24. Ui M., Claus T. H., Exton J. H., Park C. R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5344—5349.
25. Ui M., Exton J. H., Park C. R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5350—5359.
26. Exton J. H., Haeper S. C., Tucker A. L., Ho R. J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **329**, 23—40.
27. Tilghman S. M., Hanson R. W., Ballard F. J., (1976), *Gluconeogenesis: Its Regulations in Mammalian Species*, red. Hanson R. W., Mehlman M. A., str. 47—91. John Wiley and Sons, New York.
28. Bentle L. A., Snoke R. E., (1974), *Fed. Proc.*, **33**, 1272—1280.
29. Colombo G., Carlson G. M., Lardy H. A., (1978), *Biochemistry*, **17**, 5321—5328.
30. Carlson G. M., Colombo G., Lardy H. A., (1978), *Biochemistry*, **17**, 5329—5335.
31. Jomain-Baum M., Schramm V. L., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3648—3659.
32. Jomain-Baum M., Schramm V. L., Hanson R. W., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 37—44.
33. Reynolds C. H., (1980), *Biochem. J.*, **185**, 451—454.
34. Reynolds C. H., (1980), *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 325—329.
35. Hebda C., Nowak T., (1978), *Fedn. Proc. Am. Socs. Exp. Biol.*, **37**, 1296.
36. Reynolds C. H., (1980), *Comp. Biochem. Physiol.*, **65B**, 481—487.
37. MacDonald M. J., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 741—749.
38. MacDonald M. J., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **615**, 223—236.
39. MacDonald M. J., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **526**, 293—298.

40. Maxwell J. R., Ray P. D., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **614**, 163—172.
41. Brinkworth R. J., Hanson R. W., Fullin F. A., Schramm V. L., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10795—10802.
42. Schramm V. L., Fullin F. A., Zimmermann M. D., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10803—10808.
43. Rognstad R., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1608—1610.
44. Colombo G., Carlson G. M., Lardy H. A., (1981), *Biochemistry*, **20**, 2749—2757.
45. Colombo G., Lardy H. A., (1981), *Biochemistry*, **20**, 2758—2767.
46. Garber A. J., Ballard F. J., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2229—2240.
47. Jo J. S., Ishihara N., Kikuchi G., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.* **160**, 246—254.
48. Söling H. D., Kleineke J., Willms B., Janson G., Kuhn A., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **37**, 233—242.
49. Ballard F. J., Hanson R. W., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 866—871.
50. Mendes-Mourao J., Halestrap A. P., Crisp D. M., Pogson C. I., (1975), *FEBS Lett.*, **53**, 29—32.
51. Barns R. J., Keech D. B., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 284—296.
52. Holten P. D., Nordlie R. C., (1965), *Biochemistry*, **4**, 723—724.
53. Usatenko M. S., (1970), *Biochem. Med.*, **3**, 298—310.
54. Zaleski J., Bryła J., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 553—562.
55. Wieland O., Evertz-Prüsse E., Stukowski B., (1968), *FEBS Lett.*, **18**, 26—28.
56. Jomain-Baum M., Hanson W., (1973), *FEBS Lett.*, **29**, 145—147.
57. Ballard F. J., Hanson R. W., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5625—5630.
58. Fürst P., Guarnieri G., Hultman E., (1971), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **27**, 183—191.
59. Hammond K. D., Balinsky D., (1978), *Int. J. Biochem.*, **9**, 199—211.
60. Gevers W., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 141—152.
61. Nordlie R. C., Varricchio F. E., Holten D. D., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **97**, 214—218.
62. Goren E., Tal-Or Z., Shafir E., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **8**, 370—373.
63. Reshef L., Ballard F. J., Hanson R. W., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5577—5580.
64. Foster D. O., Ray P. D., Lardy H. A., (1966), *Biochemistry*, **5**, 555—557.
65. Utter M. F., Kolenbrader H. M., (1972), w *The Enzymes*, red. Boyer P., tom VI, str. 117—168, Academic Press, New York.
66. Hanson R. W., (1974), *Nutr. Rev.*, **32**, 1—8.
67. Zaleski J., Bryła J., (1980), *Int. J. Biochem.*, **11**, 237—242.
68. Williamson J. R., Browning E. T., Olson M. S., (1968), Interrelations between fatty acid oxidation and the control of gluconeogenesis in perfused rat liver, w *Advances in Enzyme Regulation*, red. G. Weber, str. 67—100, tom 6, Pergamon Press, London.
69. Chang H. C., Lane M. D., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 2413—2420.
70. Chang H. C., Maruyama H., Miller R. S., Lane M. D., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 2421—2430.
71. Noce P. S., Utter M. F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9099—9105.
72. Ballard F. J., (1970), *Biochem. J.*, **120**, 809—814.

73. Kochi H., Serizawa K., Kikuchi G., (1980), *J. Biochem.*, **88**, 895—904.
74. Schatz G., Mason T. L., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 51—87.
75. Zaleski J., Zabłocki K., Bryła J., (1981), *Int. J. Biochem.*, **13**, 713—721
76. Hanson R. W., Reshef L., Ballard J., (1975), *Fed. Proc.*, **34**, 166—171.
77. Ballard F. J., Hanson R. W., (1967), *Biochem. J.*, **120**, 866—871.
78. Garcia Ruiz J. P., Ingram R., Hanson R. W., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4189—4193.
79. Iynedjian P. B., Hanson R. W., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 655—662.
80. Oliver I. T., Edwards A. M., Pitot H. C., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **87**, 221—227.
81. Wimalasema J., Leichtling B. H., Lewis E. J., Longan T. A., Wicks W. P., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**, 595—605.
82. Girard J. E., Cuendet G. S., Marliss E. B., Kervran A., Rieutort M., Assan R., (1973), *J. Clin. Invest.*, **52**, 3190—3200.
83. Butcher F. R., Potter V. R., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 2141—2147.
84. Skala J. P., Hahn P., Knight B. L., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **631**, 420—427.
85. Meucker D., Shouval D., Reshef L., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **102**, 489—495.
86. Yoo-Warren H., Cimbala M. A., Felz K., Monahan J. E., Leis J. P., Hanson R. W., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10224—10228.
87. Phillippidis H., Ballard F. J., (1970), *Biochem. J.*, **120**, 385—392.
88. Yeung D., Oliver I. T., (1968), *Biochemistry*, **7**, 3231—3238.
89. Hanson R. W., Fisher L., Ballard F. J., Reshef L., (1973), *Enzyme*, **15**, 97—100.
90. Foster D. O., Ray P. D., Lardy H. A., (1966), *Biochemistry*, **5**, 555—562.
91. Johnson D. C., Ebert K. A., Ray P. D., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 750—756.
92. Murphy E. D., Anderson J. W., (1974), *Endocrinology*, **94**, 27—34.
93. Reshef L., Faliks D., Bentor-Getter V., Glaser G., (1979), *FEBS Lett.*, **97**, 96—100.
94. Hopgood M. F., Ballard F. J., Reshef L., Hanson R. W., (1973), *Biochem. J.*, **134**, 445—453.
95. Meyuhas O., Reshef L., Gunn J. M., Hanson R. W., Ballard F. J., (1976), *Biochem. J.*, **158**, 1—8.
96. Kioussis D., Reshef L., Cohen H., Tilghman S. M., Hanson R. W., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4327—4332.
97. Gunn J. M., Hanson R. W., Meyuhas O., Reshef L., Ballard F. J., (1975), *Biochem. J.*, **150**, 195—203.
98. Gunn J. B., Tilghman S. M., Hanson R. W., Reshef L., Ballard F. J., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2350—2357.
99. Iynedjian P. B., Ballard F. J., Hanson R. W., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5596—5603.
100. Meyuhas O., Reshef L., Ballard F. J., Hanson R. W., (1976), *Biochem. J.*, **158**, 9—16.
101. Feldman D., Hirst M., (1978), *Am. Physiol. Soc.*, E197—E202.
102. Iynedjian P. B., Jacot M. M., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **111**, 89—98.

103. Hortelano P., Faus M. J., Pita M. L., Sanchez-Medina F., (1980), *Toxicol. Lett.*, **1**, 5—10.
104. Steele J. G., McGrath M. C., Yech G. C. T., Oliver I. T., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 91—99.
105. Tilghman S. M., Hanson R. W., Reshef L., Hopgood M. F., Ballard F. J., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1304—1308.
106. Tilghman S. M., Gunn J. M., Fisher L. M., Hanson R. W., Reshef L., Ballard F. J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3322—3329.
107. Jefferson L. S., Exton J. H., Butcher R. W., Sutherland E. W., Park C. R., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 1031—1038.
108. Nelson K., Cimbala M. A., Hanson R. W., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8509—8515.
109. Faliks P., Cohen H., Glaser G., Reshef L., (1980), *FEBS Lett.*, **109**, 112—116.
110. Beale E. G., Katzen C. S., Gramer D. K., (1981), *Biochemistry*, **20**, 4878—4883.
111. Nagai K., Matsuda H., Nakagawa H., (1980), *J. Biochem.*, (Tokyo) **88**, 1009—1013.
112. Vargas A., Luisa P. M., Lupianez A. J., Sanduz-Medina F., (1979), *Ars. Pharm.*, **20**, 229—236.
113. Bentle L. A., Lardy H. A., (1976), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2916—2921.
114. Bentle L. A., Abstracts of 166th American Chemical Society National Meeting, Chicago, Sierpień 1975, str. 113.
115. Miller R. S., Mildvan A. S., Chang H. C., Easterday R. L., Maruyama H., Lane M. D., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 6030—6041.
116. Barns R. J., Keech D. B., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 410—419.
117. Duffy T. H., Saz H. J., Lee M. H., Nowak T., (1981), *Fed. Proc.*, **40**, 1655.
118. MacDonald M. J., Ming-ta Huang, Lardy H. A., (1978), *Biochem. J.*, **176**, 495—504.
119. Smith S. A., Elliott K. R. F., Pogson K. J., (1978), *Biochem. J.*, **176**, 817—825.
120. Smith S. A., Elliott K. R. F., Pogson C. I., (1979), *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 2145—2149.
121. Blank B., Di Tullio N. W., Miao C. K., Owings F. F., Gleason J. G., Ross S. T., Berkoff C. E., Saunders H. L., Delarge J., Lapiere C. L., (1974), *J. Med. Chem.*, **17**, 1065—1071.
122. Di Tullio N. W., Berkoff C. E., Blank B., Kostos V., Stack E. J., Saunders H. L., (1974), *Biochem. J.*, **138**, 387—394.
123. McDaniel H. G., Reddy W. J., Boshell B. R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 543—550.
124. Söling H. D., Willms B., Klineke J., Gehloff M., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **16**, 289—302.
125. Williamson D. H., Mayor F., Veloso D., (1971), w Regulation of Gluconeogenesis, red. Söling H. D., Willms B., str. 92—102, Academic Press, New York.
126. Watford M., Winay P., Lemieux G., Gougoux A., (1980), *Can. J. Biochem.*, **58**, 440—445.
127. MacDonald M. J., Lardy H. A., (1978), *Bioorg. Chem.*, **7**, 251—262.
128. Robinson B. H., Oej J., (1975), *FEBS Lett.*, **518**, 12—15.
129. MacDonald M. J., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **526**, 293—298.

130. Kostos V., DiTulio N. W., Rush J., Cewliński L., Saunders H. L., (1945), *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**, 459—465.
131. Barns R. J., Keech D. B., O'Sullivan W. J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 212—224.
132. Miller R. S., Lane M. D., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 6041—6049.
133. Felicioli R. A., Barsacchi R., Ipata P. L. (1970), *Eur. J. Biochem.*, **13**, 403—409.
134. Cleland W. W., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104—137.
135. Cleland W. W., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 173—188.
136. Cleland W. W., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 188—196.
137. Śliwowski J., (1969), *Post. Biochem.*, **15**, 447—469.
138. Śliwowski J., (1969), *Post. Biochem.*, **15**, 607—631.
139. Cannata J. J. B., Stoppani A. O. M., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 1919—1927.
140. Baxter R. C., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 965—971.
141. Barns R. J., Keech D. B., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 514—526.
142. Silverstein R., Rawitch A. B., Grainger D. A., (1979), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 911—918.
143. Silverstein R., Cheung-chung Lin, Fanning K. W., Bao-Shin T. Hung, (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **614**, 534—544.
144. Jodus M., Hanson R. W., Colman R. F., (1981), *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **101**, 884—892.
145. Redkar V. D., Keukara U. W., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4707.
146. Wassarman P. M., Major J. P., (1969), *Biochemistry*, **8**, 1076.
147. Flashner M., Hollenberg P. F., Coon M. J., (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 8114—8120.
148. Silverstein R., Cheung-Chung Lin, Rawitch A. B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 1374—1380.
149. Tonomura Y., Kobo S., Imamura K., (1965), *Molecular Biology of Muscular Contraction, Biochim. Biophys. Acta Library*, **9**, 11—30.
150. Perry S. V., (1967), *Prog. Biophys.*, **17**, 327—331.
151. Tilghman S. M., Hanson R. W., Ballard F. J., (1976) w *Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species*, red. Hanson R. W., Mehlman M. A., str. 47—91, John Wiley and Sons, New York.
152. Rognstad R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1875—1878.
153. Johnson D. C., Ebert K. A., Ray P. D., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 750—756.
154. Murphy E. D., Anderson J. W., (1974), *Endocrinology*, **94**, 27—34.
155. Oliver I. T., Edwards A. M., Pilot H. C., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **87**, 221—227.
156. Ishihara N., Kikuchi G., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 733—748.
157. Clifford A. J., Riumallo J. A., Baliga B. S., Munro H. N., Brown P. R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **277**, 443—458.
158. Chance B., Schoener B., Krejci K., Rüssmann W., Weseman W., Schnitger H., Bücher Th., (1965), *Biochem. Z.*, **341**, 325—333.
159. Williamson J. R., Scholtz R., Browning E. T., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 4617—4627.
160. Thiers R. E., Vallee B. L., (1957), *J. Biol. Chem.*, **226**, 911—920.
161. MacDonald M. J., Huang M. T., Lardy H. A., (1977), *Fed. Proc.*, **36**, 932—938.

162. Wolff D. J., Brostrom C. O., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 349—358.
163. Lynch T. J., Tallant E. A., Cheung W. Y., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 616—625.
164. Beaufay H., Bendall D. S., Baudhuin P., De Duve C., (1959), *Biochem. J.*, **73**, 623—628.
165. Thiers R. E., Vallee B. L., (1957), *J. Biol. Chem.*, **226**, 911—920.
166. Frieden E., Osaki S., (1974), w *Advances in Experimental Medicine and Biology*, red. Friedman M., tom **48**, str. 235—265, Plenum Press, New York.
167. Crichton R. R., Wanters M., Roman F., (1975), w *Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine*, red. Crichton R. R., str. 287—294, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
168. Crichton R. R., Roman F., Wanters M., (1975) *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 946—948.
169. Frieden E., (1973), *Nutr. Rev.*, **31**, 41—44.
170. Bryła J., (1974), *FEBS Lett.*, **47**, 60—65.
171. Zammit V. A., Newsholme E. A., (1978), *Biochem. J.*, **174**, (3), 979—989.
172. Newsholme E. A., Williams T., (1978), *Biochem. J.*, **176**, 623—626.
173. Ballard J. F., Hanson R. W., Leveille G. A., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 2746—2750.
174. Gorin E., Tal-Or Z., Shafir E., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **8**, 370—375.
175. Reshef L., Hanson R. W., Ballard F. J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1994—2001.
176. Jerzmanowska M., Lorenc R., (1978), *Acta Physiol. Pol.*, **29**, 153—159.
177. Rassmussen H., Nagata N., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **215**, 17—25.
178. Rassmussen H., Bikle D. D., (1975), w *Calcium Transport in Contraction and Secretion*, red. Carafoli E., Clementi F., Drabikowski E., Margreth A., str. 111—112, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
179. Exton J. H., Park C. R., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1424—1433.
180. Williamson J. R., (1967), *Adv. Enzyme Regul.*, **5**, 229—254.
181. MacDonald M. J., Ming-Za Huang, Lardy H. A., (1978), *Biochem. J.*, **176**, 495—504.

JÓZEF ŁOMAKO *)

Glikogenosomy

Glycogenosomes

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Mechanizmy regulacji *in vitro* aktywności syntetazy i fosforylasy glikogenu
- III. Glikogenosomy
 - III-1. Budowa i skład
 - III-2. Aktywność enzymów w glikogenosomach
- IV. Białka kowalencyjnie związane z glikogenem
- V. Synteza glikogenu *in vitro* i *in vivo*
- VI. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. *In vitro* regulation of glycogen synthase and glycogen phosphorylase activities
- III. Glycogenosomes
 - III-1. Structure and composition
 - III-2. Activity of glycogenosomal enzymes
- IV. Proteins covalently bound to glycogen
- V. *In vitro* and *in vivo* synthesis of glycogen
- VI. Concluding remarks

I. Wstęp

Od odkrycia glikogenu minęło ponad sto lat, ale nadal pozostaje wiele nierozwiązanych problemów dotyczących zarówno jego struktury jak i metabolizmu. Powszechnie wiadomo, że glikogen jest rozgałęzionym polimerem wielu tysięcy reszt glukozy połączonych wiąza-

*) Dr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Wrocławski, 50-137 Wrocław, Tamka 2.

Wykaz stosowanych skrótów: UDPG — urydynodwufosfoglukoza, AMP — kwas adenilowy, cAMP — cykliczny kwas adenilowy, G-6-P — glukoza-6-fosforan, TCA — kwas trójchlorooctowy.

niami 1,4- i 1,6- α -glukozydowymi. Nie bierze się jednak pod uwagę, że preparaty tego wielocukru zawierają drobne ilości białek, glukozoaminy, dezoksyglukozy czy też fosforu (1—3). Ilości tych „zanieczyszczeń” są zmienne i zależą zarówno od stosowanej metody izolowania jak i od pochodzenia preparatu. Wiele faktów przemawia za istotnym znaczeniem tych składników w budowie i metabolizmie glikogenu.

W arytkule omówiono relacje zachodzące pomiędzy białkami a glikogenem w aspekcie sprzężeń procesów jego degradacji i syntezy oraz jego budowy.

II. Mechanizm regulacji aktywności syntetazy i fosforylasy glikogenu *in vitro*

Ilość glikogenu w komórkach zależy od aktywności enzymów kluczowych w jego biosyntezie i degradacji, syntetazy glikogenu i fosforylasy glikogenu. *In vitro* aktywność tych enzymów regulowana jest poprzez odwracalną fosforylację i defosforylację (16, 17).

Syntetaza glikogenu mięśni szkieletowych królika występuje w formie zdefosforylowanej (syntetaza a) o wysokiej aktywności lub ufosforylowanej (syntetaza b), w pełni aktywnej dopiero w obecności allosterycznego aktywatora, jakim jest glukozo-6-fosforan (18—21). W badaniach *in vitro* wykazano, że w obecności ATP syntetaza ulega fosforylacji przez kinazy białkowe zależne (22—24) jak i niezależne (25—30) od cAMP, a także przez kinazę fosforylasy (31—35). Konwersja syntetazy a w formę zależną od G-6-P może być również wynikiem ograniczonej proteolizy enzymu (37—40, 50). Ostatnio wykazano, że monomer syntetazy zawiera siedem reszt serynowych ulegających enzymatycznej fosforylacji (154). Kinaza zależna od cAMP fosforyluje miejsca 1a i 1b oraz miejsce 2 (41—43, 45) fosforylowane głównie przez kinazę fosforylasy (35, 44) oraz kinazę-4 (154, 155). Miejsca 3a, 3b i 3c w tym samym peptydzie trypsynowym są fosforylowane przez kinazę-3. Miejsce 5 fosforylowane jest przez kinazę-5 (155). Kinaza-3, -4 i -5 są enzymami, których aktywność nie zależy od jonów wapnia ani też od cAMP. Stopień fosforylacji miejsc 1a i 2 determinuje aktywność syntetazy. Kinaza zależna od cAMP 10 razy szybciej fosforyluje miejsce 1a niż 1b, a jego defosforylacja przez fosfatazę jest 20-krotnie szybsza (46). Fosforylacja miejsca 2 przez kinazę-2 stymulowana jest przez kalmodulinę w obecności jonów wapnia. Tak więc, pobudzenie nerwowe może wpływać na aktywność syntetazy poprzez wpływ Ca^{2+} na aktywność kinazy-2 (36).

Formą aktywną fosforylasy glikogenu (fosforylaza a), w przeciwieństwie do jego syntetazy jest enzym z ufosforylowaną jedną resztą seryny w każdej z podjednostek. Enzym zdefosforylowany (fosforylaza b) wy-

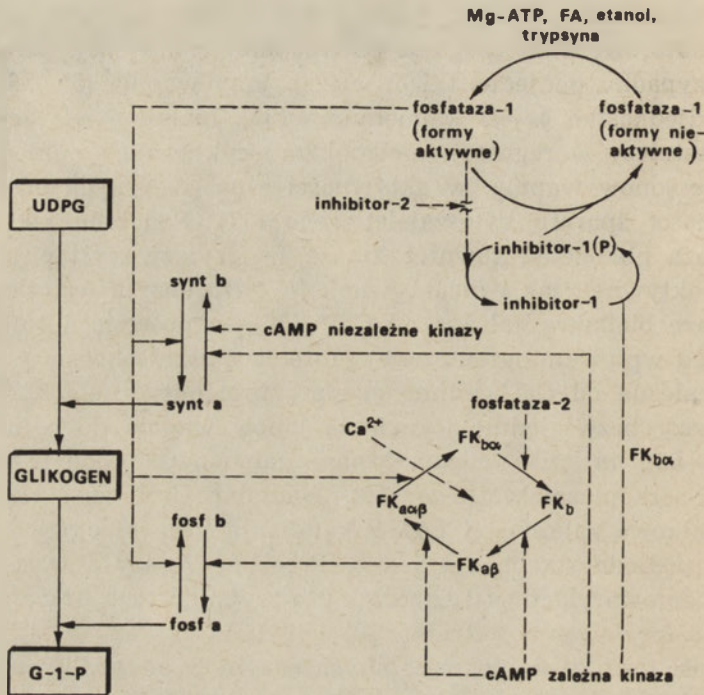
maga AMP jako allosterycznego aktywatora (47—49). Kinaza fosforylazy katalizuje przejście fosforylazy b w fosforylazę a (51), natomiast fosfatazy katalizują reakcję odwrotną (52).

Kinaza fosforylazy składa się z czterech różnych podjednostek: α , β , γ , δ , które występują w niej w równomolarnych stosunkach (53—55), przy czym mol enzymu zawiera po cztery mole każdej z podjednostek (55, 56). Tylko podjednostka γ wykazuje aktywność katalityczną a pozostałe działania regulatorowe bądź ulegając odwracalnej fosforylacji (30), bądź też (jak w przypadku podjednostki δ) wiążąc jony wapnia (55, 56). Okazało się, że podjednostka δ jest kalmoduliną (55), białkiem wiążącym wapń, które uczestniczy w regulacji metabolizmu cyklicznych nukleotydów, w transporcie jonów wapnia, w aktywności kinaz zależnych od Ca^{2+} oraz w aktywności aparatu cytoszkieletowego (57). Podobnie jak syntetaza i fosforylaza glikogenu, również kinaza fosforylazy występuje zarówno w formie aktywnej, jak i nieaktywnej. *In vitro* enzym jest aktywowany przez kinazę białkową zależną od Ca^{2+} (56), w procesie autofosforylacji (58) lub pod wpływem ograniczonej proteolizy przez obecną w mięśniach proteazę zależną od Ca^{2+} i inne enzymy proteolityczne (58). Wszystkie formy kinazy bezwzględnie wymagają jonów wapnia do pełnej aktywności (60—63); *in vitro* można kinazę zahamować dodając fragmenty retikulum serkoplazmatycznego (60). Nadmiar Ca^{2+} znosi hamowanie. Kinaza białkowa zależna od cAMP katalizuje fosforylację jednej reszty seryny w podjednostkach α i β (56). Przejście kinazy a w jej formę b polega na defosforylacji podjednostek β a szybkość tego procesu reguluje stopień ufosforylowania podjednostek α (64).

Swoistość fosfataz do poszczególnych enzymów metabolizmu glikogenu (65—71), jak również miejsce ich występowania (72, 73) przez długi okres wzbudzały wiele kontrowersji. Ostatnio wykazano, że fosfataza fosforylazy, fosfataza syntetazy oraz fosfataza podjednostek kinazy fosforylazy jest tym samym białkiem (30, 74). Enzym ten, nazwany fosfatazą-1 (30) ma ciężar cząsteczkowy 260 000 (74) i zawiera związany jon magnezu (75). Podjednostka katalityczna enzymu ma ciężar cząsteczkowy 70 000. Enzym hamowany jest przez ATP, a także w miarę oczyszczania traci samoistną aktywność. Reaktywacja następuje w wyniku przeniesienia jonu magnezu z Mg-ATP na podjednostkę katalityczną przy udziale białka aktywującego (74), które zidentyfikowano jako kinazę syntetazy niezależną od Ca^{2+} i cAMP (76). Fosfataza-2 wykazuje znacznie większe powinowactwo wobec podjednostki α kinazy fosforylazy niż wobec fosforylazy, syntetazy czy też podjednostki β kinazy fosforylazy (77, 78).

Białkowe termostabilne inhibitory (79, 80) oraz regulatorowa podjednostka kinazy zależnej od cAMP (81) hamują aktywność fosfatazową. W przeciwieństwie do inhibitora-2, inhibitor-1 hamuje fosfatazy po fosforylacji przez kinazę zależną od cAMP (82, 83). *In vitro* ufosforylowany inhibitor-1 okazał się dobrym substratem dla fosfatazy-1. Jego defosfo-

rylacja jest natomiast hamowana przez inhibitor-2 (84). Ostatnio wykazano, że fosfataza syntetazy glikogenu z wątroby myszy jest hamowana przez jony wapnia (86) przy stężeniu wymaganym dla aktywacji kinazy fosforylasy (86, 87, 88). Schemat regulacji przejścia UDPG-glikogen-G-1-P przedstawiono na Rycinie 1.



Ryc. 1. Regulacja syntezy i degradacji glikogenu poprzez wpływ fosfataz i kinaz białek na aktywność syntetazy i fosforylasy glikogenu.

UDPG — UDP-glukoza, G-1-P — glukoza-1-fosforan, synt. b — nieaktywna forma syntetazy glikogenu (forma ufosforylowana), synt. a — aktywna forma syntetazy glikogenu (forma defosforylowana), fosf. b — nieaktywna forma fosforylasy glikogenu (forma defosforylowana), fosf. a — aktywna forma fosforylasy glikogenu (forma ufosforylowana), FK_β — nieaktywna forma kinazy fosforylasy FK_{αβ} — aktywna forma fosforylasy kinazy z ufosforylowaną seryną w β-podjednostce, FK_{αβ} — kinaza fosforylasy z ufosforylowanymi serynami w podjednostkach α i β, FK_{βα} — kinaza fosforylasy nieaktywna z ufosforylowaną seryną w α-podjednostce, inhibitor-1(P) — ufosforylowana forma inhibitora-1, FA — białko aktywujące fosfatazę.

Na podstawie 30, 41—43, 46, 51, 52, 56, 74, 76—84

III. Glikogenosomy

III-1. Budowa i skład

Glikogen w komórkach zwierząt i niektórych organizmów niższych (4) tworzy granulowane struktury tzw. cząstki α, których średnica w hepatocytach wynosi około 0,1 μm. Cząstki te zbudowane są z podjednostek

β o średnicy 15 do 30 μm (5). W populacji cząstek glikogenu występuje niewielka ilość o masie znacznie przewyższającej masę cząstek α (6—9). Masa cząsteczkowa podjednostek β wyliczona z ich wielkości i gęstości wynosi około 4×10^6 a cząstek α 4×10^8 . Masa cząsteczkowa a także obraz w mikroskopie elektronowym glikogenu w znacznym stopniu zależą od metody jego izolowania. Ekstrakcja tkanek rozcieńczonymi roztworami kwasów lub stężonymi roztworami zasad prowadzi do zniszczenia struktury, co przejawia się w daleko idących zmianach zarówno w obrazie mikroskopowym jak i masie cząsteczkowej uzyskiwanych preparatów glikogenu. Stosując do ekstrakcji zimną wodę i następnie odpowiednie techniki odbiałczania uzyskuje się glikogen, który wieloma właściwościami zbliżony jest do glikogenu występującego w komórkach (2, 6, 153). Wirowanie różnicowe wodnych wyciągów pozwala na izolowanie „natywnych” kompleksów glikogen-białka (10, 11), dla których proponuje się nazwę „glikogenosomy” w odróżnieniu od glikosomów stanowiących organelle komórkowe podobne do mikrociałek, zawierających większość enzymów szlaku glikolitycznego (12).

W skład glikogenosomów wchodzi glikogen oraz enzymy związane bezpośrednio z jego metabolizmem. Są to więc jednostki strukturalne, w których zachodzi zarówno synteza glikogenu jak i jego fosforoliza. W stężonych roztworach sacharozy i maltozy oraz w obecności detergentów następuje dysocjacja kompleksów glikogen-białko. Syntetaza glikogenu, fosforylaza oraz kinaza fosforylazy stanowią 95% białek glikogenosomów. Pozostałych pięć procent stanowią przypuszczalnie enzym rozgałęziający, kinaza syntetazy niezależna od cAMP, fosfataza oraz kalsekwestryna (charakterystyczne białko retikulum sarkoplazmatycznego) (14). W wyciągach z mięśni szkieletowych i wątroby szczurów poddanych chromatografii na kolumnie wypełnionej immobilizowanym glikogenem, wśród białek adsorbujących się znaleziono fosforylazę glikogenu, syntetazę glikogenu, amylo-1,6-glukozydazę oraz enzym rozgałęziający (15). W elektroforezie żelowej w obecności SDS, oprócz wymienionych enzymów, znaleziono w przypadku mięśni pięć dodatkowych pasm białkowych a w przypadku wątroby — dziewięć. Przypuszcza się, że białka te grają rolę regulatorów metabolizmu glikogenu. Do tej pory nie jest poznany dokładny skład białkowy glikogenosomów ani też sposób rozmieszczenia białek w glikogenosomach.

III-2. Aktywność enzymów w glikogenosomach

W roku 1970 po raz pierwszy zwrócono uwagę na różnice działania czystych enzymów i tych samych enzymów w glikogenosomach (61). W glikogenosomach izolowanych z mięśni szkieletowych fosforylaza i kinaza fosforylazy znajdują się w konformacjach nieaktywnych podczas

gdy fosfataza fosforylaza jest aktywna. Dodanie kompleksu Mg-ATP i Ca^{2+} aktywuje kinazę fosforylaza, co powoduje natychmiastową konwersję fosforylaza b w fosforylaza a. Po wyczerpaniu zapasu ATP fosfataza przeprowadza fosforylaza a w formę nieaktywną. Dodanie ATP na nowo uruchamia proces fosforolizy. Drugą ciekawą obserwacją było stwierdzenie, że w glikogenosomach kinaza fosforylaza osiąga połowiczną aktywność dopiero przy stężeniu jonów wapnia 2×10^{-6} mola (61). Jest to stężenie wapnia wyzwalające skurcz mięśniowy (89). Po strawieniu glikogenu amylazą powinowactwo kinazy względem tego kationu wzrasta dziesięciokrotnie. Dodanie glikogenu do czystego enzymu obniża powinowactwo kinazy do poziomu obserwowanego w glikogenosomach. Jony wapnia odgrywają również istotną rolę w regulacji metabolizmu glikogenu w wątrobie. Przy fizjologicznym stężeniu (90—92) aktywującym wątrobową kinazę fosforylaza (86—88) ulega zahamowaniu aktywność fosfatazy syntetazy, co w konsekwencji prowadzi do przewagi procesu degradacji glikogenu nad jego syntezą (85). W glikogenosomach z mięśni AMP nie aktywuje fosforylaza b (61), jak również nie chroni fosforylaza a przed działaniem fosfataz (93). Fosforylaza w glikogenosomach znajduje się w takim stanie konformacyjnym, w którym enzym staje się niewrażliwy na działanie również innych czynników allosterycznych (94). Efekt tłumaczy się tym, że w glikogenosomach fosforylaza występuje jako hybryd fosfo : defosfo (11). W glikogenosomach Mg-ATP i Ca^{2+} aktywując kinazę fosforylaza jednocześnie hamują aktywność fosfatazy fosforylaza (95). Aktywność fosfatazy ujawnia się dopiero po wyczerpaniu dodanego ATP. Efekt ten zanika po strawieniu glikogenu amylazą. Fosfataza związana z glikogenem wykazuje 16-krotnie większą aktywność wobec fosforylaza glikogenosomalnej niż wobec czystej fosforylaza. W wątrobie około 10% fosfatazy fosforylaza występuje w glikogenosomach, natomiast pozostałe 90% obecne w cytoplazmie występuje w latentnej formie w postaci kompleksu enzymu z inhibitorem. Enzym glikogenosomalny nie jest hamowany przez termostabilne białkowe inhibitory, a jego aktywność całkowita wzrasta po podaniu glukokortykoidów, obniża się natomiast podczas głodzenia zwierząt (73). Potraktowanie wyciągu z wątroby trypsyną lub etanolem powoduje 10-krotny wzrost aktywności fosfatazowej w wyniku aktywacji latentnej formy enzymu. Glikogenosomy wątroby myszy zawierają swoistą fosfatazę syntetazy różną od fosfatazy fosforylaza, hamowaną przez termostabilny inhibitor-2 oraz inaktywowaną przez trypsynę i etanol (73). Ostatnio wykazano, że aktywność fosfatazy syntetazy w wątrobie zależy od dwóch składników białkowych oznaczanych jako białko G i białko S, a także od stopnia fosforylacji syntetazy (96). W wyniku chromatografii syntetazy na DEAE celulozie uzyskuje się formy enzymu o wzrastającej ilości fosforu określane mianem syntetaz b_1 , b_2 i b_3 . Białko G wykazuje duże powinowactwo do glikogenu i jako takie nie ma aktywności enzymatycznej. Białko S

znajduje się w supernatancie i ma znacznie wyższą aktywność wobec syntetazy b_1 , niż wobec syntetaz b_2 i b_3 . W obecności czynnika G aktywność białka S wzrasta o 35% jeśli substratem jest syntetaza b_1 oraz odpowiednio 7- i 11-krotnie jeśli substratami są syntetaza b_2 i syntetaza b_3 .

Już w roku 1965 zwrócono uwagę na możliwy udział glikogenu w regulacji aktywności enzymów związanych z jego metabolizmem (97). Stwierdzono bowiem, że w mięśniach szkieletowych przy niskich stężeniach glikogenu aktywność syntetazy jest wysoka, przy wysokich zaś jest niska. W wyjaśnieniu tego zjawiska pomocnym było wzięcie do doświadczonych szczurów szczepu *gsd/gsd* z defektem metabolicznym polegającym na braku wątrobowej kinazy fosforylazy (98). Wątroby tych szczurów charakteryzuje bardzo wysoka zawartość glikogenu i znacznie podwyższony poziom nieaktywnej syntetazy glikogenu występującej w glikogenosomach (99). Podobną zależność pomiędzy zawartością glikogenu a stężeniem syntetazy i jej aktywnością obserwuje się w wątrobie szczurów głodzonych i następnie intensywnie karmionych. Równocześnie aktywność fosfatazy w wyciągach zarówno z wątrób szczurów *gsd/gsd* jak i karmionych po uprzednim głodzeniu była znacznie niższa w porównaniu z grupą szczurów kontrolnych. W miarę rozcieńczania wyciągów wzrasta aktywność fosfatazy. Znosi ten efekt dodanie glikogenu. Mając na uwadze, iż konwersja syntetazy b w syntetazę a odbywa się przy udziale fosfatazy należy przyjąć, że stężenie glikogenu w komórkach, poprzez wpływ na aktywność fosfatazy syntetazy, jest jednym z naturalnych czynników regulujących proces syntezy glikogenu. Fosforylaza a również hamuje aktywność fosfatazy syntetazy (100—103). Efekt ten staje się szczególnie wyraźny wówczas, gdy enzymy znajdują się w kompleksie z glikogenem (104).

IV. Białka kowalencyjnie związane z glikogenem

Problem obecności białek kowalencyjnie związanych z glikogenem postawiono po raz pierwszy wówczas, gdy okazało się, że rozcieńczony kwas trójchlorooctowy ekstrahuje z tkanek tylko część glikogenu, a część jego — jako frakcja nierozpuszczalna w TCA — pozostaje w osadzie. Brak rozpuszczalności w kwasie trójchlorooctowym tłumaczono występowaniem kowalencyjnych połączeń wielocukru z białkami (105). Glikogen nierozpuszczalny w TCA ekstrahuje się stężonymi roztworami zasad lub też po strawieniu białek przez enzymy proteolityczne. Z wątroby szczura, ekstrahowanej kwasem trójchlorooctowym, a następnie poddanej w obecności chlorowodoru guanidyny wyczerpującemu trawieniu przez enzymy proteolityczne (115), uzyskuje się rozpuszczalny glikogen związany z peptydem (114). Glikogen ekstrahowany z wątrób królików zimną wodą, po usunięciu zaadsorbowanych białek, rozpada się pod wpływem

β -merkaptoetanolu na mniejsze podjednostki (113). Po usunięciu czynnika redukującego podjednostki ponownie agregują. Dodanie amidu kwasu jodooctowego znosi odwracalność tej reakcji. Na podstawie badań hydrodynamicznych wywnioskowano, że podstawową jednostkę strukturalną glikogenu stanowią dwie lub trzy podjednostki przyłączone do łańcucha polipeptydowego. Duże cząstki glikogenu zawierają do pięćdziesięciu takich jednostek połączonych ze sobą wiązaniami dwusiarczkowymi utworzonymi pomiędzy poszczególnymi łańcuchami polipeptydowymi (116). Ostatnio wykazano, że rozpuszczalny w kwasie trójchlorooctowym glikogen izolowany z mięśni szkieletowych królika zawiera białko, które nie dysocjuje od wielocukru w obecności chlorowodoru guanidyny czy też SDS (109, 110). Glikogen oczyszczony chromatograficznie na kolumnie z Sepharose CL-6B w obecności chlorowodoru guanidyny znakowano ^{14}C -formaldehydem poprzez metylację wolnych grup aminowych (117). Uzyskany preparat glikogenu nie wnikał do żelu poliakrylamidowego w obecności SDS. Nie obserwowano również wnikania do żelu piętna. Po enzymatycznej degradacji części wielocukrowej i po elektroforetycznym rozdziale wysokocząsteczkowego produktu obserwuje się w żelu kilka pasm glikoprotein wykazujących radioaktywność. Ilość pasm i ich ciężary cząsteczkowe zależą od stopnia strawienia wielocukru. W wyniku wyczerpującego trawienia glikogenu mieszaniną α -amylazy i glukoamylazy uzyskuje się nierozpuszczalną frakcję białkową zawierającą całość wyjściowego piętna. Białko to w elektroforezie żelowej w obecności SDS daje jedno pasmo, ma ciężar cząsteczkowy około 37 000 i służy jako primer w syntezie glikogenu *in vitro*, a jeden jego mol zawiera około 14 moli glukozy i 10 moli glukozoaminy oraz nieznaczące ilości mannozy i galaktozy. Ze wstępnych badań wynika, że część oligosacharydowa zawierająca N-acetyloglukozoaminę, mannozę i galaktozę wiąże się z łańcuchem polipeptydowym poprzez asparaginę wiązaniem N-glukozydowym, a w skład jednego z peptydów, uzyskanych po trawieniu przez proteazy, wchodzi ponad 50% aminokwasów hydrofobowych. Nie jest znany sposób łączenia się z białkiem oligosacharydów zawierających glukozę. Należy również zaznaczyć, że z glikogenu wątrobowego izolowanego różnymi metodami nie udało się uzyskać analogicznej frakcji białkooligosacharydowej (Łomako, dane niepublikowane). Tak więc mimo dość licznych prac dotyczących kowalencyjnych połączeń glikogenu z białkami problem w dalszym ciągu nie jest całkowicie rozwiązany (8, 106—114).

V. Synteza glikogenu *in vitro* i *in vivo*

Synteza glikogenu *in vitro* wymaga obecności primera, którym mogą być niewielkie ilości glikogenu lub też krótsze polimery glukozy (118). Już dwu- lub trójsacharydy mogą służyć jako akceptory glukozy przenie-

sionej z UDPG przez syntetazę glikogenową. Glukoza dołączona jest wiązaniem α -1,4-glukozydowym do nieredukującego końca primera co prowadzi do jego stopniowego wydłużania. Pozostaje nadal sprawą otwartą co jest primerem w syntezie glikogenu w komórce. Gdyby to był glikogen, to nie mogłoby dojść do jego całkowitego rozkładu, a przy wzroście stężenia glikogenu wzrastałby jego średni ciężar cząsteczkowy. Takie zjawisko jednak nie występuje w komórkach (7, 148, 149). Primerem mogą być oligosacharydy powstające w wyniku kondensacji glukozy przez hydrolazy glikogenu (119), a także maltoza, która w pewnych warunkach może być syntetyzowana z glukozy i UDPG przez syntezę glikogenu (120). Ostatnio postuluje się, że primerem w syntezie glikogenu jest białko. W wątrobie szczura znaleziono oprócz syntetazy glikogenu jeszcze dwa białka związane z syntezą glikogenu a mianowicie białko strukturalne na którym budowana jest cząsteczka wielocukru oraz nowy enzym — transferaza UDPG : białko (106). Produkt powstający w wyniku reakcji katalizowanej przez transferazę UDPG : białko jest nierozpuszczalny w rozcieńczonym TCA. Po trawieniu pronazą glikopeptyd rozpuszcza się w kwasie. Transferaza UDPG : białko różni się swoimi właściwościami od syntetazy glikogenu. Enzym wymaga środowiska o wysokiej sile jonowej a optimum jego działania znajduje się w pH 8,7. K r i s m a n (106) proponuje hipotezę, która omawia możliwą drogę biosyntezy glikogenu. Pierwszą reakcją stanowiąc ma przeniesienie reszt glukozy z UDPG na akceptor białkowy przez swoisty enzym (transferazę UDPG : białko). Łańcuch polipeptydowy jest glikozylowany w wielu miejscach. Przyłączanie dalszych cząsteczek glukozy odbywa się zapewne przy udziale syntetazy glikogenu, a przy współdziałaniu enzymu rozgałęziającego dochodzi do kompletnej syntezy glikogenu. Podobną hipotezę proponuje się w przypadku biosyntezy glikogenu bakteryjnego (121) oraz biosyntezy skrobi (122). Początkowy etap syntezy glikogenu u *Neurospora crassa* wymaga również białkowego primera (123). W tym przypadku synteza wielocukru przebiega nieco inaczej, a cały proces wygląda następująco. Glukoza zostaje przenoszona na białko przez swoistą glukozylotransferazę UDPG : białko. Syntetyzowany na białkowym primerze glukan, po osiągnięciu odpowiedniej wielkości (około 240 tys. daltonów) zostaje odłączony od białka przez swoistą hydrolazę. Odłączony glukan może służyć jako akceptor dalszych reszt glukozy przenoszonych przez syntetazę glikogenu.

Rozważając drogi syntezy glikogenu w komórce należy rozpatrzyć dwie możliwości (148). 1. Można założyć, że po podaniu glukozy w komórce rozpoczyna się równoczesna synteza wielu nowych cząsteczek glikogenu. Jeśli byłoby to prawdziwe, to ciężar cząsteczkowy nowosyntetyzowanego glikogenu powinien wzrastać wraz ze wzrostem jego stężenia. 2. Można również założyć, że przed rozpoczęciem syntezy nowej cząsteczki glikogenu powinna zostać ukończona synteza poprzedniej. W tym przypadku

średnia masa cząsteczkowa glikogenu nie zależałaby od jego stężenia w komórce. W badaniach nad włączaniem znakowanej glukozy do glikogenu w wątrobie płodu szczura we wczesnej fazie jego syntezy stwierdzono, że piętno zostaje równomiernie rozmieszczone w zewnętrznych i wewnętrznych łańcuchach wielocukru (149), co wskazuje, że cząsteczki syntetyzowane w danym okresie nie powiększają się w okresie późniejszym. Również takie czynniki jak insulina, glukagon, hydrokortizon, niektóre cukry proste oraz głodzenie nie wpływają na ciężar cząsteczkowy glikogenu w wątrobach myszy (7). Oba te fakty zdają się świadczyć, że synteza glikogenu przebiega zgodnie z drugą rozpatrywaną możliwością. Doświadczenia żywieniowe wskazują, że znakowane cząsteczki glukozy wbudowywane w glikogen w różnych okresach jego syntezy zwalniane są w procesie autofosforolizy w określonym porządku (148, 150). Jednostki glukozowe wcześniej wbudowywane zwalniają się później i odwrotnie. Powyższe zjawisko nie da się wytłumaczyć nierównomiernym rozmieszczeniem glukozy, ponieważ jej rozkład w wewnętrznych i zewnętrznych łańcuchach glikogenu jest prawie jednakowy. Określony porządek degradacji obserwowano zarówno w izolowanych hepatocytach jak i glikogenosomach. Autorzy sugerują, że za taki przebieg syntezy i degradacji glikogenu odpowiedzialny jest sam wielocukier (148). Jedynie w glikogenosomach wykazujących wyższy stopień organizacji, tzn. takich, w których glikogen występuje w postaci cząstek α lub większych, ma miejsce uporządkowana synteza i degradacja glikogenu. Te sugestie zostały potwierdzone w badaniach nad metabolizmem glikogenu tkanki tłuszczowej, w której glikogen występuje jedynie w formie cząstek β i nie obserwuje się uporządkowania jego syntezy i degradacji (151). Podobne zjawisko występuje również wtedy, gdy degradacja glikogenu przez lizosomalną glukozydazę przeważa nad jego fosforolitycznym rozkładem (152). Tak więc określona sekwencja zdarzeń związanych z syntezą i degradacją glikogenu ma miejsce jedynie wówczas gdy glikogen występuje w formie cząstek α lub ich polimerów, a w jego degradacji uczestniczy glikogenosomalna fosforylaza.

VI. Uwagi końcowe

Jakie konsekwencje dla struktury i metabolizmu glikogenu mogą wynikać z obecności w glikogenosomach związanego białka oraz w jaki sposób glikogen modeluje aktywność luźno związanych białek enzymatycznych i regulatorowych własnego metabolizmu?

Badając działanie enzymu rozgałęziającego stwierdzono, że wiązanie α -1,6-glukozydowe może być tworzone przez przeniesienie fragmentu oligosacharydowego w obrębie tego samego łańcucha lub też pomiędzy łań-

cuchami przez enzym rozgałęziający (124). Przy przeniesieniu fragmentu oligosacharydowego w 35°C pomiędzy dwoma różnymi łańcuchami oligosacharydowymi średni stopień polimeryzacji zarówno łańcucha akceptorowego jak i donorowego dla zabezpieczenia maksymalnej szybkości reakcji powinien wynosić około 40 reszt glukozy, natomiast w temperaturze 4°C około 20 reszt. Liniowe polimery glukozy tworzą przy odpowiednim stężeniu podwójną spiralę stabilizowaną międzyłańcuchowymi wiązaniami wodorowymi utworzonymi pomiędzy grupami -OH reszt glukozowych (125). Wydaje się, że taki układ mógłby stanowić doskonały substrat enzymu rozgałęziającego (126). Przestrzenne zagęszczenie liniowych polimerów glukozy *in vivo* może być zabezpieczone poprzez usytuowanie ich na nośniku białkowym. Jeśli na łańcuchu polipeptydowym znajduje się kilka miejsc, od których rozpoczyna się wydłużanie łańcuchów polisacharydowych (106, 109, 110), to stwarza sprzyjające warunki do utworzenia podwójnych spirali i tym samym odpowiednie warunki dla działania enzymu rozgałęziającego (126). Oczywiście nie jest konieczne, aby dwa łańcuchy na całej swej długości pozostawały w asocjacji ze sobą. Każdy z nich może ulegać odchyleniu kompleksując się z trzecim i następnymi, a przy wielu tysiącach reszt glukozowych istnieje możliwość powrotu do pierwotnego partnera. Powstaje sieć splecionych podwójnych spirali stabilizowana tysiącami wiązań wodorowych (126). Obecność takich lewoskrętnych podwójnych spirali wykazano w krystalicznej części skrobi (127, 129, 130) oraz w amylodekstrynach (128). Tym sposobem strukturalny polipeptyd mógłby niejako determinować przestrzenne ułożenie łańcuchów polisacharydowych w glikogenie. Po zakończonej syntezie wielocukier mógłby zostać oddzielony od białka przez endoglikozydazy, co nie wpłynęłoby już istotnie na kształt ani na wielkość uformowanych cząsteczek glikogenu.

Właściwości glikoproteiny izolowanej z glikogenu mięśniowego (109, 110) pozwalają przypuszczać, że jej synteza przebiega w pierwszym etapie podobnie jak synteza glikoprotein błon (123, 132). Przyłączanie reszt glukozy mogłoby zachodzić przy udziale syntetazy glikogenowej lub też w pierwszym etapie przy udziale transfery UDPG : białko. Ten proces odbywa się prawdopodobnie w gładkim retikulum (133, 134). Dołączenie rozgałęzionych łańcuchów składających się z wielu tysięcy reszt glukozy mogłoby powodować, że nierozpuszczalne białko retikulum sarkoplazmatycznego nabierałoby w całości lub przeważającej części charakteru hydrofilowego. Na tym etapie zachodziłaby możliwość odłączenia części wielocukrowej przez swoiste endoglikozydazy powodując przemieszczenie glikogenu do cytosolu. W przypadku, gdy część wielocukrowa jest stosunkowo mała, np. w podjednostkach β hydrofobowy fragment łańcucha polipeptydowego mógłby przytrzymywać glikogen w pobliżu błony retikulum. Na taką możliwość wskazuje umiejscowienie glikogenosomów w komórkach mięśniowych (11, 135—139). W mięśni sercowym i szkie-

letowym występowanie glikogenosomów w pobliżu retikulum sarkoplazmatycznego może mieć szczególne znaczenie fizjologiczne. Błony retikulum sarkoplazmatycznego odgrywają decydującą rolę w prawidłowej pracy włókien mięśniowych. Ich znaczenie polega na regulacji poziomu wapnia w czasie cyklu skurczowo-rozkurczowego (89). Równocześnie, jony wapnia wyzwalają fosforolizę glikogenu poprzez aktywację kinazy fosforylazy, czyli — inaczej mówiąc — wyciek jonów wapnia z retikulum nie tylko wywołuje skurcz włókien mięśniowych ale równocześnie uruchamia degradację glikogenu. Wraz ze skurczem mięśnia obserwuje się w mikroskopie elektronowym przesunięcie cystern retikulum w kierunku linii M. Towarzyszy temu zbliżenie glikogenosomów również do linii M (140). Ostatnio wykazano, że we włóknach mięśniowych wszystkich typów skurczowi towarzyszy degradacja glikogenu (141). Tak więc interakcja glikogenu z enzymami biorącymi udział w jego metabolizmie, a także interakcja glikogenosomów z retikulum poprzez silnie związane z glikogenem białko prowadzi do kompartmentacji źródła energii, jakim jest glikogen z miejscem jej wykorzystania przez aparat kurczliwy. Stwierdzenie to znajduje poparcie w równoczesnym wpływie cAMP na gospodarkę wapniową komórek mięśniowych i na przemianę glikogenu (138, 142, 143). Należy jednak pamiętać, iż niektórzy autorzy uważają obecność glikogenosomów w izolowanych frakcjach retikulum z mięśni szkieletowych za artefakt wynikający z metod preparacji (144). Dodatkowych przykładów funkcjonalnego związku glikogenosomów z retikulum dostarczają badania nad komórkami wiciowymi jajowodów (145) oraz hepatocytami (146, 147), w których glikogenosomy występują również w miejscach wymagających dostarczenia energii.

W świetle omówionych powyżej faktów rola białek zarówno luźno jak i trwale związanych z glikogenem nabiera szczególnego znaczenia dla wyjaśnienia procesów związanych z jego metabolizmem. Nasuwające się wnioski można by ująć w następujących punktach:

1. W komórkach glikogen występuje w kompleksie z białkami, które łatwo daje się oddysocjować od wielocukru. Są to enzymy metabolizmu glikogenu oraz białka regulatorowe.
2. Aktywność enzymów glikogenosomalnych modulowana jest w nieco inny sposób niż aktywność tych samych enzymów w formie wolnej.
3. Integralnym składnikiem glikogenosomów z mięśni szkieletowych może być specyficzne białko kowalencyjnie, lub na zasadzie bardzo silnego powinowactwa, związane z glikogenem.
4. Białko to może być czynnikiem determinującym przestrzenną strukturę glikogenu, odpowiadać za formowanie glikogenosomów i ich umiejscowienie w komórce, a także pośrednio być odpowiedzialne za uporządkowaną syntezę i degradację glikogenu w obrębie glikogenosomów.

5. Glikogenosomy w mięśniach znajdują się w pobliżu retikulum sarkoplazmatycznego, co w powiązaniu z regulacyjną funkcją jonów wapnia może sprzęgać w tym samym przedziale wewnątrzkomórkowym skurcz mięśniowy z procesem fosforolizy.

Zaakceptowano do druku 28.12.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Maley F., McGarrah J. F., Del Giacco R., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 85—91.
2. Parodi A. J., Krisman C. R., Mordoh J., Leloir L. F., (1967), *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 769—778.
3. Fontana J. D., (1980), *FEBS Lett.*, **109**, 85—92.
4. Thomas P., Chambost J. P., (1978), *Biol. Cell.*, **33**, 235—242.
5. Drochmans P., (1962), *J. Ultrastructure Res.*, **6**, 141—163.
6. Orrell S. A., Bueding E., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 4021—4026.
7. Parodi A. J., (1967), *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 547—552.
8. Geddes R., Harvey J. D., (1977), *Biochem. J.*, **163**, 201—209.
9. Drochmans P., Dantan E., (1968), w *Control of Glycogen Metabolism* wyd. Whelan W. J., 187—201, Acad. Press, London, New York.
10. Krebs E. G., Love D. S., Bratcold G. E., Trayser K. A., Meyer W. L., Fischer E. H., (1964), *Biochemistry*, **3**, 1022—1033.
11. Meyer F., Heilmeyer L. M. G., Haschke R. H., Fischer E. H., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6642—6647.
12. Opperdoes F. R., Borst P., (1977), *FEBS Lett.*, **80**, 360—364.
13. Taylor C., Cox A. J., Kernohan J., Cohen P., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **51**, 105—115.
14. Caudwell B., Antoniow J. F., Cohen P., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **86**, 511—518.
15. Satoh K., Sato K., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 28—33.
16. Nimmo H. G., Cohen P., (1977), *Adv. Cycl. Nucleotide Res.*, **8**, 145—266.
17. Krebs E. G., Beavo J. A., (1979), *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 923—959.
18. Friedman D. L., Larner J., (1963), *Biochemistry*, **2**, 669—675.
19. Rosell-Perez M., Larner J., (1964), *Biochemistry*, **3**, 773—778.
20. Roach P. J., Takeda Y., Larner J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1913—1919.
21. Nimmo H. G., Proud C. G., Cohen P., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **68**, 31—44.
22. Schlender K. K., Wer S. H., Villar-Palasi C., (1969), *Biochem. Biophys. Acta*, **191**, 272—278.
23. Soderling T. R., Hickenbottom J. P., Reimann E. M., Hunkler F. L., Walsh D. A., Krebs E. G., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6317—6328.
24. Embi N., Parker P. J., Cohen P., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **115**, 405—413.
25. Schlender K. K., Reimann E. M., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2197—2201.

26. Itarte E., Robinson J. C., Huang K. P., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1231—1234.
27. Soderling T. R., Jett M. F., Hutson N. J., Khatra B. S., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7517—7524.
28. Nimmo H. G., Cohen P., (1974), *FEBS Lett.*, **47**, 162—166.
29. Nimmo H. G., Cohen P., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **68**, 31—44.
30. Cohen P., (1978), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **14**, 117—196.
31. Roach P. J., De Paoli-Roach A. A., Larner J., (1978), *J. Cycl. Nucl. Res.*, **4**, 245—257.
32. Srivastava A. K., Waisman D. M., Broström C. O., Soderling T. R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 583—586.
33. Soderling T. R., Srivastava A. K., Bass M. A., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2536—2540.
34. Walsh K. X., Milikin D. M., Schlender K. K., Reimann E. M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6611—6616.
35. Embi N., Rylatt D. B., Cohen P., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **100**, 339—347.
36. Rylatt D. B., Embi N., Cohen P., (1979), *FEBS Lett.*, **98**, 76—80.
37. Appleman M. M., Belocopitow E., Torres H. N., (1964), *Biochem. Biophys. Acta*, **14**, 550—554.
38. Belocopitow E., Appleman M. M., Torres H. N., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 3473—3478.
39. Takeda Y., Larner J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8951—8956.
40. Soderling T. R., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4359—4364.
41. Huang T. S., Krebs E. G., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 643—650.
42. Proud C. G., Rylatt D. B., Yeaman S. J., Cohen P., (1977), *FEBS Lett.*, **80**, 435—442.
43. Parker P. J., Aitken A., Bilham T., Embi N., Cohen P., (1981), *FEBS Lett.*, **123**, 332—336.
44. Rylatt D. B., Embi N., Cohen P., (1979), *FEBS Lett.*, **98**, 71—75.
45. Embi N., Parker P. J., Cohen P., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **115**, 405—413.
46. Rylatt D. B., Aitken A., Bilham T., Condon G. D., Embi N., Cohen P., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **107**, 529—537.
47. Fischer E. H., Krebs E. G., (1955), *J. Biol. Chem.*, **216**, 121—132.
48. Sutherland E. W., Wosilait W. D., (1955), *Nature (London)*, **175**, 169—171.
49. Busby S. J. W., Radda G. K., (1976), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **10**, 89—160.
50. Huang T.-S., Krebs E. G., (1979), *FEBS Lett.*, **98**, 66—70.
51. Krebs E. G., Kent A. B., Fischer E. H., (1958), *J. Biol. Chem.*, **231**, 73—83.
52. Cori G. T., Cori C. F., (1945), *J. Biol. Chem.*, **158**, 321—322.
53. Jennissen H. P., Heilmeyer L. M. G., (1974), *FEBS Lett.*, **42**, 77—80.
54. Kishimoto A., Takai Y., Nishizuka Y., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7449—7452.
55. Cohen P., Burchell A., Foulkes J. G., Cohen P. T. W., (1978), *FEBS Lett.*, **92**, 287—293.
56. Cohen P., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **34**, 1—14.
57. Means A. R., Dedman J. R., (1980), *Nature*, **285**, 73—77.

58. Walsh D. A., Perkins J. P., Broström C. O., Ho E. S., Krebs E. G., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1968—1976.
59. Huston R. B., Krebs E. G., (1968), *Biochemistry*, **7**, 2116—2122.
60. Broström C. O., Hunkler F. L., Krebs E. G., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1961—1967.
61. Heilmeyer L. M. G., Meyer F., Haschke R. H., Fischer E. H., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6649—6656.
62. Yeaman S. J., Cohen P., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **51**, 93—104.
63. Cohen P., (1974), *Biochem. Soc. Symp.*, **39**, 51—73.
64. Cohen P., Antoniow J. F., (1973), *FEBS Lett.*, **34**, 43—47.
65. Villar-Palasi C., (1969), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **166**, 719—730.
66. England R. J., Stull J. T., Krebs E. G., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5275—5277.
67. Zieve F. J., Glinsman W. H., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 872—878.
68. Nakai C., Thomas J. A., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 530—536.
69. Tan A. W. H., Nutall F. Q., (1978), *Biochem. Biophys. Acta*, **522**, 139—150.
70. Stalmans W., Laloux M., Hers H. G., *Eur. J. Biochem.*, **49**, 415—427.
71. Tamura S., Kikuchi H., Kikuchi K., Hiraga A., Tsuiki S., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 347—355.
72. Yang S.-D., Vandenheede J. R., Goris J., Merlevede W., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11759—11767.
73. Laloux M., Stalmans W., Hers H. G., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 15—24.
74. Vandenheede J. R., Yang S. D., Merlevede W., (1981), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5894—5900.
75. Burchel A., Cohen P., (1978), *Biochem. Soc. Trans.*, **6**, 220—222.
76. Vandenheede J. R., Yang S. D., Goris J., Merlevede W., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11768—11774.
77. Antoniow J. F., Nimmo H. G., Yeaman S. J., Cohen P., (1977), *Biochem. J.*, **162**, 423—433.
78. Cohen P., Nimmo G. A., Burchel A., Antoniow J. F., (1978), *Adv. Enzyme Regul.*, **16**, 97—119.
79. Brandt M., Killilea S. D., Lee E. Y. C., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 598—604.
80. Brandt M., Lee E. Y. C., Killilea S. D., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 950—956.
81. Gergely P., Bot G., (1977), *FEBS Lett.*, **82**, 326—329.
82. Huang F. L., Glinsman W. H., (1976), *FEBS Lett.*, **62**, 326—329.
83. Huang F. L., Glinsman W. H., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **70**, 419—426.
84. Nimmo G. A., Cohen P., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **87**, 353—356.
85. Van de Werve G., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 1323—1329.
86. Shimazu T., Amakawa A., (1975), *Biochem. Biophys. Acta*, **385**, 242—256.
87. Khoo J. C., Steinberg W., (1975), *FEBS Lett.*, **57**, 68—72.
88. Van de Werve G., Hue L., Hers H. G., (1977), *Biochem. J.*, **162**, 135—142.

89. Ebashi S., (1974), *Essays Biochem.*, **10**, 1—36.
90. Rasmussen H., Goodman D. B. P., (1977), *Physiol. Rev.*, **57**, 421—508.
91. Nicholls D. G., (1978), *Biochem. J.*, **176**, 463—474.
92. Brandt M. D., De Selincourt C., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 1377—1382.
93. Fischer E. H., Heilmeyer L. M. G., Haschke R. H., (1971), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **4**, 211—249.
94. Busby S. J. W., Radda G. K., (1976), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **10**, 89—160.
95. Heschke R. H., Heilmeyer L. M. C., Meyer F., Fischer E. H., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6657—6663.
96. Dopere F., Vansapel F., Stalmans W., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 137—146.
97. Danforth W. H., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 588—593.
98. Malthus R., Clark D. G., Watts C., Sneyd J. G. I., (1980), *Biochem. J.*, **188**, 99—106.
99. Watts R. S., Malthus R. S., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **108**, 73—77.
100. Stalmans W., DeWulf H., Hers H. G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **582**—587.
101. Laloux M., Hers H. G., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 762—768.
102. Stalmans W., DeWulf H., Hue L., Hers H. G., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 127—134.
103. Sobrino F., Hers H. G., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **109**, 239—246.
104. Wititsuwannakul D., Kim K. H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3562—3569.
105. Willstätter R., Rhodewald M., (1934), *Z. Physiol. Chem.*, **225**, 103—124.
106. Krisman C., Barengo R., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **52**, 117—123.
107. Łomako J., (1971), *Acta Biochim. Polon.*, **18**, 261—269.
108. Łomako J., Strzadała J., Mejbaum-Katzenellenbogen W., (1981), *Zool. Polon.*, **28**, 205—211.
109. Łomako J., Smith E. E., Whelan W. J., (1977), *XIth Congress Biochem.*, Toronto, Abstracts, 207.
110. Łomako J., Kennedy L., Smith E. E., Whelan W. J., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (w druku).
111. Whelan W. J., (1976), *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 13—15.
112. Chee N. P., Geddes R., (1977), *FEBS Lett.*, **73**, 164—166.
113. Geddes R., Stratton G. C., (1977), *Carbohydr. Res.*, **57**, 164—166.
114. Butler N. A., Lee E. Y. C., Whelan W. J., (1977), *Carbohydr. Res.*, **55**, 73—82.
115. Siegel S., Brady A. M., Awad W. M. J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4155—4159.
116. Geddes R., Harwey J. D., Wills P. R., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **81**, 465—472.
117. Jentoff N., Dearboorn D. G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4359—4365.
118. Cori G. T., Swanson M. A., Cori C. F., (1945), *Fed. Proc.*, **4**, 234—241.
119. Whelan W. J., (1971), *Biochem. J.*, **122**, 609—622.
120. Salsas E., Larner J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1833—1837.

121. Barengo R., Flavia M., Krisman C. R., (1975), *FEBS Lett.*, **53**, 274—278.
122. Lavintman N., Tendecarz J., Carceller M., Mendiara S., Cardini C. E., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **50**, 145—155.
123. Takahara H., Matsuda K., (1977), *J. Biochem.*, **81**, 1587—1594.
124. Borovsky D., Smith E. E., Whelan W. J., (1976), *J. Biochem.*, **62**, 307—312.
125. French D., (1972), *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **19**, 8—25.
126. Whelan W. J., (1976), *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **23**, 101—115.
127. Kainuma K., French D., (1972), *Biopolymers*, **11**, 2241—2250.
128. Umeki K., Kainuma K., (1981), *Carbohydr. Res.*, **96**, 143—159.
129. Wu H. C. H., Sarko A., (1978), *Carbohydr. Res.*, **61**, 7—25.
130. Wu H. C. H., Sarko A., (1978), *Carbohydr. Res.*, **61**, 27—40.
131. Staneloni R. J., Leloir L. F., (1978), *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 65—67.
132. Struck D. K., Lennarz W. J., (1980), w *Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, wyd. Lennarz W. J., Plenum Press, 35—83.
133. Berthillier G., Azzar G. J. C., Got R., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **51**, 275—282.
134. Frost-Coutaz J., Berthillier G., Got R., (1975), *FEBS Lett.*, **52**, 81—84.
135. Rybicka K., (1979), *Virchows Arch. B. Cell. Pathol.*, **30**, 335—347.
136. Rybicka K., (1981), *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 4—8.
137. Rybicka K., (1981), *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 553—560.
138. Entman M. Z., Kaniike K., Goldstein M. A., Nelson T. E., Bor-net E. P., Futch T. W., Schwartz A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3140—3146.
139. Entman M. L., Bor-net E. P., Garber A. J., Schwartz A., Le-vey G. S., Lechotay D. C., Bricker L. A., (1977), *Biochem. Biophys. Acta*, **499**, 228—237.
140. Bergamini E., Moruzzi E. V., Bergamini Z. G., (1980), *Bull. Molec. Biol. Med.*, **5**, 19—23.
141. Moruzzi E. V., Bergamini E., Bergamini Z. G., (1981), *Pflügers Arch.*, **391**, 338—342.
142. Wray H. L., Gray R. R., Olsson R. A., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1496—1498.
143. Schwartz A., Entman M. L., Kaniike K., Lane L., VanWin-kle W. B., Bor-net E. P., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 57—72.
144. Michalak M., Sarzała M. G., Drabikowski W., (1977), *Acta Biochim. Polon.*, **24**, 105—116.
145. Schram U., Kühnel W., (1981), *Biomed. Res.*, **2**, 4—10.
146. Cardell R. R. Jr., (1977), *Int. Rev. Cytol.*, **48**, 221—279.
147. Striffler J. S., Cardell E. L., Cardell R. R. Jr., (1981), *Am. J. Anat.*, **160**, 363—379.
148. Devos P., Hers H. G., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **99**, 161—167.
149. Devos P., Hers H. G., (1974), *Biochem. J.*, **140**, 331—340.
150. Clark D. G., Neville S. D., Brinkman M., Filsell O. H., (1982), *Biochem. J.*, **202**, 623—629.
151. Devos, Hers H. G., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1031—1038.
152. Devos P., Hers H. G., (1980), *Biochem. J.*, **192**, 177—181.
153. Laskov R., Gross J., (1965), *Israel J. Med. Sci.*, **1**, 26—42.

154. Picton C., Aitken A., Bilham T., Cohen P., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **124**, 37—45.
155. Cohen P., Yellowlees D., Aitken A., Donella-Deana D., Hemmings B. A., Parker P. J., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **124**, 21—35.

Składam podziękowanie Prof. dr W. Mejbaum-Katzenellenbogen za pomoc i uwagi w trakcie pisania tej pracy.

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT *)

Molekularne mechanizmy oporności komórek na antyfoliany

Molecular Mechanisms of Cellular Resistance to Antifolates

Spis treści

- I. Wprowadzenie, oporność wrodzona i nabyta
- II. Wzmoczona synteza reduktazy dihydrofolianowej
 - II-1. Zwiększenie liczby kopii genu reduktazy dihydrofolianowej
 - II-2. Umieszczenie zwiększonego genu reduktazy dihydrofolianowej a stabilność oporności
 - II-3. Struktura genu i mRNA reduktazy dihydrofolianowej
- III. Zmieniona reduktaza dihydrofolianowa
- IV. Upośledzenie transportu antyfolianów
- V. Uwagi końcowe.

Contents

- I. Introduction, intrinsic and acquired resistance
- II. Overproduction of dihydrofolate reductase
 - II-1. Amplification of the dihydrofolate reductase gene
 - II-2. Location of amplified dihydrofolate reductase gene and stability of resistance
 - II-3. Organisation of dihydrofolate reductase gene and mRNA
- III. Altered dihydrofolate reductase
- IV. Impairment of antifolate transport
- V. Concluding remarks

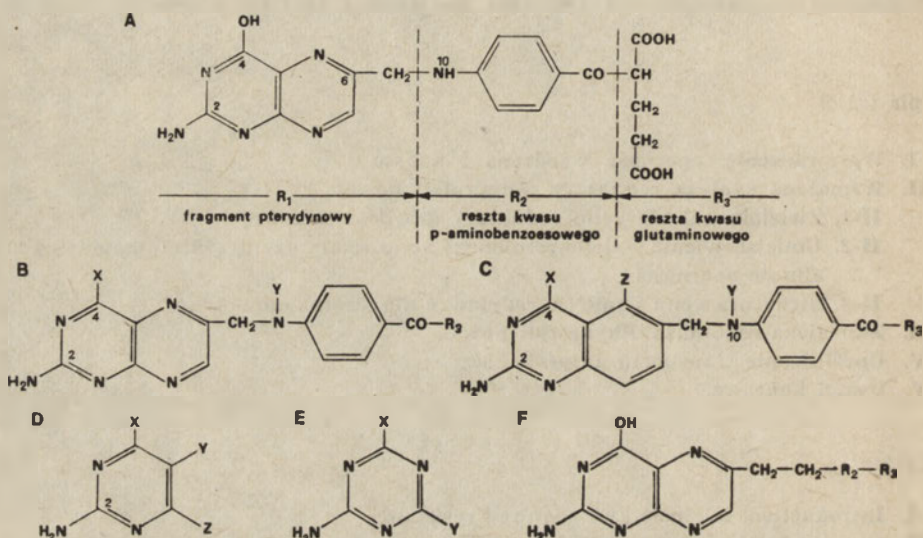
I. Wprowadzenie, oporność wrodzona i nabyta

Poczynając od późnych lat czterdziestych zsyntetyzowano szereg różnych strukturalnie analogów folianu, w skrócie nazywanych antyfolianami, z myślą o stosowaniu ich w terapii niektórych chorób bakteryjnych i nowotworowych. Spośród antyfolianów aminowe analogi folianu,

*) Doc. dr hab., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

a zwłaszcza ametoptyryna (MTX, metotreksat) stosowane są jako silne cytostatyki w leczeniu guzów litych i niektórych białaczek. W odróżnieniu od analogów puryn, pirymidyn i ich nukleozydów antyfoliany nie są inkorporowane do kwasów nukleinowych, a w związku z tym nie przejawiają właściwości kancerogennych.

Na Ryc. 1 podano strukturalny wzór folianu (A) oraz ogólne wzory antyfolianów, takich jak analogi aminowe (B, aminopteryna, ametoptyryna), chinazolinowe (C, np. metaskwin, JB 11, CB 3717), pirymidynowe (D, np. trimetoprim, daraprim, DDMP), trójazynowe (E, np. analog Bakera-TZT) i homofoliany (F).



Ryc. 1. Wzory folianu i antyfolianów:

A — folian, B — aminofoliany, C — antyfoliany chinazolinowe, D — antyfoliany pirymidynowe, E — antyfoliany trójazynowe, F — homofoliany.

W przemianach aktywnych koenzymatycznych form folianu oraz w ich wykorzystaniu w licznych procesach biosyntetycznych uczestniczy kilkanaście enzymów (1). Cytotoksyczne działanie większości antyfolianów przypisuje się jednak przede wszystkim ich interakcji w komórce z reduktazą dihydrofolianową^{*)} (2—6). Tylko działanie chinazolinowych antyfolianów polega na hamowaniu dwóch enzymów — reduktazy dihydrofolianowej i syntetazy tymidylanowej^{**)}, a jeden z nowych antyfolianów chinazolinowych, badany już wstępnie w klinice, działa tylko jako inhibitor syntetazy tymidylanowej.

^{*)} Oksydoreduktaza 5,6,7,8-tetrahydrofolian : NADP (1.5.1.4).

^{**)} C-metylotransferaza 5,10-metylenotetrahydrofolian : dezoksyurydino-5-mono-fosforan (2.1.1.45).

W wyniku działania antyfolianów obniża się wewnątrzkomórkowa pula zredukowanych pochodnych folianowych (ale dopiero po zahamowaniu 95%—99% aktywności reduktazy dihydrofolianowej) (7) a w konsekwencji ulega zaburzeniom biosynteza szeregu aminokwasów i nukleotydów, co prowadzi do śmierci komórek. Tym cytotoksycznym efektem antyfolianów, a zwłaszcza obserwowanej *in vivo* mielosupresji i toksyczności w stosunku do układu pokarmowego zapobiega podanie koenzymów folianowych, a także kombinacji puryn i tymidyny (np. 8—12). Mechanizmom działania aminoanalogów folianu i sposobom przeciwdziałania ich niekiedy także i niepożądanym efektem poświęcono bardzo wiele prac i artykułów (np. 6, 13—17), ukazały się też na ten temat opracowania przeglądowe w języku polskim (18—20).

Efektywność działania antyfolianów, a w szczególności ametoptyryny, zależy od jej transportu do komórek, poziomu i właściwości enzymu docelowego (a zwłaszcza powinowactwa do inhibitora), od przemian metabolicznych samej ametoptyryny, wielkości puli kofaktorów folianowych w komórce, a także od intensywności biosyntezy DNA (6). Komórki nie dzielące się (21—23), jak też poddane uprzednio działaniu fluorodezoksypirymidyn w celu zahamowania w nich syntezy *de novo* tymidylanu (24, 25), stają się stosunkowo mało wrażliwe na działanie ametoptyryny.

Skuteczność chemioterapii przy zastosowaniu antyfolianów limituje jednak szereg czynników (26). Wymienię tu przede wszystkim brak selektywności, to jest toksyczność zarówno wobec nowotworowych jak i szybko dzielących się komórek prawidłowych. Ogranicza ją także, w przypadku nowotworów mózgu, przy użyciu antyfolianów w dawkach konwencjonalnych, brak penetracji przez barierę mózg-krew. Szczególną trudność w chemioterapii stanowi obserwowana często oporność komórek nowotworowych na podawane antyfoliany. Zdarza się przy tym, że komórki są niewrażliwe na antyfolian podany po raz pierwszy: mówimy wówczas o oporności wrodzonej. Częściej jednak oporność pojawia się, zarówno *in vivo* i *in vitro*, po dłuższym stosowaniu leku i określamy ją wówczas jako oporność nabytą.

Oporność wrodzona na działanie antyfolianów charakteryzuje szereg zwierzęcych i ludzkich nowotworów (26—29), a podłoża jej mogą być bardzo różne. W przypadku niektórych białaczek mysich (30) i ludzkich (31) wykazano *in vivo* ścisłą zbieżność pomiędzy szybkością transportu ametoptyryny do komórek a kliniczną odpowiedzią na ten antyfolian organizmu obarczonego nowotworem. Mało efektywny transport ametoptyryny do komórek raka Walkera 256 *in vivo* stanowi także o jego niewielkiej wrażliwości na ten aminoanalog folianowy (32, 33). Nie uważano natomiast, ażeby poziom reduktazy dihydrofolianowej, jako enzymu docelowego, określał stopień wrażliwości na antyfoliany na przykład mysich komórek białaczkowych P329 (34, 35). Jednakże w odróż-

nieniu od nowotworów mysich, niewrażliwość na ametoptynę komórek ludzkiej białaczki mielocytarnej o ostrym przebiegu (AML) wydaje się mieć związek z szybkością syntezy reduktazy dihydrofolianowej w mieloblastach i szybkim wypływem ametoptyny z komórek po usunięciu jej ze środowiska (27, 36).

Porównano w rosnących *in vitro* komórkach, kilku mysich linii nowotworowych o różnej wrodzonej oporności na ametoptynę, szereg różnych parametrów biochemicznych. Stwierdzono, że im wyższą wartością K_i dla ametoptyny (a więc słabszym powinowactwem enzymu do analogu) charakteryzowała się reduktaza dihydrofolianowa izolowana z badanych komórek, tym bardziej były one odporne na badany antyfolian (37). Nie zaobserwowano natomiast, by różniły się one poziomem aktywności reduktazy dihydrofolianowej czy syntetazy tymidylanowej, intensywnością pobierania ametoptyny lub wyższą zawartością zredukowanych pochodnych folianowych (37) i nukleotydów tyminowych (38).

Oporność nabyta na antyfoliany stanowi przedmiot bardzo licznych badań. Jako podstawowe mechanizmy odpowiedzialne za jej pojawienie się, występujące „pojedynczo” lub w niektórych komórkach łącznie, traktuje się: wzmożoną syntezę reduktazy dihydrofolianowej o właściwościach enzymu z komórek wrażliwych, syntezę reduktazy dihydrofolianowej o właściwościach zmienionych w porównaniu z enzymem z komórek wrażliwych oraz upośledzenie transportu antyfolianów do wnętrza komórek.

W komórkach opornych na antyfoliany stwierdza się niekiedy również zmiany aktywności syntetazy tymidylanowej (39).

W dalszych częściach artykułu zamierzam omówić te właśnie molekularne mechanizmy oporności oraz wskazać na pewne anomalie chromosomalne towarzyszące temu zjawisku. Nie poruszę natomiast innych przyczyn niewrażliwości komórek na antyfoliany, takich jak ograniczona dostępność antyfolianu do komórek wynikająca na przykład z niedostatecznego ukrwienia nowotworu, czynniki obronne organizmu czy też różne zagadnienia farmakodynamiczne. Zagadnienia te omawiają liczne artykuły przeglądowe (np. 4, 26, 40, 41).

II. Wzmożona synteza reduktazy dihydrofolianowej, jej mRNA i zwielokrotnienie genu

Wzmożenie syntezy reduktazy dihydrofolianowej w komórkach poddanych działaniu antyfolianów jest najpowszechniej spotykanym mechanizmem powstawania ich oporności. Chociaż zjawisko to wykryto już na początku lat sześćdziesiątych (42), to nadal jest ono intensywnie badane w różnych układach biologicznych (43—51). W większości komórek opornych na antyfoliany, przy proporcjonalnym do stopnia oporności na anty-

folian wzroście ilości enzymu, nie obserwuje się na ogół zmian jego właściwości. I tak porównując na przykład właściwości reduktaz dihydrofolianowych oczyszczonych z macierzystych wrażliwych komórek S-180 (42), KB (52), HeLa-BU25 i VA₂-B (53) i z ich pochodnych, komórek opornych na ametoptyerynę, nie wykazano ani znaczących różnic w ruchliwości elektroforetycznej, wielkości ciężaru cząsteczkowego, ani w stopniu powinowactwa do substratów, do ametoptyeryny a także innych antyfolianów.

W ostatnich latach doniesiono jednak także o zwiększonej syntezie zmienionej reduktazy dihydrofolianowej w chemicznych komórkach hodowanych *in vitro*, w których wytworzono oporność na ametoptyerynę (49, 54) (porównaj rozdział III).

Ilość reduktazy dihydrofolianowej syntetyzowana w komórkach opornych na antyfoliany może być bardzo duża. Tak na przykład w opornych na ametoptyerynę mysich komórkach S-180 stanowi ona 6—7% rozpuszczalnych białek komórkowych (55), a w komórkach jednej z opornych linii chemicznych ilość jej dochodzi nawet do 30% (56). Tak olbrzymi wzrost ilości „fizjologicznego” inaktywatora ametoptyeryny, jakim jest reduktaza dihydrofolianowa powoduje, że komórki odporne mogą przeżywać w środowisku zawierającym antyfolian nawet w bardzo wysokich stężeniach, rzędu 10^{-4} — 10^{-3} M, podczas gdy komórki wrażliwe giną już przy stężeniach antyfolianów o sto tysięcy razy niższych.

II-1. Zwielokrotnienie genu reduktazy dihydrofolianowej

W komórkach opornych na ametoptyerynę lub jeden z analogów chinazolinowych folianu, metaskwin, zwiększenie ilości reduktazy dihydrofolianowej, nieraz kilkusetkrotne, wynika ze zwiększenia w nich ilości mRNA tego enzymu (55—61). Tak na przykład mRNA reduktazy dihydrofolianowej w opornych na ametoptyerynę komórkach jednej z linii wyprawionej z jajnika chomika chińskiego stanowi aż 25% ogólnej ilości mRNA ulegającego translacji *in vitro* (56). Wzrost ilości mRNA reduktazy jest następstwem zwielokrotnienia w komórkach odpowiedniego genu (57, 62—66). W tablicy 1 zestawiono przykłady komórek, w których stwierdzono zbieżność zmian omawianych powyżej parametrów. Chociaż o zwielokrotnieniu genu reduktazy dihydrofolianowej mówi się już od 1978 r., to mechanizm tego zjawiska jest nadal dyskusyjny. Rozważane są takie możliwości jak nierównomierna wymiana chromatyd siostrzanych, pobieranie przez komórki fragmentów DNA z martwych komórek czy też nieproporcjonalna replikacja (63, 66).

Pojawianie się w populacji komórek wrażliwych pewnej liczby komórek opornych na antyfolian nie jest zjawiskiem częstym (np. w popu-

Tablica 1.

Przykłady zbieżności poziomu aktywności reduktazy dihydrofolianowej, stopnia zwiększenia ilości mRNA i zwielokrotnienia jej genu w mysich i chemicznych komórkach opornych na ametoptyerynę lub chinazolinowy antyfolian, metaskwin*).

Komórki	Aktywność reduktazy dihydrofolianowej	mRNA reduktazy dihydrofolianowej	Liczba kopii genu reduktazy dihydrofolianowej	Piśmiennictwo
mysiej sarkomy S-180 (AT3000)	250	220	180	(55,57)
mysiej limfomy L5178Y-R	300	300	300	(65)
L5178Y-RR	35	35	45	(57)
jajnikowe chomika chińskiego CHO-MK42	240	ND	150	(62)
płucne chomika chińskiego DC-35/A3	170	172	52	(61)
DC-3F/MQ19*)	150	122	120	(61)

*) Poziom aktywności enzymu, zawartości mRNA i liczby kopii genów reduktazy dihydrofolianowej podano jako wartości względne w odniesieniu do wyjściowych komórek wrażliwych.

lacji mysich fibroblastów 3T6 hodowanych w obecności ametoptyeryny w stężeniu 10^{-7} M częstotliwość pojawiania się komórek opornych jest rzędu $3-4 \times 10^{-7}$; 67). W 1981 roku wykazano jednak,**) że znany kokancerogen, octan forbolu (13-octan-12-0-tetradekanoylo-forbol, TPA), a także hormon taki jak insulina silnie zwiększają częstotliwość powstawania komórek opornych na ametoptyerynę w populacji hodowanych *in vitro* fibroblastów 3T6 (67). Co więcej, ich oporność na ametoptyerynę wynikała ze zwielokrotnienia w nich genu kodującego reduktazę dihydrofolianową. Obserwacja ta jest bardzo ważna z punktu widzenia chemioterapii, gdyż nie można wykluczyć, że także *in vivo* niektóre hormony, czy też substancje egzogenne typu niektórych kokancerogenów, mogą wywierać podobne działanie. Powstaje pytanie, czy związki przeciwdziałające niektórym efektom kokancerogenów, na przykład witamina A, zastosowane jednocześnie z antyfolianem mogą choćby częściowo zapobiegać zwiększeniu częstotliwości mutacji warunkującej oporność na zastosowany antyfolian.

Należy podkreślić, że zwielokrotnienie genów prowadzące do zintensyfikowania syntezy enzymów docelowych może zachodzić także pod

**) patrz — porównaj Nowe w Biochemii: B. Grzelakowska-Sztabert, (1982), Postępy Biochemii, 28, 391—393.

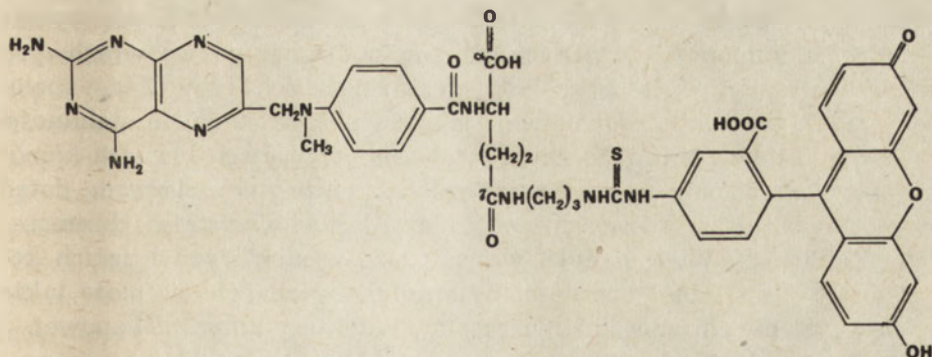
wpływem innych niż antyfoliany leków i związków (Tablica 2); jest także procesem fizjologicznym spotykanym na przykład u owadów w czasie syntezy białek chorionu podczas oogenezy (78, 79), czy też podczas syntezy niektórych białek mięśniowych (80, 81).

Tablica 2.

Przykłady produktów zwielokrotnienia genów w komórkach zwierzęcych hodowanych *in vitro* przez inne niż antyfoliany antymetabolity i związki egzogenne.

Komórki	Czynnik indukujący	Produkt zwielokrotnionego genu	Piśmienictwo
jajnikowe chomika chińskiego transformowane wirusem SV40	hydroksymocznik	reduktaza rybonukleotydomowa (1.17.4.1)	68,69
chomika syryjskiego mysiej T-limfomy (S 49)	pALA (N-fosforoacetylo) — L-asparaginian	{ syntetaza karbamoilofosforanowa (2.7.2.5), karbamoiltransferaza asparaginianowa (2.1.3.2), dwuhydroorotaza (3.5.2.3)	70,72
płucne chomika chińskiego	6-azaurydyna	fosforybozylotransferaza orotydyno-5'-fosforanowa (2.4.2.10)	73
	pyrazofuryna (3-β-D-rybofuranozylo-4-hydroksypyrazolo-5-karboksamid)	dekarboksylaza orotydyno-5'-fosforanowa (4.1.1.23)	74
jajnikowe chomika chińskiego	β-aspartylo — α-hydroksamat	syntetaza asparaginianowa (6.3.1.1)	75
jajnikowe chomika chińskiego	α-metylo i α-difluorometyloornityna	dekarboksylaza ornitynowa (4.1.1.17)	76
jajnikowe chomika chińskiego	25-hydroksycholesterol	reduktaza hydroksymetyloglutarylo — CoA (1.1.1.34)	77

Zmiany ilości reduktazy dihydrofolianowej w komórkach, będące odzwierciedleniem stopnia zwielokrotnienia genu *dhfr*, można śledzić przy pomocy kompleksu ametopteryny z fluoresceiną (Ryc. 2) i oceniać ilościowo w aparacie segregującym komórki na podstawie intensywności ich



Ryc. 2. Wzór kompleksu ametopteryny z fluoresceiną (82).

fluorescencji (FACS; fluorescence activated cell sorter; 83). W laboratorium dr Schimke w Stanford, USA, odkrywcy zwielokrotnienia genu reduktazy dihydrofolianowej, metodę tę stosuje się rutynowo wraz z metodami inżynierii genetycznej do badań stabilności oporności komórek na antyfoliany. Po przeniesieniu bowiem komórek opornych do środowiska nie zawierającego selekcjonującego antyfolianu lub po zaprzestaniu terapii antyfolianem obserwuje się niejednokrotnie zanikanie ich nabytej oporności.

II-2. Umiejscowienie zwielokrotnionego genu reduktazy dihydrofolianowej a stabilność oporności

Komórki o nietrwalej oporności na antyfoliany wyprowadzone z mysich (66, 84—89), chemicznych (87) czy też ludzkich komórek (90), charakteryzuje na ogół występowanie zwielokrotnionego genu reduktazy dihydrofolianowej w elementach pozachromosomalnych, tzw. chromosomach minutowych (*double minutes chromosomes*, DMs). Chromosomy minutowe są małymi ($\leq 0.5 \mu\text{m}$ średnicy), parzystymi acentromerycznymi składnikami komórek częstymi zwłaszcza w komórkach nowotworowych (91, 92). W komórkach opornych na antyfoliany liczba chromosomów minutowych przekracza nieraz kilkadziesiątkrotnie ich liczbę w komórkach wrażliwych (86, 90). Podczas podziału komórki chromosomy minutowe ulegają autoreplikacji, jednakże nie posiadając centromeru nie zawsze przechodzą w jednakowych ilościach do komórek potomnych, co pociąga za sobą znaczną heterogenność powstającej populacji. W opornych komórkach mysich i ludzkich przeniesionych do środowiska bez antyfolianu, równoległe z utratą oporności obserwuje się spadek liczby chromosomów minutowych z jednoczesnym spadkiem ilości reduktazy dihydrofolianowej.

Podczas gdy w komórkach mysich nietrwale opornych na ametopterynę można mówić o pewnej proporcjonalności pomiędzy liczbą chromosomów minutowych a stopniem zwielokrotnienia genu reduktazy dihydrofolianowej (62, 89), to w opornych na ametopterynę komórkach ludzkich sytuacja jest bardziej złożona. Liczba DMs jest zawsze znacznie wyższa w ludzkich komórkach opornych na ametopterynę niż we wrażliwych komórkach wyjściowych. Brak jest jednak zbieżności liczby DMs z poziomem reduktazy dihydrofolianowej, jak również ze stopniem stabilności oporności (Tablica 3). Co więcej w wielu subpopulacjach ludzkich komórek opornych na ametopterynę następowało także, nie opisywane dotąd przy pojawianiu się oporności, podwojenie liczby wszystkich chromosomów (Tablica 3). Wiele danych wskazuje, że w niektórych ludzkich komórkach o niestabilnej oporności na antyfoliany zdarzać się może także zwielokrotnienie chromosomalnych genów reduktazy dihydrofolianowej.

W komórkach o trwałej oporności na antyfoliany, takich jak na przykład mysie komórki białaczkowe L5178Y (63), komórki jajnikowe (62)

Tablica 3.

Charakterystyka ludzkich komórek wrażliwych i opornych na ametopterynę ($1.8 \times 10^{-4} M$). Z danych (90)

Komórki	Względna aktywność reduktazy dihydrofolianowej	Stopień niestabilności*) Dni	Liczba chromosomów**) $\bar{x} \pm SD$ (%)	Liczba DM ₃ /komórkę \bar{x} i zakres
A. Wrażliwe HeLa BU-25 (-BUdR)	1		59 ± 1	0.5 (0-6)
Oporne:				
10B1 ₁	228	13	57 ± 2 (100)	19 (0-132)
10B2 ₁	180	21	58 ± 3 (95)	
			93.1 (5)	28 (0-130)
10C1 ₁	107	14	55 ± 1 (73)	
			106 ± 5 (24)	75 (4-257)
			166 (3)	
10C3 ₄	107	11	56 ± 2 (8)	
			110 ± 5 (89)	219 (46-475)
			210 (3)	
B. Wrażliwe WJ-18 VA ₂ -B	1		68 ± 2 (97)	
			136 (3)	< 0.3
Oporne:				
6A2 ₈	142	8	58 ± 2 (97)	182 (34-841)
			115 (3)	
7D2 ₁₀	144	18	118 ± 5 (100)	98 (2-261)
7D3 ₂	33	29	122 ± 5 (100)	120 (9-348)

*) Wyrażony jako czas (w dniach) niezbędny do obniżenia do 50% aktywności reduktazy dihydrofolianowej w komórkach rosnących w nieobecności ametopteryny.

**) W nawiasach podano % komórek charakteryzujących się daną liczbą chromosomów.

czy też komórki płucne (93—95) chomika chińskiego zwielokrotniony gen reduktazy dihydrofolianowej wykrywa się w określonych fragmentach chromosomu 2. Jest to także miejsce występowania natywnego, niez wielokrotnionego genu reduktazy dihydrofolianowej we wrażliwych na ametopterynę komórkach chemicznych (96). Fragment ten, w wielu komórkach chemicznych o niewielkim stopniu oporności na antyfoliany, charakteryzuje się nieprawidłowym prążkowaniem przy barwieniu metodą Giemsy (po traktowaniu chromosomów trypsyną; 95, 97). Komórki o oporności przewyższającej ponad stukrotnie oporność wyjściowych komórek wrażliwych (mierzoną poziomem aktywności reduktazy dihydrofolianowej) cechuje obecność na dłuższym ramieniu chromosomu 2 regionu homogennego, nieprążkowanego, określanego angielskim terminem „*homogenously staining region*”, HSR. Region ten, zawierający zwielokrotniony gen reduktazy dihydrofolianowej znajduje się wśród tych fragmentów chro-

mosomów, które ulegają replikacji bezpośrednio na początku fazy S (56, 98, 98a). Replikacje zaś zwielokrotnionych sekwencji rozpoczynają się w określonym miejscu każdej z powtarzających się sekwencji i przebiegają w uporządkowany sposób przez całą sekwencję (99).

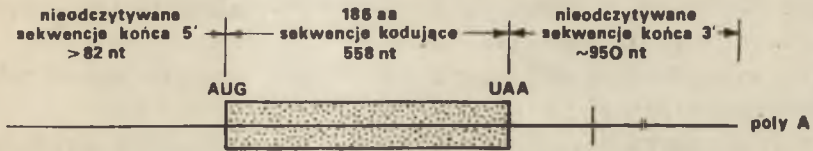
Innego typu anomalia chromosomalna charakteryzuje odporne na ametoptyrę komórki mysiej melanomy, w których HSR występuje w 4-5 dużych dodatkowych chromosomach (100) zawierających naprzemiennie satelitarny i niesatelitarny DNA (101). Opisano także chemiczne linie komórkowe o dużej oporności na ametoptyrę, w których nie występowały anomalie chromosomalne (49).

II-3. Struktura genu i mRNA reduktazy dihydrofolianowej

Gen reduktazy dihydrofolianowej nie został dotąd wyizolowany. Jego strukturę jednak udało się poznać dość dobrze (66, 102). Dzięki zastosowaniu hybrydyzacji DNA komplementarnego wobec mRNA reduktazy dihydrofolianowej z fragmentami genomu komórek o podwyższonym poziomie reduktazy uzyskano informacje, że gen reduktazy dihydrofolianowej złożony jest z około 32 tysięcy zasad nukleotydowych, a łącznie ze swymi sekwencjami ograniczającymi (*flanking*) stanowi jednostkę złożoną z 42-50 tysięcy zasad. Gen reduktazy zawiera 6 sekwencji kodujących, rozdzielonych pięcioma sekwencjami niekodującymi (*intervening*). Jedna z sekwencji niekodujących znajduje się w nieodczytywanym końcu 5'; koniec zaś 3' wykazuje budowę ciągłą (102). Ponadto gen reduktazy dihydrofolianowej zawiera szereg powtarzających się sekwencji DNA, których rola nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona. Można oczekiwać, że badania transformacji*) komórek przez gen reduktazy dihydrofolianowej dostarczą dalszych informacji o budowie genu, mechanizmach jego amplifikacji i ekspresji.

Transkrypt genu reduktazy dihydrofolianowej stanowi kilka na ogół różniących się wielkością cytoplazmatycznych mRNA (103—106). W mysich komórkach S-180 zarówno wrażliwych jak i opornych na ametoptyrę, jak również w komórkach mysiej wątroby opisano występowanie aż czterech odrębnych mRNA, które *in vitro* odpowiedzialne są za syntezę białka komigrującego w żelu poliakrylamidowym z oczyszczoną mysią reduktazą dihydrofolianową. Omawiane mRNA, różnią się nie tylko swą wielkością, na którą składa się od 150 do 1600 nukleotydów, lecz także długością nieodczytywanego końca 3', który może składać się od 80 do 900 nukleotydów. Na Ryc. 3 przedstawiono schemat budowy 1600 nukleotydowego mRNA z mysich komórek S-180 (102). W komórkach płucnych chomika chińskiego występuje również kilka mRNA reduktazy di-

*) Patrz artykuł przeglądowy. Grzelakowska-Sztabert B. (1983), Postępy Biologii Komórki, 10, 137—156 oraz Fikus M., Zielińska M. (1979), Postępy Biochemii 25, 254—256.



Ryc. 3. Schemat struktury 1600 nukleotydowego mRNA reduktazy dihydrofolianowej z komórek mysich (wg 102).

hydrofolianowej, których translacja prowadzi jednak do syntezy tylko dwóch form reduktazy różniących się nieco ciężarem cząsteczkowym (104, 105). Regulacja transkrypcji genu reduktazy dihydrofolianowej, zwłaszcza w komórkach opornych na antyfoliany, jest przedmiotem intensywnych badań (107—110), ponieważ wydaje się, że przebiega ona w ten sam sposób co w komórkach wrażliwych. Dyskutowana jest zarówno możliwość zmian szybkości syntezy mRNA w jądrze komórkowym (110) jak i zmiana stabilności mRNA (109).

III. Zmieniona reduktaza dihydrofolianowa

Zmiany stosunku zawartości form reduktazy dihydrofolianowej zawierającej lub niezawierającej NADPH towarzyszą pojawianiu się oporności na ametoptynę komórek L1210 (111—114) czy też ludzkich komórek limfoblastycznych W1-L2 (115). Wysuwane są sugestie, że w początkowych etapach rozwoju oporności na ten antyfolian zwiększenie ilości wolnego enzymu nie połączonego z NADPH, wolniej ulegającego degradacji (112) i słabiej, niż enzym w kompleksie z NADPH, wiążącego ametoptynę, może być korzystne dla komórek. Obserwacje te wskazują, że również komórkowy poziom NADPH może być ważnym czynnikiem regulującym możliwość komórek na ametoptynę.

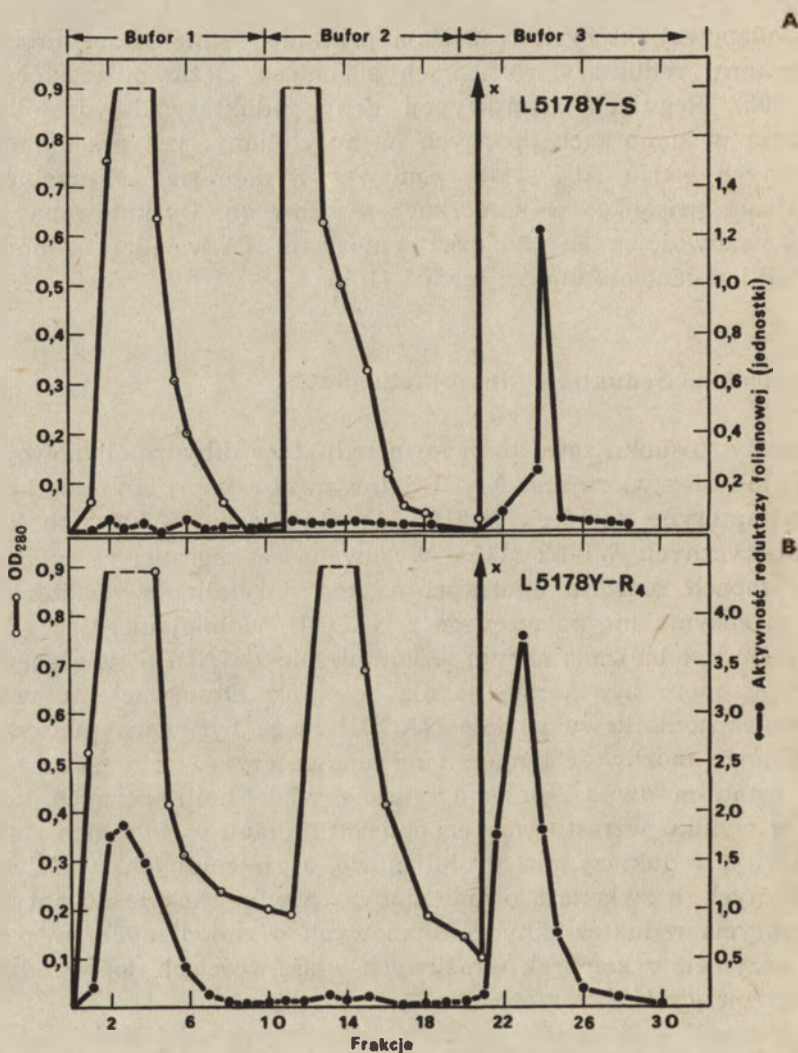
W ostatnim dwudziestoleciu opisano wiele linii opornych komórek, które w wyniku wzrostu w obecności antyfolianu w wysokich stężeniach syntetyzują reduktazy dihydrofolianowe o zmienionych właściwościach kinetycznych, a zwłaszcza o zmienionym powinowactwie do antyfolianu. Do wykrycia reduktaz dihydrofolianowych o zmienionych, w porównaniu z enzymem z komórek wrażliwych właściwościach doprowadziło szereg następujących spostrzeżeń:

- niemożność całkowitego zahamowania aktywności reduktazy z komórek opornych przez antyfolian użyty w stężeniach hamujących całkowicie enzym z macierzystych komórek wrażliwych (116—119).
- częściowa odwracalność działaniem dihydrofolianu hamowania przez ametoptynę reduktazy z komórek opornych (120—121).

— brak zbieżności poziomu reduktazy dihydrofolianowej w komórkach ze stopniem ich oporności (118—120).

— brak wiązania radioaktywnej ametoptyeryny przez reduktazę z komórek opornych (122).

— wykrycie aktywności reduktazowej także w eluacie z objętości pustej kolumny podczas chromatografii powinowactwa, oprócz formy eluowanej specyficjnie dihydrofolianem (Ryc. 4, 118).



Ryc. 4. Oczyszczanie reduktazy dihydrofolianowej z komórek L5178Y wrażliwych (A) i opornych (B) na ametoptyerynę, przy użyciu kolumny powinowactwa Sepharose-ametoptyeryna (wg 118).

Bufory użyte do elucji: I — Tris-HCl+NADPH; II — Tris-glicyna+KCl+NADPH; III — Tris-HCl+KCl+dihydrofolian.

Należy zwrócić uwagę na dwa szczyty aktywności reduktazowej w przypadku chromatografii ekstraktów z komórek opornych.

— brak fluorescencji komórek opornych po traktowaniu ich pochodną ametoptyeryny z fluoresceiną (122).

— brak tworzenia kompleksu reduktaza dihydrofolianowa-ametoptyeryna-NADPH, gdy enzym pochodzi z komórek opornych (118).

W Tablicy 4 zebrano dane o reduktazach dihydrofolianowych z komórek opornych na antyfoliany, których szereg właściwości, a w szczególności ich interakcja z inhibitorami i substratami zostały szczególnie precyzyjnie przebadane. Jak widać komórki odporne mogą syntetyzować bądź tylko zmieniony enzym (120, 122), bądź też zdolne są do syntezy obydwu form (118, 123). Ostatnio wykazano, że gen kodujący syntezę zmienionej reduktazy dihydrofolianowej może również ulec zwielokrotnieniu (54). Komórki odporne zawierające zmienioną reduktazę dihydrofolianową rosną w obecności antyfolianu nawet w stężeniu 10^{-3} M, a stopień uzyskanej oporności może nawet sięgać rzędu 10^5 . Obniżenie powinowactwa reduktazy dihydrofolianowej do ametoptyeryny może być stosunkowo niewielkie (enzym z komórek WR 8.1; CHO-VII) lub też tak znaczne (jedna z form enzymu z komórek L5178Y), że komórki praktycznie stają się niewrażliwe na działanie ametoptyeryny. Spadek powinowactwa do dihydrofolianu reduktaz dihydrofolianowych jest stosunkowo niewielki, nie stwierdza się ponadto kierunkowości w zamianach powinowactwa enzymu do NADPH (Tablica 4).

Reduktazy dihydrofolianowe o obniżonym powinowactwie do antyfolianów na ogół mają masy cząsteczkowe podobne do mas cząsteczkowych enzymów z wyjściowych komórek wrażliwych. Cechuje je jednak inna wrażliwość termiczna, inny zakres optymalnych wartości pH i stopień aktywacji przez związki blokujące grupy SH, jak również różnice w wartościach liczby obrotów (120, 122). Różnice te wskazują na zmiany czwartorzędowej struktury zmienionych reduktaz, które znajdują odzwierciedlenie w zmienionej ich interakcji z inhibitorami i dihydrofolianem. Podobne zmiany właściwości enzymu z opornych na ametoptyerynę mysich komórek 3T6 (122) i z komórek *E. coli* (124) sugerują, że może i w przypadku enzymu ssaczego wynikają one ze zmiany jakiegoś aminokwasu lub aminokwasów w wiążącej ametoptyerynę kieszonce hydrofobowej cząsteczki białka enzymatycznego.

Nasuwa się pytanie, czy reduktazy dihydrofolianowe, charakteryzujące się osłabieniem lub wręcz brakiem powinowactwa do związku, na który została wytworzona oporność komórek, wykazują także zmienione powinowactwo w stosunku do innych antyfolianów. Stwierdzono na przykład, że powinowactwo reduktazy dihydrofolianowej z opornych na ametoptyerynę chomiczych komórek A3 uległo zmianie w stosunku do metaskwinu, chinazolinowego antyfolianu (120). Zmienioną zaś reduktazę mysich fibroblastów 3T6 R-400 cechowało także obniżenie powinowactwa

Tablica 4.

Charakterystyka kilku opornych na ametoptyerynę linii komórek syntetyzujących zmienioną reduktazę dihydrofolianową

Komórki	Przeżywanie w obecności ametoptyeryny*** [M]	Względny poziom oporności	Względny wzrost ilości reduktazy dihydrofolianowej	Obniżenie powinowactwa w stosunku do			Pismiennictwo
				ametoptyeryny	dihydrofolianu ^{*)} lub folianu ^{**)}	NADPH	
ludzkie limfoblasty WR8, T	1.6×10^{-6}	170	230	50	17.7*)	0.45	(117)
mysiej limfomy L5178Y	1×10^{-5} 1×10^{-3}	1.300 300.000	7 8.6	{ F ₁ 5.8 F ₁₁ 21.330 F ₁ 7.3 F ₁₁ 288.460	16.2***) 24.7***)	ND	(118)
mysie fibroblasty 3T6 R-400	4×10^{-4}	200	100	270	3*)	1	(122)
jajnikowe chomika chińskiego CHO-VII	1×10^{-4}	10.000	50	10	ND	ND	(49)

*** najniższe stężenie ametoptyeryny w środowisku nie ograniczające wzrostu komórek.

wactwa również do innych niż ametoptyryna antyfolianów, a zwłaszcza do trójazynowego antyfolianu Bakera i chinazolinowej pochodnej JB 11 (122).

IV. Upośledzenie transportu antyfolianów

Po raz pierwszy mniej efektywne pobieranie ametoptyryny przez odporne na ten antyfolian mysie komórki białaczkowe L5178Y wykazano już w 1962 roku (125), nadal jednak nasze wiadomości o molekularnych mechanizmach tego zjawiska są niepełne. Oporne na antyfoliany mysie komórki leukemiczne (114, 126, 129), komórki szczurzej hepatomy (130, 131) oraz ludzkie komórki białaczkowe (132) cechuje oprócz upośledzenia pobierania ametoptyryny, także słabsze pobieranie aminopteryny i metylo-tetrahydrofolianu. Związki te są transportowane do komórek przy udziale tego samego nośnika błonowego co ametoptyryna (133). W rezultacie w komórkach opornych nie dochodzi do nagromadzenia wolnego antyfolianu, którego poziom decyduje o stopniu zaburzeń w biosyntezie koenzymów folianowych (134). Bardzo słabe pobieranie ametoptyryny przez komórki odporne obserwuje się przede wszystkim przy prowadzeniu inkubacji komórek z tym antyfolianem w konwencjonalnie stosowanych do tego celu buforach dwuwęglanowych zawierających fosforany. Zastosowanie buforu Hepes zmniejsza różnice w intensywności pobierania antyfolianów, gdyż w tym środowisku nie tylko zwiększa się pobieranie ametoptyryny przez wrażliwe komórki L1210 (135), lecz także i przez komórki odporne (127). Zwiększenie stężenia ametoptyryny w środowisku zewnętrznym może także prowadzić do zmniejszenia powyższych różnic (127) lub też ich prawie całkowitego zaniku (129). Nie wiadomo jednak dotychczas czy pobieranie ametoptyryny zachodzi wówczas za pośrednictwem nośnika odpowiedzialnego za transport koenzymów folianowych, czy też na innej drodze. Komórki wrażliwe i odporne na ametoptyrynę nie różnią się natomiast zdolnością do przekształcania tego antyfolianu w pochodne poliglutaminianowe *) (130), co wykazano na przykładzie komórek szczurzej hepatomy.

Porównanie parametrów kinetycznych transportu ametoptyryny do komórek wrażliwych i opornych wskazuje na obniżenie powinowactwa błonowego nośnika do ametoptyryny, wyrażające się obniżeniem V_{max} (*influx*) (115, 132, 136) lub (i) wzrostem wartości K_t (114, 126, 127, 136).

Oprócz różnic w powinowactwie nośnika do ametoptyryny, transport jej przez komórki odporne odróżnia się szeregiem innych właściwości, jak inna wrażliwość na temperaturę, odpowiedź na inne antyfoliany i koenzymy folianowe, na związki blokujące grupy SH, czy też trucizny me-

*) patrz art. przegl. Grzelakowska-Sztabert B. (18).

Tablica 5.
Charakterystyka wrażliwych (S) i opornych (R81) na działanie ametoptyryny mysich komórek L1210 o podwyższonym poziomie reduktazy dihydrofolianowej i zmniejszonym transporcie antyfolianu. Z danych (127).

Komórki	Względny poziom reduktazy dihydrofolianowej	Pobieranie* ¹ ametoptyryny przez komórki inkubowane w buforze		Parametry kinetyczne** ² transportu ametoptyryny		Wpływ na pobieranie	
		Hepes-MgCl ₂	zawierającym dwuwęglan i fosforany	K _t [M]	V _{max}	metylo-tetrahydrofolian 100 μM	aminopteryna 100 μM
L1210/S	1	4.1	0.90	1.1 × 10 ⁻⁶	0.63	hamujący	hamujący
L1210/R81	35	0.75	0.05	2.0 × 10 ⁻⁵	0.31	brak	hamujący

*¹) Ametoptyryna obecna w środowisku w stężeniu 1 μM. Pobieranie wyrażone w nmolach [³H]-ametoptyryny/10⁹ komórek w ciągu 30 minut.

**²) Parametry kinetyczne transportu oznaczone w eksperymentach z użyciem buforu Hepes-MgCl₂; V_{max} wyrażone w nmolach [³H]-ametoptyryny/10⁹ komórek/min.

taboliczne. Dane zestawione w Tablicy 5 ilustrują na przykładzie wrażliwych i opornych na ametoptynę komórek L1210 niektóre z omawianych powyżej właściwości.

Wysuwane są też przypuszczenia, że niekiedy w opornych na ametoptynę komórkach może dojść do zmniejszenia liczby uczestniczących w transporcie nośników lub też, że nośniki nie zawierają funkcjonalnych składników niezbędnych w translokacji antyfolianów przez błonę komórkową (127; 128).

V. Uwagi końcowe

Nasuwa się pytanie, czy zrozumienie mechanizmów oporności na antyfoliany może być pomocne w przezwyciężaniu tego niepożądanego efektu.

W przypadku, gdy komórki zawierają nieraz setki razy więcej białka enzymatycznego reduktazy dihydrofolianowej można myśleć o syntezie nowego leku, który byłby efektywnym substratem tego enzymu, a po uwodorowaniu stanowiłby silny inhibitor syntetazy tymidylanowej. Traktowanie komórek takim związkiem mogłoby spowodować wybiórcze ginienie komórek o wysokim poziomie reduktazy dihydrofolianowej. Przypuszczano, że związki typu homofolianów (ryc. 1F) będą działały w opisany powyżej sposób (137). Wprawdzie dihydrohomofolian hamował rozwój opornych na ametoptynę mysiej białaczki L1210/FR8, jednakże antymetabolit ten ulegał redukcji w wątrobie gospodarza, a nie zaś jak oczekiwano, w komórkach białaczkowych, które powinny stanowić główny cel jego ataku (138).

Inną drogą prowadzącą do wybiórczego niszczenia komórek opornych na antyfoliany może być wykorzystanie obserwacji, że tylko komórki o wysokim poziomie reduktazy dihydrofolianowej giną, na skutek silnego efektu radiacyjnego, po jednoczesnym podaniu ametoptyny i dezoksyurydyny o bardzo wysokiej aktywności specyficznej (139). Trudno sobie na razie wyobrazić jednak terapię z wykorzystaniem tej możliwości.

Jeśli oporność jest wynikiem syntezy reduktazy dihydrofolianowej o obniżonym powinowactwie do ametoptyny, to można mieć nadzieję, że uda się zsyntetyzować inhibitory specyficznie hamujące zmienioną reduktazę, nie działające zaś na enzym z komórek wrażliwych.

W przypadku, gdy zaburzenia pobierania antyfolianu są główną przyczyną zaistniałej oporności można w różny sposób próbować przezwyciężyć ten defekt. Przede wszystkim należy sprawdzić, czy zwiększenie stężenia podawanego antyfolianu spowoduje jego efektywne pobieranie przez komórki odporne (129), bez wywoływania jednak ubocznych efektów toksycznych. W klinice już od szeregu lat stosuje się w leczeniu pewnych nowotworów bardzo wysokie dawki antyfolianu, ale mimo jednoczesnego

podawania środków osłaniających, nie jest to obojętne dla pacjenta. Inną możliwością jest zastosowanie ametoptyeryny w połączeniu z polimerem odznaczającym się dużą zdolnością penetracji przez błonę komórkową. Tak na przykład, kompleks ametoptyeryny z poli[L-lizyną] okazał się efektywny w hamowaniu wzrostu odpornej na ametoptyerynę hepatomy Reubera (140, 141). W komórkach tych ulegał on bowiem hydrolizie, a uwolniona ametoptyeryna wiązała się bezpośrednio lub być może po poliglutamacji z reduktazą dihydrofolianową z komórek opornych (142). Dalszą możliwością stanowi zastosowanie związków, które dostają się do komórek przy udziale innych mechanizmów niż ametoptyeryna, np. różne podstawione dwuaminopirymidyny typu DDMP (143, 144), BW50 197 (145), czy też częściowo na drodze dyfuzji jak lipofilne estry ametoptyeryny (146). Można także stosować antyfolian zamknięty w liposomach, które zostają sfagocytowane przez komórki (147).

Tak więc wydaje się, że dysponujemy już obecnie możliwościami dostarczenia antyfolianu do komórek opornych, z pominięciem systemu transportującego ametoptyerynę, a w konsekwencji zwiększenie skuteczności jego działania.

Jak wskazują wstępne badania opornych na ametoptyerynę komórek chemicznych możliwe jest także krótkotrwałe, przejściowe uwrażliwienie ich na podany antyfolian zastosowaniem godzinnej hipertermii w 43°C (148). W okresie tym stwierdza się znaczny (50%) spadek aktywności reduktazy dihydrofolianowej oraz zwiększenie wpływu ametoptyeryny z komórek. Należy sobie także uświadomić, że komórki odporne na działanie antyfolianów mogą stać się bardziej wrażliwe na działanie innych związków, nie mających wpływu na przemiany folianu, co wykazano na przykładzie adriamycyny (149) i jej pochodnej z kwasem kaprylowym (150).

Zaakceptowano do druku 22.12.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Grzelakowska-Sztabert B., (1976), *Postępy Biochemii*, 22, 345—385.
2. Osborn M. G., Freeman M., Huennekens F. M., (1958), *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 97, 429—431.
3. Zakrzewski S. F., Nichol C. A., (1958), *Biochim. Biophys. Acta*, 27, 425—426.
4. Werkheiser W. C., (1963), *Cancer Res.*, 23, 1277—1285.
5. Fan C., Henderson G. B., Vitols K., Huennekens F. M., (1978), w *Antimetabolites in Biochemistry Biology and Medicine*, FEBS Meeting, Prague, 57, 318—326.
6. White J. C., (1981), *Cancer Treat. Rep.*, 65, suppl. 1, 3—12.
7. Jackson C., Harrap K. R., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, 158, 827—841.
8. Halpern R. M., Halpern B. C., Clark B. R., Ashe H., Hardy D. N.,

- Jenkinson P. Y., Chou S. C., Smith R. A., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4018—4022.
9. Bertino J. R., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 293—304.
 10. Zielińska Z. M., Grzelakowska-Sztabert B., Manteuffel-Cymborowska M., (1978), w *Characterization and Treatment of Human Tumours*, **4**, 294—298.
 11. Leyva A., Nederbragt H., Lankema J., Pinedo H. M., (1981), *Cancer Treat. Rep.*, **65**, suppl. 1, 45—50.
 12. Pinedo H. M., Zaharko D. S., Bull J. M., Chabner B. A., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 4418—4424.
 13. Borsa J., Whitmore G. F., (1969), *Cancer Res.*, **29**, 737—744.
 14. Goldman I. D., (1974), *Mol. Pharmacol.*, **10**, 257—274.
 15. White J. C., Lotfield S., Goldman I. D., (1973), *Mol. Pharmacol.*, **11**, 287—297.
 16. Goldman I. D., (1971), *Cancer Treat. Rep.*, **61**, 549—557.
 17. Donehower R. C., Myers C. E., Chabner B. A., (1979), *Life Sci.*, **25**, 1—14.
 18. Grzelakowska-Sztabert B., (1977), *Postępy Biochemii*, **23**, 559—578.
 19. Manteuffel-Cymborowska M., (1978), *Postępy Biochemii*, **24**, 93—115.
 20. Zielińska Z. M., (1981), *Zeszyty Naukowe UJ, Prace z Biologii Molekularnej DCXLVI*, 207—223.
 21. Hryniuk W. M., Bertino J. R., (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA*, **186**, 330—342.
 22. Hryniuk W. M., Fisher G. A., Bertino J. R., (1969), *Mol. Pharmacol.*, **5**, 557—564.
 23. Johnson L. F., Fuhrman C. L., Abelson H. T., (1978), *Cancer Res.*, **38**, 2408—2412.
 24. Moran R. G., Mulkins M., Heidelberger C., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 5924—5928.
 25. Bowen O., White J. C., Goldman I. D., (1978), *Cancer Res.*, **38**, 219—222.
 26. Bertino J. R., Lindquist C., (1978), *Adv. in Cancer Chemotherapy*, (H. Umezawa et al., red.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, Baltimore, 155—165.
 27. Bertino J. R., Sawicki W. L., Cashmore A. R., Cadman E. C., Skeel R. T., (1977), *Cancer Treat. Rep.*, **61**, 667—673.
 28. Bertino J. R., Skeel R. T., (1975), w *Pharmacological Basis of Cancer Chemotherapy*, M. D. Anderson Hospital and Tumour Institute at Houston, 681—689, Baltimore, The Williams and Wilkins Company.
 29. Bertino J. R., (1978), *Medical and Pediatric Oncol.*, **5**, 105—114.
 30. Kessel D., Hall T. C., Roberts D., Vodinsky J., (1965), *Science*, **150**, 752—754.
 31. Kessel D., Hall T. C., Roberts D., (1968), *Cancer Res.*, **28**, 564—570.
 32. Skeel R. T., Sawicki W. L., Cashmore A. R., Bertino J. R., (1973), *Cancer Res.*, **33**, 2972—2976.
 33. Skeel R. T., Sawicki W. L., Cashmore A. R., Bertino J. R., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 3659—3664.
 34. Roberts D., Vodinsky J., Hall T. C., (1965), *Cancer Res.*, **25**, 1899—1903.
 35. Roberts D., Vodinsky J., (1968), *Cancer Res.*, **28**, 1955—1962.
 36. Hryniuk W. M., Bertino J. R., (1969), *J. Clin. Invest.*, **48**, 2140—2155.

37. Jackson R. C., Hart L. I., Harrap K. R., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 1991—1997.
38. Tattersall M. H. N., Jackson R. C., Jackson S. T. M., Harrap K. R., (1974), *Europ. J. Cancer*, **10**, 819—826.
39. White J. C., Goldman I. D., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5722—5727.
40. Goldin A., Johnson R. K., (1977), w *Recent Advances in Cancer Treatment*, red. Tagnon H. J. i Staquet M. J., Raven Press. N. Y., 155—169.
41. Harrap K. R., Jackson R. C., (1978), w *Antibiotics Chemother.*, **23**, 228—237, (Karger, Basel, 1978).
42. Hakala M. T., Zakrzewski S. F., Nichol C. A., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 452—458.
43. Hakala M. T., (1973), w *Drug Resistance and Selectivity. Biochemical and Cellular Basis*, red. E. Mihich, Academic Press, New York, London, 263—293.
44. Raunio R. P., Hakala M. T., (1967), *Mol. Pharmacol.*, **3**, 279—283.
45. Kashket E. R., Crawford E. J., Friedkin M., Humphreys S. R., Goldin A., (1964), *Biochemistry*, **3**, 1928—1931.
46. Nakamura H., Littlefield J. W., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 179—187.
47. Flintoff W. F., Davidson S. V., Siminovitch L., (1976), *Somatic Cell Genetics*, **2**, 245—261.
48. Flintoff W. F., Spindler S. M., Siminovitch L., (1976), *In Vitro*, **12**, 749—757.
49. Flintoff W. F., Weber M. K., Nagainis C. R., Essani A. K., Robertson D., Salser W., (1982), *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 275—285.
50. Hänggi U. J., Littlefield J. W., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3075—3080.
51. Hänggi U. J., Littlefield J. W., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1390—1397.
52. Domin B. A., Cheng Y., Hakala M. T., (1982), *Mol. Pharmacol.*, **21**, 231—238.
53. Morandi C., Attardi G., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10169—10175.
54. Haber D. A., Schimke R. T., (1981), *Cell*, **26**, 355—362.
55. Alt F. W., Kellems R. E., Schimke R. T., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3063—3074.
56. Milbrandt J. D., Heintz N. H., White W. C., Rothman S. M., Hamlin J. L., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6043—6047.
57. Alt F. W., Kellems R. E., Bertino J. R., Schimke R. T., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1357—1370.
58. Chang S. E., Littlefield J. W., (1976), *Cell*, **7**, 391—396.
59. Chang A. C. Y., Nunberg J. H., Kaufman R. J., Erlich H. A., Schimke R. T., Cohen S. N., (1978), *Nature*, **275**, 617—624.
60. Kellems R. E., Alt F. W., Schimke R. T., (1978), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6987—6993.
61. Melera P. W., Wolgemuth D., Biedler J. L., Hession C., (1980), *J. Biol.*, **255**, 7024—7028.
62. Nunberg J. H., Kaufman R. J., Schimke R. T., Urlaub G., Chasin L. A., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **11**, 5553—5556.
63. Schimke R. T., Kaufman R. J., Alt F. W., Kellems R. F., (1978), *Science*, **202**, 1051—1055.

64. Schimke R. T., Alt F. W., Kellems R. E., Kaufman R. J., Bertino J. R., (1978), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biology*, **42**, 649—657.
65. Dolnick B. J., Berenson R. J., Bertino J. R., Kaufman R. J., Nunberg J. H., Schimke R. T., (1979), *J. Cell. Biol.*, **83**, 394—402.
66. Simonsen C. C., Brown P. C., Crouse G. F., McGrogan M., Setzer D., Sweetser D., Kaufman R. J., Schimke R. T., (1981), w *Molecular Basis of Drug Action*, red. Singer i Ondarza, Elsevier North Holland Inc., 343—359.
67. Varshavsky A., (1981), *Cell*, **25**, 561—572.
68. Roy P. N., Siminovitch L., (1982), w *Somatic Cell Genetics*, red. C. J. Caskey i D. S. Robins, Plenum Publishing Corp., 127—167.
69. Lewis W. H., Wright J. A., (1979), *Somat. Cell Genet.*, **5**, 83—96.
70. Kempe T., Swyrd E., Bruist E., Stark G. R., (1976), *Cell*, **9**, 541—550.
71. Padgett R. A., Wahl G. M., Coleman P. F., Stark G. R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 974—980.
72. Wahl G. M., Padgett R. A., Stark G. R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8679—8689.
73. Levinson B. B., Ullman B., Martin D. W., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4396—4404.
74. Suttle D. P., Stark G. R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4602—4607.
75. Andrulis I. L., Siminovitch L., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 5724—5728.
76. Choi J., Scheffler I. E., (1981), *Somat. Cell Genet.*, **7**, 219—233.
77. Sinensky M., (1977), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 863—867.
78. Spradling A. C., Mahowald A. P., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 1096—1100.
79. Jones C. W., Rosenthal N., Rodakis G. C., Kafotos F. C., (1979), *Cell*, **18**, 1317—1332.
80. Fryberg E. A., Kindle K. L., Davidson N., Sodja A., (1980), *Cell*, **19**, 365—378.
81. Storti R. V., Horovitch S. J., Scott M. P., Rich W., Pardue M. L., (1978), *Cell*, **13**, 589—598.
82. Gapski G. R., Whiteley J. M., Rader J. I., Cramer P. L., Henderson G. B., Neef V., Huennekens F. M., (1975), *J. Med. Chem.*, **18**, 526—528.
83. Schimke R. T., (1980), *Sci. American*, **243**, 60—69.
84. Courtenoy V. D., Robins A. B., (1972), *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 45—53.
85. Kaufman R. J., Brown P. C., Schimke R. T., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 5669—5673.
86. Kaufman R. J., Brown P. C., Schimke R. T., (1981), *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 1084—1093.
87. Kaufman R. J., Schimke R. T., (1981), *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 1069—1076.
88. Schimke R. T., Brown P. C., Kaufman R. J., McGrogan M., Slate D. L., (1981), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **45**, 785—797.
89. Brown P. C., Beverly S. M., Schimke R. T., (1981), *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 1077—1083.
90. Masters J., Keely B., Gay H., Attardi G., (1982), *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 498—507.

91. Balaban-Malenbaum G., Gilbert F., (1977), *Science*, **198**, 739—742.
92. Barker P. E., Hsu T. C., (1979), *J. Natl. Cancer Inst.*, **62**, 257—261.
93. Biedler J. L., Spengler B. A., (1976), *Science*, **191**, 185—186.
94. Biedler J. L., Albrecht A. M., Spengler B. A., (1978), *Eur. J. Cancer*, **14**, 41—49.
95. Biedler J. L., Melera P. W., Spengler B. A., (1980), *Cancer Genet. Cytogenet.*, **2**, 47—60.
96. Roberts M., Hattner K. M., Schimke R. T., Ruddle F. H., (1980), *J. Cell Biol.*, **87**, 288—289.
97. Lewis J. A., Biedler J. L., Melera P. W., (1982), *J. Cell Biol.*, **94**, 418—424.
98. Hamlin J. L., Biedler J. L., (1981), *J. Cell. Physiol.*, **107**, 101—107.
- 98a. Kellems R. E., Harper M. E., Smith L. M., (1982), *J. Cell Biol.*, **92**, 531—539.
99. Heintz N. H., Hamlin J. L., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4083—4087.
100. Bostock C. J., Clark E. M., Harding N. G. L., Mounts P. M., Tyler-Smith C., Van Heyningen V., Walker P. M. B., (1979), *Chromosoma*, **74**, 153—177.
101. Bostock C. J., Clark E. M., (1980), *Cell*, **19**, 709—715.
102. Nunberg J. H., Kaufman R. J., Chang A. C. Y., Cohen S. N., Schimke R. T., (1980), *Cell*, **19**, 355—364.
103. Setzer D. R., McGrogan M., Nunberg J. H., Schimke R. T., (1980), *Cell*, **22**, 361—370.
104. Melera P. W., Wolgemuth D. J., Hession C., Biedler J. L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 319—322.
105. Lewis J. A., Kurtz D. T., Melera P. W., (1981), *Nucleic Acid Res.*, **9**, 1311—1322.
106. Morandi C., Masters J. N., Mofites M., Attardi G., (1982), *J. Mol. Biol.*, **156**, 583—607.
107. Wiedeman L. M., Johnson L. F., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 2818—2822.
108. Wu J. R. S., Johnson L. F., (1982), *J. Cell. Physiol.*, **110**, 183—189.
109. Leys E. J., Kellems R. E., (1981), *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 961—971.
110. Hendrickson S. L., Wu J. R. S., Johnson L. F., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 5140—5144.
111. Harding N. G. L., Martelli M. F., Huennekens F. M., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**, 295—296.
112. Jackson R. C., Huennekens F. M., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 192—198.
113. Huennekens F. M., Rader J. I., Neef W., Otting F., Jackson R., Niethamer D., (1973), w Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes, 496—503, red. E. Gerlach, K. Moser, E. Deutsch, W. Wilmanns, Georg Thieme Publishers, Stuttgart.
114. Jackson R. C., Niethamer D., Huennekens F. M., (1975), *Cancer Biochem. Biophys.*, **1**, 151—155.
115. Niethamer D., Jackson R. C., (1975), *Eur. J. Cancer*, **11**, 845—854.
116. Blumenthal G., Greenberg D. M., (1970), *Oncology*, **24**, 223—229.
117. Jackson R. C., Niethamer D., (1977), *Europ. J. Cancer*, **13**, 567—575.

118. Goldie J. H., Krystal G., Hartley D., Gudauskas G., Dedhar S., (1980), *Europ. J. Cancer*, **16**, 1539—1546.
119. Goldie J. H., Dedhar S., Krystal G., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 11629—11635.
120. Albrecht A. M., Biedler J. L., Hutchison D. J., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 1539—1546.
121. Biedler J. L., Albrecht A. M., Hutchison D. J., Spengler B. A., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 152—161.
122. Haber D. A., Beverly S. M., Kiely M. L., Schimke R. T., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9501—9510.
123. Flintoff W. D., Essani K., (1980), *Biochemistry*, **19**, 4321—4327.
124. Matthews O. A., Alden R. A., Bolin J. T., Freer S. T., Hamlin R., Xuong N., Kraut J., Poe M., Williams H., Hoogsteen K., (1977), *Science*, **197**, 452—455.
125. Fisher G. A., (1962), *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 1233—1237.
126. Sirotnak F. M., Kurita S., Hutchison D. J., (1969), *Cancer Res.*, **29**, 75—80.
127. McCormick J. I., Susten S. S., Freisham J. H., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**, 311—318.
128. Hill B. T., Bailey B. D., White J. C., Goldman I. D., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 2440—2446.
129. Hill B. T., Dedhar S., Goldie J. H., (1982), *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 263—266.
130. Galivan J., (1979), *Cancer Res.*, **39**, 735—743.
131. Galivan J., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 1757—1762.
132. Ohnoshi T., Ohnuma I., Takahashi I., Scanlon K., Kamen B. A., Holland J. F., (1982), *Cancer Res.*, **42**, 1655—1660.
133. Huennekens F. M., Vitols K. S., Henderson G. B., (1978), *Advan. Enzymol.*, **78**, 313—346.
134. White J. C., Goldman I. D., (1976), *Mol. Pharmacol.*, **12**, 711—719.
135. Henderson G. B., Zevely E. M., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **200**, 149—156.
136. Sirotnak E. M., Moccio D. M., Kelleher L. E., Goutas L. J., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 4447—4452.
137. Mead J. A. R., Goldin A., Kisliuk R. L., Friedkin M., Plante L., Crawford E. J., Kwok G., (1966), *Cancer Res.*, **26**, 2374—2379.
138. Friedkin M., Crawford E. J., Plante L. T., (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA*, **186**, 209—213.
139. Urlaub G., Landzberg M., Chasin L. A., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 1594—1601.
140. Whithley J. M., Nimec Z., Galivan G., (1981), *Mol. Pharmacol.*, **19**, 505—508.
141. Ryser H. J. P., Shen W. C., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 3867—3870.
142. Galivan J., Balińska M., Whithley J. M., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **216**, 554—550.
143. Sirotnak F. M., Moccio D. M., Goutas L. J., Kelleher L. E., Montgomery J. A., (1982), *Cancer Res.*, **42**, 924—928.
144. Hill B. T., Price L. A., Goldie J. H., Harrison S. J., (1975), *Europ. J. Cancer*, **11**, 545—553.
145. Hill B. T., Goldie J. H., Price L. A., (1973), *Br. J. Cancer*, **28**, 263—268.

146. Rosowsky A., Lazarus H., Ynan G. C., Beltz W. R., Mangini R., Abelson M. T., Modest E. J., Frei E. III, (1980), *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 648—652.
147. Todd J. A., Modest E. J., Rossow P. W., Tokes Z. A., (1982), *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 541—546.
148. Herman T. S., Cress A. E., Sweets C., Gerner E. W., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 3840—3843.
149. Hill B. T., Price L. A., Goldie J. H., (1976), *Europ. J. Cancer*, **12**, 541—549.
150. Hill B. T., Price L. A., (1977), *J. Natl. Cancer Inst.*, **59**, 1311—1314.

KATARZYNA DZIEWANOWSKA *)

Naturalne związki cyjanogenne

Cyanogenic Compounds of Natural Origin

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Struktura związków cyjanogennych
- III. Rozpowszechnienie cyjanogenezy
 - III-1. Cyjanogeneza w roślinach wyższych
 - III-2. Cyjanogeneza u bakterii i grzybów
 - III-3. Cyjanogeneza u zwierząt
- IV. Własności i identyfikacja związków cyjanogennych
- V. Metabolizm związków cyjanogennych
 - V-1. Biosynteza związków cyjanogennych
 - V-2. Hydroliza enzymatyczna związków cyjanogennych
 - V-3. Asymilacja cyjanowodoru

Contents

- I. Introduction
- II. Structure of cyanogenic compounds
- III. Distribution of cyanogenesis
 - III-1. Cyanogenesis in higher plants
 - III-2. Cyanogenesis in bacteria and fungi
 - III-3. Cyanogenesis in animals
- IV. Properties and identification of cyanogenic compounds
- V. Metabolism of cyanogenic compounds
 - V-1. Biosynthesis of cyanogenic compounds
 - V-2. Enzymatic hydrolysis of cyanogenic compounds
 - V-3. Hydrogen cyanide assimilation

I. Wstęp

Wiele żywych organizmów cechuje zdolność wytwarzania cyjanowodoru. Zjawisko to, określane mianem cyjanogenezy, zostało zaobserwowane już ponad sto lat temu, w nasionach takich na przykład roślin jak

*) Dr, Instytut Botaniki, Uniwersytet Warszawski, Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa 64.

morele, brzoskwinie, migdały. Odkrywcą cyjanogenezy był przypuszczalnie Schrader (1), który w 1803 r. stwierdził obecność cyjanowodoru w destylacie z gorzkich migdałów. W 1830 r. Robiquet i Boutron-Charlard (2) otrzymali z tego samego materiału krystaliczny związek azotowy, który nazwali amygdaliną. Parę lat później Wöhler i Liebig (1837) (3) wykazali, że amygdalina ulega dość łatwo rozkładowi do glukozy, cyjanowodoru i substancji, określonej przez nich jako olejek zapachowy migdałów, pod wpływem substancji obecnej w gorzkich migdałach, którą nazwali emulsyną. Lehman (1874) (4) stwierdził obecność amygdaliny w nasionach wielu innych roślin z rodziny Różowatych (*Rosaceae*). Do chwili obecnej zjawisko cyjanogenezy zaobserwowano w wielu roślinach należących do różnych rodzin a także u niektórych bakterii i zwierząt. Termin „cyjanogeny(a)” stosuje się do opisanego zarówno w odniesieniu do związków chemicznych z których może powstać HCN, jak i do roślin, bakterii czy zwierząt wytwarzających te związki. Organizmy cyjanogenne zawierają przynajmniej jeden ze związków, które pod wpływem hydrolizy enzymatycznej lub pod wpływem rozcieńczonych kwasów, uwalniają HCN. Wszystkie wyizolowane dotychczas związki cyjanogenne mają strukturę β -glikozydów lub — znacznie rzadziej — estrów α -hydroksynitryli i noszą nazwę glikozydów lub lipidów cyjanogennych.

Związki cyjanogenne przyciągają w ostatnich latach coraz większą uwagę badaczy z wielu przyczyn. Jedną z nich jest wzrastające zainteresowanie w wykorzystaniu roślin strączkowych jako uzupełnienia zapotrzebowania na białko. Wśród tych roślin jest wiele gatunków cyjanogennych, toteż istotnym staje się ustalenie ich potencjalnej toksyczności (np. 5, 6). Ponownie wzrosło zainteresowanie amygdaliną, stosowaną w medycynie ludowej przy leczeniu rozmaitych schorzeń, ze względu na jej własności terapeutyczne w leczeniu chorób nowotworowych. Jak dotychczas nie znaleziono naukowego uzasadnienia takiej terapii (7, 8, 9, 10, 11, 12). Ze względu na dużą aktywność biologiczną HCN (klasyczny inhibitor oksydazy cytochromowej) zjawisko cyjanogenezy przyciąga również od lat uwagę biochemików i fizjologów roślin (13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23).

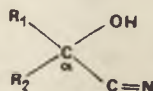
II. Struktura związków cyjanogennych

W tabelach 1—3 przedstawiono wzory strukturalne 39 wykrytych dotąd związków cyjanogennych. Wspólną cechą tych związków jest struktura α -hydroksy nitrylu (Ryc. 1), natomiast różnice dotyczą:

1. struktury podstawnika blokującego grupę α -hydroksylową,
2. budowy rodników R_1 i R_2 ,
3. asymetrii atomu węgla.

W większości glikozydów cyjanogennych grupa α -hydroksylowa jest związana z D-glukopyranozą, połączoną wiązaniem β -z aglikonem. Do wyjątków, w których część węglowodanowa jest biozą należą:

- linustatyna (II), neolinustatyna (IV) i amygdalina (XIX) (gencjobiozydy),
- wicjanina (XX) i proakaciberyna (VII) (wicjanozydy),
- lukumina (XXI) i ksylozyd zieryny (XXIV) (primawerozydy).



Ryc. 1. α -hydroksynitryl

W lipidach cyjanogennych o strukturze monoestrów (IX), grupa α -hydroksylowa podstawiona jest wyłącznie przez C_{20} nasycone (arachidonowy) lub C_{20} jednonienasycone (prawdopodobnie Δ^9) reszty kwasowe (33). W lipidach cyjanogennych zawierających 2 reszty acylowe (VIII), zróżnicowanie długości łańcucha węglowego jest większe. Stwierdzono występowanie C_{14} , C_{16} , C_{18} i C_{20} reszt kwasowych nasyconych i jednonienasyconych.

Inne różnice obejmują budowę rodników R_1 i R_2 . W większości związków cyjanogennych rodnik R_1 jest resztą alifatyczną lub aromatyczną. I tak np. linamaryna (I) i wszystkie znane lipidy cyjanogenne (VIII, IX) są pochodnymi alifatycznych α -hydroksynitryli, natomiast amygdalina (XIX) jest glikozydem aromatycznego α -hydroksynitrylu. Do wyjątków należy triglocholina (XXIX) i jej ester metylowy (XXX) oraz grupa glikozydów, których aglikon ma strukturę cyklopentenu (XXXI—XXXV) i akalifina (XXXVI). W tym przypadku rodniki R_1 i R_2 są elementami pierścienia. W większości związków cyjanogennych R_2 jest atomem wodoru. Do wyjątków, poza wzmiankowanymi triglocholiną, jej estrem metylowym, oraz glikozydami, których aglikon ma strukturę cyklopentenu należą linamaryna (I) i lotaustralina (III), w których R_2 jest grupą metylową.

Trzeci rodzaj różnic strukturalnych wynika z faktu, że rodniki R_1 i R_2 są różne w większości związków cyjanogennych. Powoduje to asymetrię atomu węgla α i wprowadza możliwość występowania epimerycznych par, różniących się konfiguracją tylko przy tym atomie węgla. Stwierdzono występowanie szeregu takich epimerycznych par w naturze (np. (S)-diuryna (XXVI) i (R)-taksifilina (XXV); (S)-zieryna (XXIII) i (R)-holokalina (XXII); (S)-sambunigryna (XVIII) i (R)-prunazyna (XVII), ale zazwyczaj nie występują one łącznie w tej samej roślinie.

Proponowano rozmaite sposoby klasyfikacji związków cyjanogennych. E y j ó l f s s o n (81) zaproponował klasyfikację opartą na strukturze rodników R_1 i R_2 . Natomiast C o n n (82) i S e i g l e r (83) doko-

Tabela 1.

Związki cyjanogenne — pochodne waliny, izoleucyny i leucyny

L.p.	Nazwa zwyczajowa	Nazwa	Wzór	Piśmiennictwo
I	Linamaryna	2-O-β-D-glukopyranozyd propionylu nitylu		24, 25
II.	Linustatyna	2-O-/6-O-β-D-glukopyranozylo/-β-D-glukopyrano- zyd 2-hydroksy-2-metylopropionylu nitylu		26
III.	Lotaustralina	2-O-β-D-glukopyranozyd -/2R/-butyrylo nitylu		27
IV.	Neolinustatyna	2-O-/6-O-β-D-glukopyranozylo/-β-D-glukopyrano- zyd 2-metylo-/2R/-butyrylo nitylu		26
V.	Epoksyd sarmentozyny*)	4-O-β-D-glukopyranozyd 2,3-epoksy-4-hydroksy- 2-hydroksymetylo-butyrylo nitylu (2R i 3R lub 2S i 3S)		27
VI.	Proakacjetalina	2-O-β-D-glukopyranozyd 2-hydroksy-3-metyleno- -/2S/-butyrylo nitylu		28

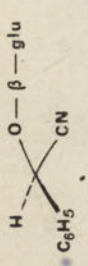
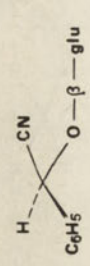
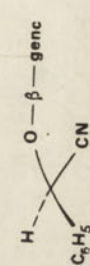
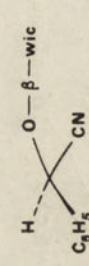
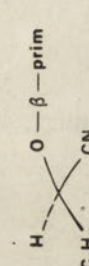
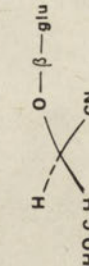
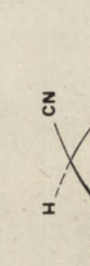
L.p.	Nazwa zwyczajowa	Nazwa	Wzór	Piśmiennictwo
VII.	Proakaciberyna	2-O-/6-O- α -L-arabopyranozylo/- β -D-glukopyrano- zyd 2-hydroksy-3-metyleno-/2S/-butyrylo nitylu		29
VIII.	Cyjanolipid typ I	ester diacylowy 2,4-dihydroksy-3-metyleno-bu- tyrylo nitylu	<p>$n = 14, 16, 18$ lub 20</p>	30, 31, 32
IX.	Cyjanolipid typ IV	ester acylowy 2-hydroksy-3-metyleno-butyrylo nit- rylu	<p>$R = CO.C_{19}H_{39}$ lub $CO.C_{19}H_{37}$</p>	30, 33
X	Heterodendryna (dihydroakacipetalina)	2-O- β -D-glukopyranozyd -/2S/-butyrylo nitylu		34, 35, 36
XI	Epiheterodendryna	2-O- β -D-glukopyranozyd -/2R/-butyrylo nitylu		37

c.d. tabeli 1.

L.p.	Nazwa zwyczajowa	Nazwa	Wzór	Písmiennictwo
XII	3-hydroksy-heterodendryna	2-O-β-D-glukopyranozyd lo-/2S/-butyrylo nitylu		38
XIII	Kardiospermina	2-O-β-D-glukopyranozyd no-/2S/-butyrylo nitylu		39, 40
XIV	4-hydroksy-benzoestan kardiosperminy	2-O-β-D-glukopyranozyd -2,4-dihydroksy-3-metyleno-/2S/-butyrylo nitylu		39, 41
XV	Siarczan kardiosperminy	2-O-β-D-glukopyranozyd ksey-3-metyleno-/2S/-butyrylo nitylu		42
XVI	4-kumaraniny	2-O-β-D-glukopyranozyd moilo/-2,4-dihydroksy-3-metyleno-/2S/-butyrylo nitylu		43

e) Epoksyd sarmentozyny nie jest typowym związkiem cyjanogennym, niemniej cyjanowodór uwalnia się spontanicznie po hydrolizie mostka epoksydowego.
Objaśnienia skrótów: glu — glukopyranoza, genc — gencjioza, wic — wicianoza

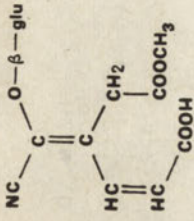
Tabela 2

L.p.	Nazwa zwyczajowa	Nazwa	Wzór	Pismienictwo
XVII	Prunazyina	2-O-β-D-glukopyranozyd /R/-mandelonitrylu		39, 44, 45, 46, 47
XVIII	Sambunigryna	2-O-β-D-glukopyranozyd /S/-mandelonitrylu		39, 44, 45
XIX	Amygdalina	2-O-/6-O-β-D-glukopyranozyd /-β-D-glukopyranozyd /R/ mandelonitrylu		39, 48, 49, 50
XX	Wicjanina	2-O-/6-O-α-L-arabopyranozyd /-β-D-glukopyranozyd /R/ mandelonitrylu		51, 52, 53
XXI	Lukumina	2-O-/6-O-β-D-ksylopyranozyd /-β-D-glukopyranozyd /R/mandelonitrylu		54
XXII	Holokalina (m-hydroksyprunazyina)	2-O-β-D-glukopyranozyd /R/-3-hydroksy mandelonitrylu		55, 56
XXIII	Zjeryna	2-O-β-D-glukopyranozyd /S/-3-hydroksy mandelonitrylu		56, 57

c.d. tabeli 2.

L.p.	Nazwa zwyczajna	Nazwa	Wzór	Piśmiennictwo
XXIV	Ksyozyd zjeryny	2-O-β-D-ksylopyranozylo/-β-D-glukopyranozyd /S/-3-hydroksy mandelonitrylu	<p>mHO.C₆H₄ H CN O-β-glu</p>	58
XXV	Taksyfilina	2-O-β-D-glukopyranozyd /R/-4-hydroksymandelonitrylu	<p>HO.C₆H₄ H O-β-glu CN</p>	39, 59, 60, 61
XXVI	Diuryna	2-O-β-D-glukopyranozyd /S/-4-hydroksymandelonitrylu	<p>HO.C₆H₄ H O-β-glu CN</p>	39, 60, 61, 62, 63
XXVII	„Nandina” glukozyd	4-O-β-D-glukopyranozyd mandelonitrylu	<p>H CN OH glu-β-O-C₆H₄</p>	64
XXVIII	Proteacyna	2,4-di-O-β-D-glukopyranozyd /S/-4-hydroksymandelonitrylu	<p>H CN OH glu-β-O-C₆H₄</p>	65, 66
XXIX	Tryglocholina	2-O-β-D-glukopyranozyd mononitrylu kwasu 2-hydroksy-3-karboksymetylo heksa-2,4-dienowego	<p>NC C O-β-glu C CH₂ COOH</p> <p>HC HC</p>	67, 68

c.d. tabeli 2

L.p.	Nazwa zwyczajowa	Nazwa	Wzór	Piśmiennictwo
XXX	Ester metylowy Tryglochimy	2' ester metylowy 2-O-β-D-glukopyranozydu mononitrylu kwasu 2-hydroksy-3-karboksymety- loheksa-2,4-dienowego		69

Objasnienia skrótów: glu — glukopyranoza, genc — gencjioza, wic — wicjanoza, prin — primaweroza

Tabela 3.

Związki cyjanogenne pochodne aminokwasów niebiałkowych

L.p.	Nazwa zwyczajowa	Nazwa	Wzór	Piśmiennictwo
XXXI	Gynokardina	1-O-β-D-glukopyranozyd drosy cyklopentenu-2		70, 71, 72
XXXII	Deidaklina /tetrafilina A/	1-O-β-D-glukopyranozyd cyklopentenu-2		73, 74
XXXIII	Barteryna /tetrafilina B/	1-O-β-D-glukopyranozyd cyklopentenu-2		72, 74-76 75
XXXIV	Epitetrafilina B	1-O-β-D-glukopyranozyd cyklopentenu-2		
XXXV	Passikapsyna /boiwinozyd /epi/ tetra- filiny B/	1-O-β-D-glukopyranozyd 4-O-β-D/L /-boiwino- zyd/ = 2,6-didezoksy-ksyloheksopyranozyd/ 1-cyja- no-1,4-dihydroksy cyklopentenu-2		77
XXXVI	Akalifina	3-O-β-D-glukopyranozyd -3-cyjano-4-metoksy-2,3-dihidropirydonu-6		78
XXXVII	„Polydesmus” glukozyd	2-O-β-D-glukopyranozyd nitrylu		79

c.d. tabeli 3.

L.p.	Nazwa zwyczajowa	Nazwa	Wzór	Piśmiennictwo
XXXVIII		Cyjanohydrina kwasu glioksalowego		80
XXXIX		Cyjanohydrina kwasu pirogronowego		80

Objaśnienia skrótów: glu — glukopyranoza, bolw — bolwinoza

nali klasyfikacji związków cyjanogennych na podstawie ustalonej lub przewidywanej biogenezy tych substancji. Klasyfikacja oparta na takim kryterium została przyjęta również w niniejszym artykule.

III. Rozpowszechnienie cyjanogenezy

Uznanie danego gatunku jako niecyjanogennej napotyka często na duże trudności. Zawartość związków cyjanogennych jest bardzo zróżnicowana, od ilości śladowych do 0.3—0.5% świeżej masy w liściach *Nandina domestica* (64) czy 0.5—0.6% w nasionach innej rośliny tropikalnej *Gynocardia odorata* (70). Poza tym istotną rolę odgrywają takie czynniki jak wiek rośliny, nagromadzanie związków cyjanogennych w różnych organach, oraz wpływ środowiska (klimat, położenie geograficzne itp.). Ponieważ testy chemiczne nie są zbyt czułe i specyficzne, klasyfikacja danego gatunku jako niecyjanogennej jest bezpodstawną o ile poszukiwań nie przeprowadzono na poziomie enzymatycznym.

Według Hegnauera (84) poznano obecnie 25 gatunków cyjanogennych grzybów, ok. 50 gatunków paproci, 6 gatunków cyjanogennych Nagonasiennych i ok. 2000 gatunków Okrytonasiennych.

III-1. Cyjanogeneza w roślinach wyższych

Zagadnieniu temu poświęcone są liczne prace Hegnauera i jego współpracowników (84—106). W pracy Seiglera (107) można znaleźć zestawienie rozpowszechnienia glikozydów cyjanogennych obejmujące literaturę do roku 1976 włącznie.

Chociaż poznano wiele roślin cyjanogennych, tylko w stosunkowo nielicznych przypadkach wyizolowano i zidentyfikowano związki odpowiedzialne za zjawisko cyjanogenezy. Toteż wykorzystanie tych substancji do celów taksonomicznych napotyka na trudności. Niemniej na podstawie obecnie posiadanych danych, można stwierdzić, że diuryna (XXVI) występuje głównie w roślinach należących do rodziny Traw (*Gramineae*), prunazyne (XVII) i amygdalina (XIX) — w roślinach z rodziny Różowatych (*Rosaceae*), a proakacipetalina (VI) w roślinach z rodzaju *Acacia* (rodzina Czułkowate — *Mimosaceae*). Wydaje się, że występowanie związków powstających z tyrozyny — proteacyny (XXVIII) i triglochiny (XXIX) — związane jest głównie z podklasą *Magnoliidae* (dwuliścienne). Niemniej obecność triglochiny stwierdzono również w rodzinach: Bagnicowate (*Scheuzeriaceae*), Sitowate (*Juncaceae*) i Obrazkowate (*Araceae*) (jednuliścienne). Związki cyjanogenne, będące pochodnymi cyklopentenu (XXXI—XXXV), zidentyfikowano w dwóch spokrewnionych ze sobą rodzinach: *Passifloraceae* i *Flacourtiaceae*. Linamaryna

(I) i lotaustralina (III) występują w wielu rodzinach, często bardzo odległych taksonomicznie (108). Występowanie lipidów cyjanogennych (VIII, IX) odnotowano dotychczas w obrębie tylko jednej rodziny *Sapindaceae* (30). Na uwagę w tym miejscu zasługuje fakt, że proces cyjanogenezy w wielu gatunkach roślin jest polimorficzny (16, 109).

III-2. Cyjanogeneza u bakterii i grzybów

Cyjanogenezę wykryto u *Pseudomonas aureofaciens*, *P. aeruginosa*, *P. chloroamphis* i *Chromobacterium violaceum* (rodzina *Pseudomonadaceae*) (110—118).

Nie poznano dotąd mechanizmu cyjanogenezy u bakterii. Wiadomo jednak, że glicyna jest prekursorem powstającego cyjanowodoru, ponieważ metylenowy atom węgla tego aminokwasu przekształca się w atom węgla grupy nitrylowej (116, 119—122). Jak dotychczas, brak doniesień o powstawaniu związków cyjanogennych u bakterii.

Według Hegnauera (91) 25 gatunków znanych grzybów cyjanogennych należy głównie do rodzaju *Clitocybe* i *Marasmius*. Ponadto wykazano obecność linamaryny (I) i lotaustraliny (III) w niezidentyfikowanych psychrofilnych podstawczakach (123). Wyniki dalszych prac, prowadzonych na tym samym materiale, nie potwierdziły jednak występowania w nim glikozydów cyjanogennych, natomiast wykazały, że głównym związkiem cyjanogennym, obecnym w ekstrakcie z psychrofilnych podstawczaków jest cyjanohydryna kwasu glioksalowego (XXXVIII) oraz cyjanohydryna kwasu pirogronowego (XXXIX) (80, 124—127). Również w *Marasmius oreades* stwierdzono obecność związku cyjanogennego, prawdopodobnie identycznego z cyjanohydryną kwasu glioksalowego (128). Ponieważ wykazano, że najlepszym prekursorem HCN, zarówno u bakterii jak i u grzybów jest glicyna, prawdopodobnie mechanizm cyjanogenezy w organizmach obu typów jest podobny (129).

III-3. Cyjanogeneza u zwierząt

Cyjanogeneza jest szeroko rozpowszechniona u Wijów (*Myriapoda*), wśród których wykryto 8 gatunków cyjanogennych (130, 131). Nie poznano dotąd mechanizmu cyjanogenezy w tych organizmach. Prawdopodobnie cyjanogeneza przebiega podobnie jak w roślinach wyższych ponieważ w kilku przypadkach wykryto obecność mandelonitrylu (132—135). Cyjanogenezę zaobserwowano również w tkankach ciem 38 gatunków podrodziny Kraśnikowatych (*Zygeninae*). W zmiażdżonych tkankach tych owadów we wszystkich stadiach cyklu życiowego wykryto cyjanowódor (136, 137). Stwierdzono, że źródłem HCN we wszystkich przebadanych

nych przypadkach są dwa glukozydy cyjanogenne: linamaryna (I) i lotaustralina (III) (137, 138). Te same związki zidentyfikowano w tropikalnych motylach, należących do rodzin *Acraea* i *Heliconidae* (139).

IV. Właściwości i identyfikacja związków cyjanogennych

Wykrycie obecności związku cyjanogennego w badanym materiale przeprowadza się zwykle w sposób pośredni, poprzez stwierdzenie obecności HCN uwalnianego w wyniku hydrolizy chemicznej lub enzymatycznej. Opracowano wiele metod wykrywania i ilościowego oznaczania HCN (81, 140—153). Niektóre z nich umożliwiają oznaczanie nanogramowych ilości HCN. Zastosowanie chromatografii gazowej również umożliwiło opracowanie bardzo czułych metod ilościowego oznaczania HCN (154—156).

Ey j o l f s s o n (81) i S e i g l e r (83, 107) opisali szczegółowo metody izolowania i oczyszczania glikozydów cyjanogennych, a M i k o ł a j c z a k (30) lipidów cyjanogennych.

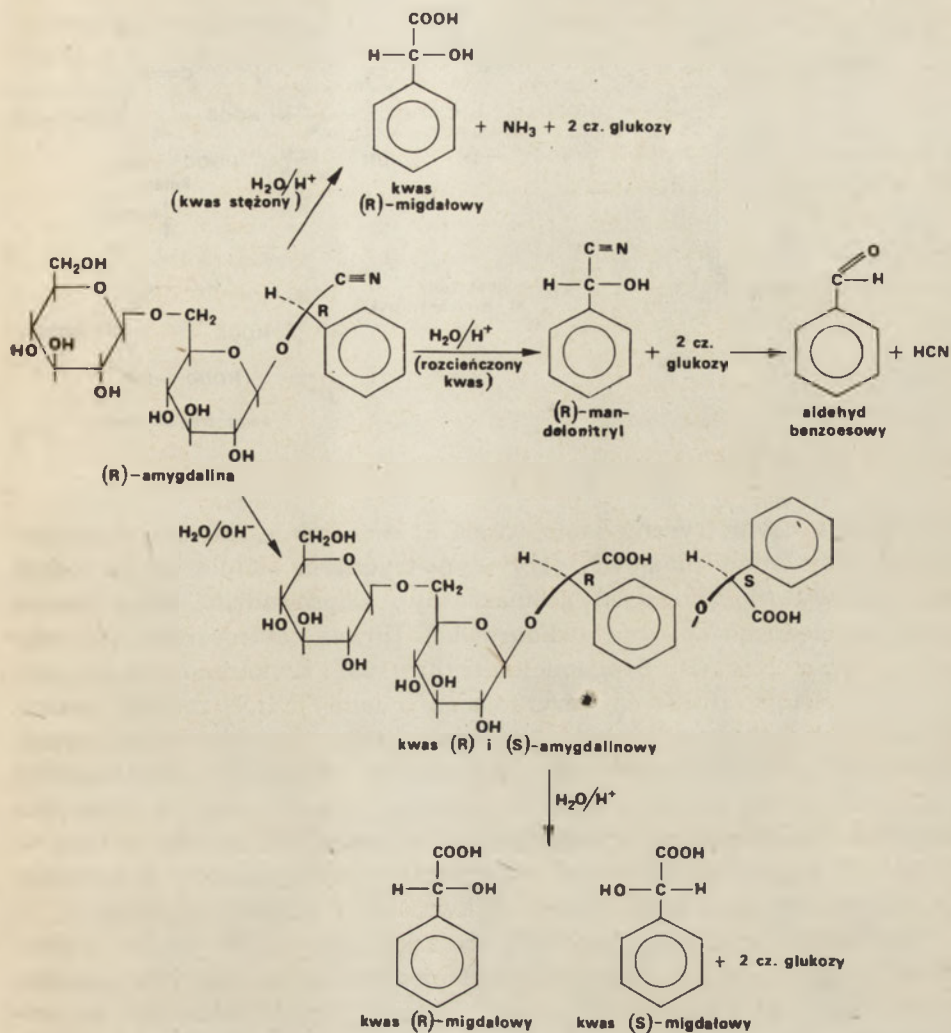
Wiązania β -glikozydowe glikozydów cyjanogennych ulegają łatwo hydrolizie enzymatycznej lub w roztworach rozcieńczonych kwasów (ok. 0.1 N) w podwyższonej temperaturze, uwalniając składnik cukrowy i α -hydroksynitryl. α -Hydroksynitryl dysocjuje na HCN i odpowiedni związek karbonylowy.

Działanie bardziej stężonymi roztworami kwasów (np. 1 N HCl lub 1 N H_2SO_4) prowadzi na ogół do powstania odpowiedniego α -hydroksykwasu i NH_3 , oraz do uwolnienia cząsteczki cukru. (np. w wyniku hydrolizy (R)-prunazyny (XVII) powstaje kwas (R)-migdałowy).

Łagodna hydroliza zasadowa powoduje uwodnienie grupy nitrylowej do grupy karboksylowej i NH_3 , nie naruszając pozostałych wiązań. W wyniku tej reakcji powstaje kwas glikozydowy.

We wczesnych badaniach nad chemią glikozydów cyjanogennych zajmowano się najczęściej amygdaliną (XIX) ze względu na jej dostępność (161). Stwierdzono, że hydroliza amygdaliny w roztworze 0.1 N HCL zachodzi z dostrzegalną szybkością dopiero w temperaturze powyżej 60°C. W wyniku hydrolizy pod wpływem gorącego, 4 N HCL, powstaje kwas migdałowy i NH_3 . Alkaliczna hydroliza amygdaliny do kwasu amygdalinowego (3) zachodzi poprzez pośrednie stadium amidu. Reakcje zachodzące podczas chemicznej hydrolizy glikozydów cyjanogennych przedstawiono na Rycinie 2, na przykładzie amygdaliny.

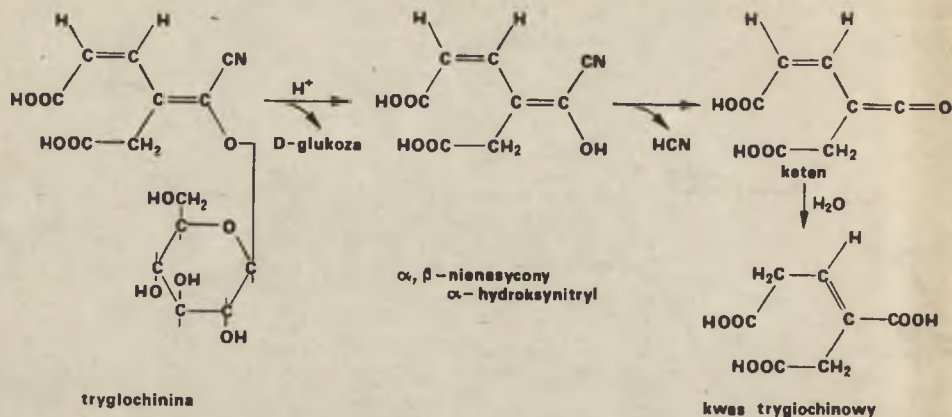
Hydroliza związków typu gynokodiny (XXXI) i glikozydów α , β -nienasyconych α -hydroksynitryli, aczkolwiek formalnie przebiega zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 2 nie prowadzi do powstania okso-związków, jako trwałych produktów końcowych (28, 67, 70). I tak np. w przypadku triglochiny (XXIX) produktami hydrolizy kwa-



Ryc. 2. Hydroliza chemiczna amygdaliny

sowej są glukoza, HCN i kwas triglochinyowy (Ryc. 3). Oczekiwany oksowiązkiem jest keten, przekształcający się w kwas triglochinyowy w wyniku przyłączenia cząsteczki wody na krańcach układu sprzężonego. W roztworze $\text{Ba}(\text{OH})_2$ triglochinyna ulega rozkładowi nawet już w stosunkowo niskiej temperaturze. Podobnie diuryna (XXVI) i jej epimer taksifilina (XXV), w przeciwieństwie do amygdaliny i prunazy, są nietrwałe w roztworach rozcieńczonych zasad i już w temperaturze pokojowej ulegają szybkiej hydrolizie do glukozy, HCN i aldehydu p-hydroksybenzoesowego (162).

Podczas hydrolizy zasadowej nawet przy użyciu bardzo rozcieńczonych zasad (0.01 N), bardzo łatwo zachodzi epimeryzacja glikozydów za-



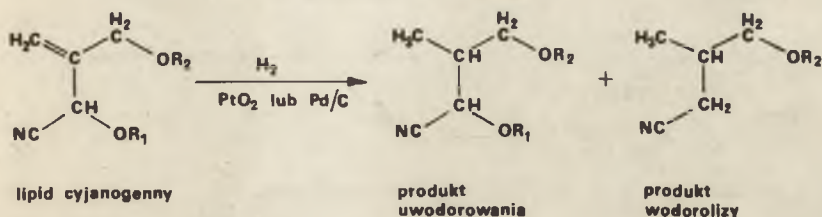
Ryc. 3. Kwasowa hydroliza tryglochiny

wierających asymetryczny atom węgla α ; szczególnie łatwa jest epimeryzacja glikozydów mających przy asymetrycznym atomie węgla rodnik elektrofilowy (np. pierścień aromatyczny). Doprowadziło to w swoim czasie do błędnego opisanie w Laurowiśni (*Prunus laurocerasus* L.) mieszaniny epimerów (R, S)-mandelonitrylu (163). Wykazano, że w podwyższonej temperaturze epimeryzacja amygdaliny (XIX) zachodzi nawet w środowisku obojętnym (164). Glikozydy, które są pochodnymi asymetrycznych trzeciorzędowych α -hydroksynitryli, jak np. lotaustralina (III) czy gynokardina (XXXI) trudniej ulegają epimeryzacji, a hydroliza kwasowa praktycznie nie powoduje epimeryzacji. W związku z tym, w badaniach nad ustaleniem absolutnej konfiguracji aglikonów glikozydów cyjanogennych, stosowano hydrolizę kwasową lub enzymatyczną.

Powstające w wyniku hydrolizy związki karbonylowe można wyizolować i zidentyfikować poprzez destylację, chromatografię lub po przeprowadzeniu w 2,4-dwunitrofenylohydrazony, fenylohydrazony lub semikarbazony, jak i stosując spektroskopię w UV i IR (24, 53, 54, 55, 61, 66, 165, 166). Identyfikację cukrów w hydrolizacie przeprowadzano najczęściej stosując chromatografię bibułową, cienkowarstwową oraz gazową. W przypadku biozydów, stosowano metylację glikozydu przed hydrolizą, w celu zlokalizowania połączenia między cząsteczkami cukrów (53, 54).

Właściwości lipidów cyjanogennych (VIII, IX) mało różnią się od właściwości innych estrów kwasów tłuszczowych. W wyniku hydrolizy zasadowej lub enzymatycznej (lipaza EC 3.1.1.3) uwalniają się kwasy tłuszczowe. Natomiast bardzo nietrwały jest alkoholowy składnik tych estrów, o strukturze hydroksy- lub dwuhydroksynitrylu i nie udało się go wyizolować nawet z hydrolizatu enzymatycznego, pomimo łagodnych warunków (167). Czyni to ustalenie struktury takich połączeń bardzo trudnym. Z tego względu przed uwolnieniem części hydroksynitrylowej,

cyjanolipid poddawano uwodrorowaniu, lub, w przypadku dwuustru (VIII) — częściowej wodorolizie. Nasycenie podwójnego wiązania hydroksynitrylu zwiększało jego trwałość w niezestryfikowanej formie (159, 160, 167) (Ryc. 4).



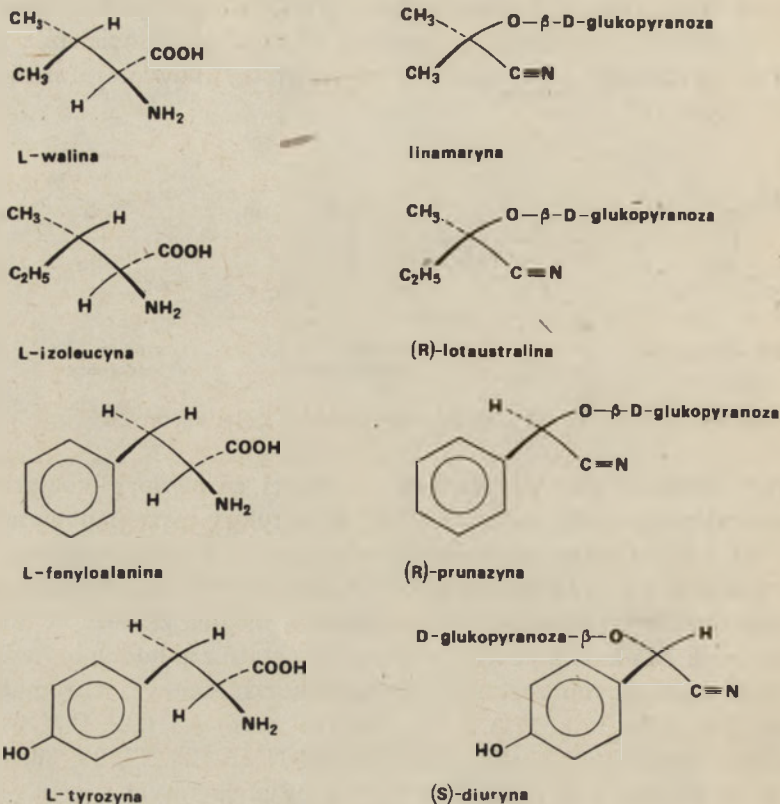
Ryc. 4. Reakcja uwodrorowania i wodorolizy lipidów cyjanogennych

Szereg chemicznych i fizycznych własności zarówno glikozydów, jak i lipidów cyjanogennych można znaleźć w artykule przeglądowym Seiglera (83, 107). Godne polecenia są również dwa opracowania przygotowane przez Eyjólfssona (67) i Nahrstedta (168). Wyczerpujące opracowanie właściwości cyjanolipidów można znaleźć w artykule przeglądowym Mikołajczaka (30). W ostatnich latach pojawiło się szereg prac opisujących zastosowanie wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (30, 169, 170, 171), spektrometrii masowej (30, 42, 169, 172), NMR spektrometrii (30, 37, 75, 173, 174), ¹³C-NMR (26, 27, 29, 38, 78, 169, 170, 175) w ustalaniu struktury związków cyjanogennych.

V. Metabolizm związków cyjanogennych

V-1. Biosynteza związków cyjanogennych

Wyniki badań nad biosyntezą związków cyjanogennych *in vivo*, doprowadziły w latach sześćdziesiątych do ustalenia zależności prekursor — produkt, między L-aminokwasami a aglikonami glikozydów cyjanogennych (64, 144, 165, 176—186). W doświadczeniach tych aminokwasy, znakowane ¹⁴C na jednym lub więcej atomach węgla, podawano całym siewkom, pędom lub liściom szeregu roślin cyjanogennych i następnie ustalano ich efektywność jako prekursorów związków cyjanogennych. Prace te umożliwiły zidentyfikowanie L-fenylalaniny, L-tyrozyny, L-waliny i L-izoleucyny, jako pierwszorzędowych metabolitów, których atomy węgla włączane są do aglikonów prunazyny (XVII), diuryny (XXVI), linamaryny (I) i lotaustraliny (III) (Ryc. 5). Ponieważ aglikony ok. 20 innych znanych glikozydów syjanogennych są takie same lub enancjomeryczne, wyniki wczesnych badań doprowadziły do wyjaśnienia biogenezy wielu związków cyjanogennych.



Ryc. 5. Aminokwasy prekursorowe i odpowiadające im glikozydy cyjanogenne.

Przekształcenie rodnika aminokwasu, już po jego wejściu na drogę przemian prowadzących do α -hydroksynitrylu, może doprowadzić do produktu końcowego, w którym rodnik R nie wykazuje podobieństwa do rodnika w macierzystym aminokwasie. Do najbardziej charakterystycznych modyfikacji można zaliczyć:

1. rozerwanie pierścienia aromatycznego, poprzedzone ortohydroksylacją. Np. przekształcenie diuryny (XXVI) w triglochininę (XXIX) (67, 69, 187). Następująca często po tym reakcja metylowania prowadzi do powstania metylowego estru triglochiny (XXX).

2. wprowadzenie podwójnego wiązania w rodniku, mające miejsce np. podczas przekształcania L-leucyny w związki typu proakacipetaliny (VI) i lipidy cyjanogenne (VIII, IX) (30, 35, 157, 188). Natomiast glikozydy cyjanogenne z pierścieniem cyklopentenowym (XXXI—XXXV) można wyprowadzić z niebiałkowego aminokwasu L-2-cyklopenten-1-glicyny (73).

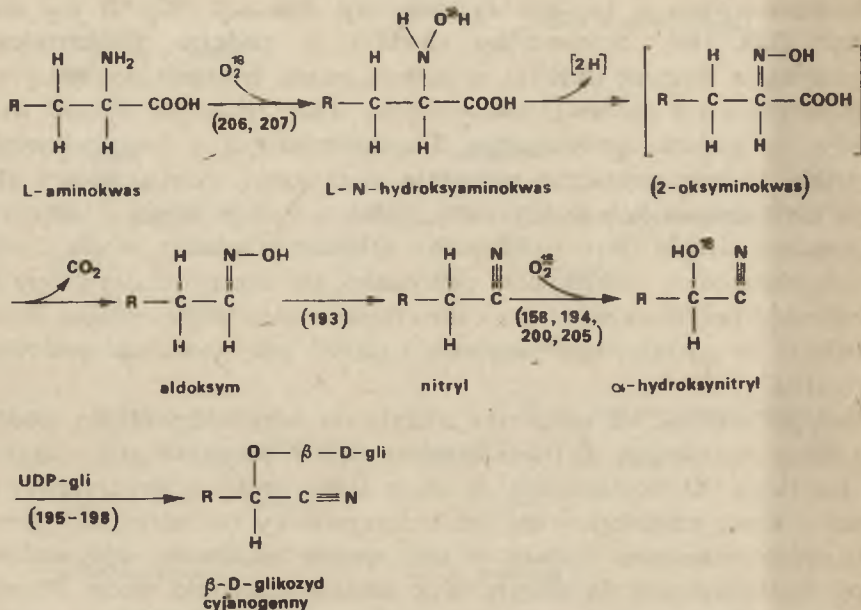
Wyniki doświadczeń, w których roślinie cyjanogennej podawano aminokwas znakowany podwójnie (^{14}C i ^{15}N) wskazały, że podczas przekształ-

cenia aminokwasu w związek cyjanogeny, stosunek $^{14}\text{C} : ^{15}\text{N}$ nie ulega zmianie (179, 186). Stwierdzono również że podczas przekształcania L-tyrozyny w diurynę (XXVI), w łańcuchach prosta, wiązanie pomiędzy atomami węgla α i β pozostaje nienaruszone (180). Powyższe wyniki wskazywały, że podczas powstawania α -hydroksynitryli z L-aminokwasów, wszystkie związki pośrednie zawierają atom azotu. Karboksylowy atom węgla aminokwasu jest eliminowany, natomiast atom węgla α utlenia się do poziomu nitrylu (4-ro elektronowe utlenienie) a atom węgla β ulega hydroksylacji (dwu elektronowe utlenienie). Do tak powstałej grupy hydroksylowej przyłącza się reszta cukru (bądź kwasu tłuszczowego). Doprowadziło to do postulowania oksymów i nitryli jako związków pośrednich (180—193).

Badając mechanizm utlenienia nitrylu do α -hydroksynitrylu, podczas biosyntezy linamaryny (I) i lotaustraliny (III) w siewkach lnu, z użyciem izotopu tlenu ^{18}O , stwierdzono, że atom tlenu grupy hydroksylowej pochodzi z tlenu cząsteczkowego, co wskazywałoby na udział oksygenazy (161). Wyeliminowana została w ten sposób możliwość wprowadzenia grupy hydroksylowej do nitrylu przy udziale cząsteczki wody. Potwierdzono to w trakcie badań nad powstawaniem diuryny (XXVI) w siewkach cisu (194). W doświadczeniach tych, stosując stereospecyficznie znakowaną (3S)- i (3R)-L-tyrozinę- $3\text{-}^3\text{H}$, stwierdzono zachowanie konfiguracji przy atomie węgla 3, w trakcie biosyntezy diuryny.

Słuszność postulowanych przemian potwierdzono w sposób bezpośredni wykazując obecność enzymów katalizujących poszczególne reakcje. Pierwszymi zbadanymi enzymami, uczestniczącymi w biosyntezie związków cyjanogennych, były enzymy katalizujące ostatnią reakcję, w której następuje glikozylacja α -hydroksynitrylu. Wyizolowano z lnu (195, 196) i z prosa (197) glukozylotransferazy, które katalizują przeniesienie cząsteczki glukozy z UDP-glukozy na odpowiedni α -hydroksynitryl. Oba enzymy katalizują powstawanie β -glukozydów i wykazują absolutną specyficzność względem UDP-glukozy. Enzym z lnu preferuje alifatyczne α -hydroksynitryle jako substraty, a enzym z prosa — pochodne aromatyczne. Dane dotyczące aktywności glukozylotransferazy z świbki morskiej, świadczą, że wykazuje ona absolutną stereospecyficzność wobec 4-hydroksy-(R)-mandelonitrylu, tak jak glukozylotransferaza z prosa wobec odpowiedniego (S)-epimeru (198). Wykazano następnie, że frakcja enzymatyczna z homogenatów prosa, związana z błonami reticulum endoplazmatycznego, zawiera hydroksylazy katalizujące hydroksylację tyrozyny do N-hydroksytyrozyny oraz 4-hydroksyfenyloacetonitrylu, z wytworzeniem 4-hydroksy-(S)-mandelonitrylu, przy udziale tlenu cząsteczkowego i NADPH (200, 201).

Przedstawione wyniki doprowadziły do opisania drogi biosyntezy związków cyjanogennych (Ryc. 6). Mechanizm przekształcenia L-aminokwasu w oksym aldehydu (aldoksym) pozostawał najdłużej niewyjaśnio-



Ryc. 6. Biosynteza glikozydów cyjanogennych

ny. Conn (202), biorąc pod uwagę, że N-hydroksyfenyloalanina przekształca się w wyniku oksydacyjnej dekarboksylacji, katalizowanej przez preparat enzymatyczny z nasturcji większej (*Tropaeolum maius*), w oksym aldehydu fenyllooctowego (203) przypuszczał, że oksydacyjna dekarboksylacja L-aminokwasu, prowadząca do powstania oksymu może przebiegać w trzech etapach: dwu—elektronowe utlenienie aminokwasu do N-hydroksyaminokwasu, dwu—elektronowe utlenienie N-hydroksyaminokwasu do 2-oksyliminokwasu i dekarboksylacja.

Wyniki badań, prowadzonych w układach bezkomórkowych, potwierdziły schemat przekształceń prowadzących do L-aminokwasu do związku cyjanogennego, zaproponowany na podstawie doświadczeń wykonanych *in vivo*. McFarlane i wsp. (204), jako pierwsi, przeprowadzili syntezę diuryny *in vitro*. Wykazali oni, że mikrosomalne preparaty z prosa przekształcają L-tyrozynę w 4-hydroksy-(S)-mandelonitryl. Dodanie UDP-glukozy i rozpuszczalnej frakcji enzymatycznej umożliwiło całkowitą syntezę diuryny. Następnie przeprowadzono *in vitro* biosyntezę taksifiliny (XXV) (epimer diuryny) z L-tyrozyny, posługując się frakcją mikrosomalną i rozpuszczalnych białek z siewek świbki morskiej (198, 199). Prowadząc badania nad biosyntezą diuryny *in vitro*, wykazano jednoznacznie, że związkiem pośrednim przy przekształcaniu oksymu aldehydu 4-hydroksyfenyllooctowego w 4-hydroksy-(S)-mandelonitryl jest nitryl a nie oksym 2-hydroksyaldehydu, tzn. że hydroksylacja zachodzi dopiero na poziomie nitrylu (205).

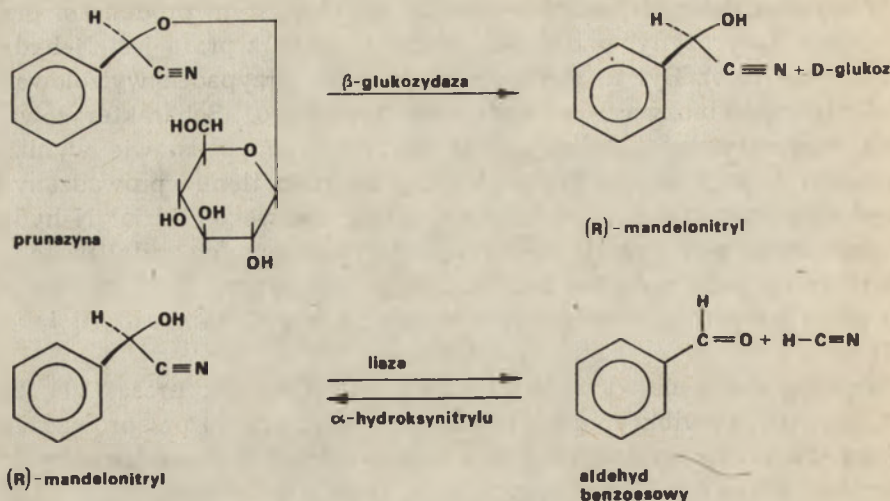
W wyniku dalszych badań wykazano, że pierwszym produktem przekształcenia L-tyrozyny, przez mikrosomalny układ z prosa jest N-hydroksytyrozyna (206). Był to pierwszy odnotowany przypadek wyizolowania α -N-hydroksyaminokwasu z materiału roślinnego. Scharakteryzowano układ enzymatyczny katalizujący tę reakcję, a na podstawie wyników otrzymanych przy użyciu $^{18}\text{O}_2$ wykazano, że atom tlenu wprowadzany do N-hydroksytyrozyny, pochodzi z tlenu cząsteczkowego. Udział N-hydroksyaminokwasów w biosyntezie związków cyjanogennych został następnie potwierdzony podczas badań nad biosyntezą linamaryny (I) i lotaustraliny (III) przez preparaty mikrosomalne z siewek lnu (*Linum usitatissimum*) (207).

Wspólną cechą układów bezkomórkowych z siewek prosa (204, 206, 208), lnu (207) i świbki morskiej (198, 199), zdolnych do przeprowadzania syntezy związków cyjanogennych z odpowiednich L-aminokwasów jest związanie aktywności enzymatycznej z frakcją mikrosomalną i nienagromadzanie się związków pośrednich podczas reakcji.

Na szczególną uwagę w tym miejscu zasługują wyniki badań Möllera i Conna (208), prowadzonych nad biosyntezą diuryny. Stwierdzili oni, że w obecności mikrosomalnego preparatu z prosa następuje wielostopniowe przekształcenie L-tyrozyny w diurynę oraz, że powstawanie kolejnych związków pośrednich wykazać można tylko w szczególnych warunkach eksperymentalnych. Co więcej reakcji tej ulegają tylko L-tyrozyna i oksym aldehydu 4-hydroksyfenylooctowego (a nie N-hydroksytyrozyna i 4-hydroksyfenyloacetonitryl). Na tej podstawie Möller i Conn (208) przyjęli, że związane z błonami enzymy katalizujące biosyntezę diuryny, tworzą wysoko uorganizowany układ kanalizujący jakby strumień metabolitów pośrednich. Stwierdzili oni, że oksym aldehydu 4-hydroksyfenylooctowego wytworzony endogennie z L-tyrozyny, ulega swobodnemu wymieszaniu z oksymem egzogennym, przy wysycających stężeniach substratu. Co więcej, w wyniku dodania tego metabolitu łącznie z tyrozyną do preparatu mikrosomalnego, 4-hydroksy-(S)-mandelonitryl powstaje głównie z aldoksymu. Wskazuje to, że ciąg reakcji prowadzący od L-tyrozyny do diuryny, katalizowany jest przez dwa układy enzymatyczne; pierwszy z nich przekształca L-tyrozinę w oksym aldehydu 4-hydroksyfenylooctowego *via* N-hydroksytyrozinę, a drugi — oksym w 4-hydroksy-(S)-mandelonitryl *via* 4-hydroksyfenyloacetonitryl.

V-2. Hydroliza enzymatyczna związków cyjanogennych

Związkom cyjanogennym towarzyszą w większości tkanek roślin cyjanogennych enzymy, zdolne do ich rozkładu. Przebieg enzymatycznej degradacji prunazyny przedstawiono na rycinie 7. Początkowo β -glukozydaza katalizuje hydrolizę wiązania między resztą cukru, najczęściejj



Ryc. 7. Enzymatyczna degradacja prunazyny

D-glukozą a α -hydroksynitrylem (cyjanohydryną). Następnie nietrwały α -hydroksynitryl dysocjuje na cząsteczkę HCN i, w przypadku prunazyny (XVII), aldehyd benzoesowy. Proces dysocjacji jest przyspieszany przez enzym liazę α -hydroksynitrylu. W wyniku enzymatycznej degradacji prunazyny powstaje więc równomolarna mieszanina HCN, aldehydu benzoesowego i glukozy, podobnie jak podczas hydrolizy pod działaniem rozcieńczonych kwasów (por. rozdz. IV).

Powyższy proces, w wyniku którego ze związku cyjanogennego uwalniany jest HCN, określany jest mianem cyjanogenezy i zachodzi intensywnie dopiero po mechanicznym uszkodzeniu tkanek rośliny cyjanogennej. Wskazywałoby to na przestrzenne (wewnątrz- lub międzykomórkowe) rozdzielanie enzymów i substratów. I tak stwierdzono, że zarówno w zielonych jak i w etiolowanych siewkach prosa cyjanogeny glukozyd, diuryna (XXVI) występuje głównie w wakuolach (209, 210). Natomiast liaza α -hydroksynitrylu występuje w cytoplazmie, zaś aktywność β -glukozydazy diuryny (diurynaza) związana jest głównie z chloroplastami (211). Ponadto wykazano, że diuryna występuje tylko w tkance epidermalnej blaszki liściowej prosa, natomiast obecność diurynazy i liazy α -hydroksynitrylu stwierdzono niemal wyłącznie w tkance mezofilowej (212). Przytoczone dane wskazują na wysoki stopień kompartmentacji glukozydu cyjanogennego i degradujących go enzymów, co w sposób naturalny ogranicza intensywność cyjanogenezy.

Amygdalina (XIX) jest nietypowym glikozydem cyjanogennym, ponieważ jest biozydem. Hydrolizę tego biozydu przeprowadzają obecne w preparacie enzymatycznym, zwanym emulsyną, trzy enzymy. Jednym z nich jest hydrolaza amygdaliny — β -glukozydaza, która katalizuje odszczepienie końcowej cząsteczki glukozy, z utworzeniem prunazyny,

2-O- β -D-glukopyranozydu (R)-mandelonitrylu. Drugim zaś enzymem jest β -glukozydaza-hydrolaza prunazyiny, katalizująca hydrolizę prunazyiny z utworzeniem (R)-mandelonitrylu. Z kolei, trzecim enzymem jest liaza α -hydroksynitrylu, katalizująca dysocjację cyjanhydryny na HCN i aldehyd benzoesowy (213—215).

Hydroliza innego biozydu — wicjaniny (XX), (2-O-) α -L-arabopyranozylo-6-O- β -D-glukopyranozydu (R)-mandelonitrylu, przebiega inaczej pod działaniem układu enzymatycznego z kiełkujących nasion wyki (*Vicia sativa*) (216). Pierwszą reakcją jest hydroliza wiązania β -glukozydowego, łączącego dwucukier — wicjanozę — z (R)-mandelonitrylem. Wicjanoza następnie ulega hydrolizie do L-arabinozy i D-glukozy. W toku hydrolizy wicjaniny nie stwierdzono pojawiania się glukozydu (R)-mandelonitrylu.

Wegetatywne tkanki i nasiona prosa (*Sorghum vulgare*) zawierają enzym (glukozydaza I), który katalizuje hydrolizę β -D-glukopyranozydu p-nitrofenolu ($K_m = 0.31$ mM), ale jest nieaktywny wobec diuryny (XXVI), występującej w tym materiale. Natomiast diuryna jest substratem ($K_m = 0.55$ mM) innego enzymu — β -glukozydazy II (217). Wskazuje to, że rośliny cyjanogenne mogą zawierać β -glukozydazy charakteryzujące się wysoką specyficnością wobec natywnych glikozydów cyjanogennych. Na przykład β -glukozydaza z alokacji olbrzymiej wykazuje wysoką specyficność w stosunku do występującej w tej roślinie triglochiny (XXIX) (218, 219). Z siewek świbki morskiej, w których stwierdzono obecność triglochiny (XXIX) i taksifiliny (XXV), wyizolowano dwie β -glukozydazy, z których jedna wykazuje wysoką specyficność w stosunku do triglochiny a druga wobec taksifiliny (220). Z tkanek pędu śliwy otrzymano preparat, który hydrolizował prunazyinę (XVII), ale był nieaktywny wobec amygdaliny (XIX) (221). Ekstrakt enzymatyczny liści kasawy (*Manihot utilissima*), w których stwierdzono obecność linamaryny (I) i lotaustraliny (III), zawiera β -glukozydazę, która wykazuje wysoką specyficność w stosunku do linamaryny i lotaustraliny, natomiast jest praktycznie nieaktywna wobec β -metyloglukopyranozydu i amygdaliny (XIX) (184). Również z nasion lnu otrzymano dwie częściowo oczyszczone frakcje β -glikozydaz. Jedna z nich hydrolizowała natywny glukozyd cyjanogeny — linamarynę (I) oraz prunazyinę (XVII), salicynę i β -D-glukopyranozyd p-nitrofenolu, a druga — amygdalinę (XIX) i celobiozę. Stwierdzono również że ekstrakty enzymatyczne, z pięciu przypadkowo dobranych gatunków roślin niecyjanogennych, nie hydrolizowały linamaryny (222).

Na szczególną uwagę zasługuje enzym — liaza α -hydroksynitrylu, wykryty w emulsynie w 1908 roku (223). Opisany w 1963 roku oczyszczony preparat liazy (R)-mandelonitrylu, z gorzkich migdałów (nasiona Migdała zwyczajnego — *Prunus amygdalus V. amara*) wymagał FAD w utlenionej formie jako grupy prostetycznej (apoenzym był całkowicie nieaktywny) (224). Było to pierwsze opisanie enzymu, który wymaga obecno-

ści kofaktora flawinowego, mimo że reakcja katalizowana nie jest procesem oksydoredukcyjnym. W 1964 roku opisano drugi enzym tego rodzaju, karboligazę glioksalanu, który również wymaga obecności FAD, chociaż nie katalizuje reakcji oksydoredukcyjnej (225). Liazę α -hydroksynitrylu wyizolowano z nasion i kwiatów szeregu przedstawicieli podrodziny śliwowych (*Prunoideae*) i z kilku gatunków podrodziny Jabłkowatych (*Pomoideae*) (226, 227). We wszystkich preparatach z roślin należących do obu podrodzin Różowatych (*Rosaceae*) stwierdzono obecność FAD jako grupy prostetycznej. Po oddzieleniu FAD uzyskiwano apoenzym, zdolny do rekombinacji z FAD. Monomeryczna liaza α -hydroksynitrylu z gorzkich migdałów, zawiera 1 mol FAD/mol białka. Apoenzym jest katalitycznie nieaktywny, a aktywność można w pełni zregenerować przez dodanie FAD w utlenionej postaci. FMN i ryboflawina nie reaktywują apoenzymu (228). Flawinowa grupa prostetyczna nie tworzy żadnych kompleksów z substratami, które byłyby wykrywalne spektrofotometrycznie oraz nie podlega cyklicznej redukcji i utlenieniu, podczas katalizy. Prawdopodobnie wolna para elektronów przy atomie N-5 pierścienia izoalloksazynowego pełni istotną funkcję w aktywacji substratu i stabilizacji apoenzymu (229). Stwierdzono jednak, że liaza α -hydroksynitrylu z prosa (230) wykazuje aktywność katalityczną przy braku kofaktora flawinowego. W tym przypadku rolę aktywatora mogłaby przejąć inna zasada (np. w bocznym łańcuchu aminokwasowym). Biorąc pod uwagę inaktywację flawinowej liazy α -hydroksynitrylu przez dwutionin i reaktywację przez tlen (228), można przyjąć że aktywność tego enzymu w komórce jest kontrolowana poprzez stan utlenienia FAD. Niezbędność aerobowego otoczenia do przebiegu katalizowanego procesu również wskazuje na regulacyjną funkcję stanu utlenienia FAD.

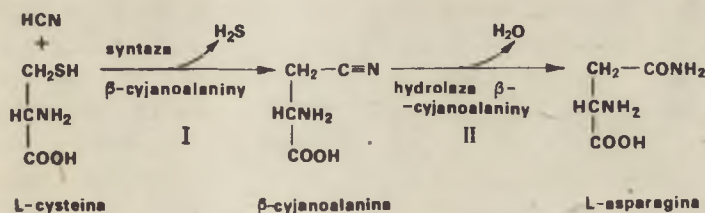
V-3. Asymilacja cyjanowodoru

Pierwsze doniesienia wskazujące na zdolność roślin do asymilacji HCN, ukazały się na początku lat sześćdziesiątych. Zaobserwowano, że $H^{14}CN$ podany w postaci gazowej, 4-ro dniowym siewkom roślin cyjanogennych: prosa (diuryna), lnu (linamaryna+lotaustralina), i białej koniczyny (*Trifolium repens*—linamaryna+lotaustralina), włącza się z bardzo dużą wydajnością (20—50%) do amidowego atomu węgla asparaginy. Stwierdzono również, że możliwość asymilacji HCN nie jest właściwością wyłącznie roślin zawierających związki cyjanogenne, ponieważ rośliny, w których nie stwierdzono nagromadzenia się tych połączeń — jak jęczmień (*Hordeum vulgare*), groch (*Pisum sativum*) i czerwona koniczyna (*Trifolium pratense*) — również włączają $H^{14}CN$ do asparaginy z wysoką intensywnością (231).

Podobne znakowanie radioaktywnej asparaginy, wyizolowanej z komonicy arabskiej (*Lotus arabicus*) czy k. wąskolistnej (*L. tenuis*), którym podano ($U-^{14}C$)-walinę wskazuje, że w warunkach *in vivo*, nitrylowa grupa linamaryny (I) służy jako źródło $H^{14}CN$ do biosyntezy asparaginy (177). Podobne zjawiska zaobserwowano badając metabolizm wicjaniny (XX) w roślinach należących do dwóch podgatunków wyki wąskolistnej (*Vicia angustifolia*). Znakowanie z podanej ($2-^{14}C$)-L-feniloalaniny odnajdywano w grupie nitrylowej wicjaniny, a następnie w asparaginie (232). Stwierdzono również, że szybkość obrotów diuryny w siewkach prosa zawierających 1 mol diuryny/pęd wynosi $0.05 \mu\text{mola/godz}$ (178). Wyniki te wskazują że glikozydy cyjanogenne są związkami aktywnymi metabolicznie.

Wykazano, że HCN reaguje z seryną, tworząc β -cyjanoalaninę, która z kolei, w zależności od gatunku, może w wyniku hydrolizy ulec przemianie w asparaginę lub w dwupeptyd γ -glutamilo- β -cyjanoalaninę (233—236). Próbując wyjaśnić mechanizm tych reakcji otrzymano preparaty enzymatyczne z siewek komonicy wąskolistnej (*Lotus tenuis*), wyki siewnej (*Vicia sativa*), jęczmienia, słonecznika, lnu i fasoli złotej (*Phaseolus aureus*), zdolne do katalizowania powstawania β -cyjanoalaniny z HCN i L-seryny (237). Stwierdzono jednak, że szybkość powstawania β -cyjanoalaniny jest 50-cio krotnie wyższa, jeżeli cysteina jest donorem trójwęglowej jednostki. Podając siewkom prosa HCN podwójnie znakowany ^{14}C i ^{15}N stwierdzono, że cyjanowódor włączany jest w całości do amidowej grupy asparaginy, bez rozłączenia atomów C i N grupy nitrylowej (238).

Enzym, nazwany syntazą β -cyjanoalaniny (siarkowodoroliza L-cysteiny) przyłączająca HCN, (EC 4, 1.1.9), który katalizuje reakcję I (Ryc. 8), otrzymano i oczyszczono z siewek łubinu wąskolistnego (*Lupinus*



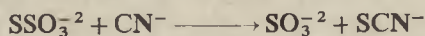
Ryc. 8. Asymilacja cyjanowodoru

angustifolia) a następnie scharakteryzowano (239, 240). Enzym z łubinu ma c.cz. 52 000 i zawiera 1 mol fosforanu pirydoksalu na mol białka. Wartość K_m dla KCN wynosi 0.5 mM. Stwierdzono, że syntaza β -cyjanoalaniny występuje w mitochondriach a oczyszczony enzym jest wysokospecyficzny w stosunku do L-cysteiny. Przy użyciu L-cysteiny znakowanej stereospecyficznie trytem przy C-3, zbadano stereochemię podstawienia grupy -SH przez grupę $-C\equiv N$, katalizowanego przez syntazę β -cyja-

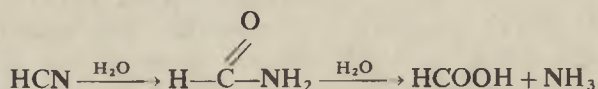
noalaniny i stwierdzono, że reakcja zachodzi z zachowaniem konfiguracji przy atomie C-3 (241).

W 1972 roku wyizolowano z rozpuszczalnej frakcji 11-dniowych siewek łubinu wąskolistnego hydrolazę β -cyjanoalaniny, enzym, który katalizuje powstawanie asparaginy z β -cyjanoalaniny (reakcja II, ryc. 7) (242). Stwierdzono wysoką specyficzność enzymu w stosunku do β -cyjanoalaniny. Syntezę β -cyjanoalaniny z HCN i L-cysteiny stwierdzono we wszystkich do tej pory zbadanych roślinach, w tej liczbie również w roślinach nie nagromadzających związków cyjanogennych (231, 237, 243).

W roślinach wyższych wykryto jeszcze dwa enzymy, które metabolizują HCN: rodanazę (243, 244—246), która przy udziale siarki dwuujemnej, katalizuje przekształcenie cyjanku w rodanek:



oraz hydroliazę formamidu (248, 249), katalizującą uwodnienie HCN do formamidu:



Wykazano jednak, że rodanaza występuje znacznie rzadziej niż syntaza β -cyjanoalaniny, a występowanie hydroliazy formamidu w roślinach wyższych jest wręcz kwestionowane przez niektórych badaczy (243).

Wyniki badań nad asymilacją HCN przez glony (233) oraz przez bakterie (129, 249—253) wykazały, że w organizmach tych asymilacja HCN odbywa się w sposób podobny jak w roślinach wyższych, tzn. przy udziale syntazy β -cyjanoalaniny. Grzyby (nieoznaczone psychrofilne podstawczaki) natomiast włączają HCN w drodze odmiennych reakcji (254, 255). Ustalono, że HCN ulega kondensacji z aldehydem octowym i amoniakiem, w wyniku której powstaje nitryl kwasu α -aminopropionowego lub kondensacji z semialdehydem kwasu bursztynowego i amoniakiem, tworząc kwas L-4-amino-4-cyjanomasłowy. Oba te metabolity, przekształcając się następnie w wyniku hydrolizy odpowiednio w L-alaninę i w kwas L-glutaminowy. Asymilację H^{14}CN z wytworzeniem radioaktywnej alaniny stwierdzono badając grzyby z gatunków *Pholiota*, *Rhizopus nigricans* i *Marasmius oreades*. W *Fusarium nivale* natomiast radioaktywność odnajdowano głównie w asparaginie, co wskazywało na podobny przebieg włączania HCN jak w roślinach wyższych (256). W fitopatogennych grzybach *Stemphylium loti* i *Gloeocercospora sorghi* wykryto natomiast aktywność liazy formamidu, która katalizuje przekształcenie HCN w formamid (257—259).

Fakt, że biosynteza związków cyjanogennych i asymilacji HCN zachodzi identycznie w tkankach wszystkich badanych roślin (a badaniami objęto kilkanaście gatunków, należących do różnych rodzin) sugeruje, że

uwarunkowania genetyczne, odpowiedzialne za przebieg tych procesów wytworzyły się bardzo dawno.

Występowanie związków cyjanogennych w wielu organizmach, szerokie rozpowszechnienie systemów enzymatycznych katalizujących asymilację HCN i przemiany związków cyjanogennych, a także występowanie wolnego cyjanowodoru nasuwa szereg pytań, z których najważniejsze dotyczy roli biologicznej tych połączeń. Próbę przedstawienia poglądów stanowiących odpowiedź na to pytanie podejmie autorka tej pracy w następnym artykule.

Zaakceptowano do druku 15.12.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Schrader J. C. C., (1803), *Gilbert Ann.*, **13**, 503—504.
2. Robiquet P. J., Boutron-Charlard A. F., (1830), *Ann. chim. phys.*, **44**, 352—382.
3. Wöhler F., Liebig J., (1837), *Ann. Pharmaz.*, **21**, 96; **22**, 1—24.
4. Lehmann E., (1874), *Pharmaceut.*, **Z.**, **13**, 33—46; 65—78.
5. Conn E. E., (1979), *Int. Rev. Biochem.*, **27**, 21—43.
6. Kingsbury J. M., (1964), *Poisonous plants of the United States and Canada*, Englewood Cliffs: Prentice-Hall.
7. Ames M. M., Moyer T. P., Kovach J. S., Moertel C. G., Rubin J., (1981), *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **6**, 51—57.
8. Hill G. J., Shine T. E., Hill H. Z., Miller C., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 2102—2107.
9. Holden C., (1976), *Science*, **193**, 982—985.
10. Laster W. R., Schabel F. M., (1975), *Cancer Chemother. Rep.*, **59**, 951—965.
11. Moertel C. G., Ames M. M., Kovach J. S., Moyer T. P., Rubin J. R., Tinker J. H., (1981), *J. Am. Med. Ass.*, **245**, 591—594.
12. Wodinsky I., Swiniarski J. K., (1975), *Cancer Chemother. Rep.*, **59**, 939—950.
13. Conn E. E., (1980), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 433—451.
14. Dillemann G., (1958), w „*Encyclopedia of Plant Physiology*”, Ruhland W., wyd., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, vol. VIII, str. 1050—1075.
15. Henry M. F., Nyns E. J., (1975), *Sub-Cell. Biochem.*, **4**, 1—65.
16. Jones D. A., (1972), w „*Phytochemical ecology*”, Harborne J. B. wyd., Acad. Press, London and N. York, str. 103—124.
17. Jones D. A., (1973), w „*Taxonomy and ecology*”, Heywood V. H., ed., Acad. Press, New York pp. 213—242.
18. Jones D. A., (1979), *Ann. Nat.*, **113**, 445—451.
19. Meeuse B. J. D., (1975), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 117—126.
20. Roberts E. H., Smith R. D., (1977), w „*The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*”, Khan A. A., wyd., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, str. 385—411.
21. Robinson M. E., (1930), *Biol. Rev.*, **5**, 126—141.

22. Solomonson L. P., Spehar A. M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2176—2179.
23. Solomos T., (1977), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 279—297.
24. Clapp R. C., Bissett F. H., Coburn R. A., Long L. Jr., (1966), *Phytochem.*, **5**, 1323—1326.
25. Fischer E., Anger G., (1919), *Ber. dt. chem. Ges.*, **52**, 854—868.
26. Smith C. R., Weisleder D., Miller R. W., (1980), *J. org. Chem.*, **45**, 507—510.
27. Bissett F. H., Clapp R. C., Coburn R. A., Ettlinger M. G., Long L. Jr., (1969), *Phytochem.*, **8**, 2235—2247.
- 27a. Nahrstedt A., Walther A., Wray V., (1982), *Phytochem.*, **21**, 107—110.
28. Ettlinger M. G., Jaroszewski J. W., Jensen S. R., Nielsen B. J., Nartey F., (1977), *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 952—953.
29. Nartey F., Brimer L., Christensen S. B., (1981), *Phytochem.*, **20**, 1311—1314.
30. Mikołajczak K. L., (1977), *Prog. Chem. Fats other Lipids*, **15**, 97—130.
31. Mikołajczak K. L., Seigler D. S., Smith C. R., Bates R. B., (1969), *Lipids*, **4**, 617—619.
32. Seigler D. S., Mikołajczak K. L., Smith C. R., Jr., Wolff I. A., Bates R. B., (1970), *Chem. Phys. Lipids*, **4**, 147—161.
33. Seigler D., Seaman F., Mabry T. J., (1971), *Phytochem.*, **10**, 485—487.
34. Nahrstedt A., Hübel W., (1978), *Phytochem.*, **17**, 314—315.
35. Seigler D. S., Butterfield C. S., Dunn J. E., Conn E. E., (1975), *Phytochem.*, **14**, 1419—1420.
36. Zinsmeister H. D., Erb N., Nahrstedt A., Hegnauer R., Tjon Sie Fat L., (1981), *Z. Naturforsch.*, **36c**, 336—337.
37. Erb N., Zinsmeister H. D., Lehmann G., Nahrstedt A., (1979), *Phytochem.*, **18**, 1515—1517.
38. Brimer L., Christensen S. B., Jaroszewski J. W., Nartey F., (1981), *Phytochem.*, **20**, 2221—2223.
39. Hübel W., Nahrstedt A., Wray V., (1981), *Arch. Pharm.*, **314**, 609—617.
40. Seigler D. S., Eggerding C., Butterfield C., (1974), *Phytochem.*, **13**, 2330—2332.
41. Nahrstedt A., (1976), *Z. Naturforsch.*, **31c**, 397—400.
42. Hübel W., Nahrstedt A., (1979), *Tetrahedron Lett.*, 4395—4396.
43. Nahrstedt A., Scheid H., (1981), *Phytochem.*, **20**, 1309—1310.
44. Caldwell R. J., Courtauld B. A., (1907), *J. Chem. Soc.*, (London), **91**, 671—676.
45. Fischer E., Bergmann M., (1917), *Ber. dt. chem. Ges.*, **50**, 1047—1069.
46. Hérissey H., (1907), *J. Pharmacie Chim.*, **26**, 194—198.
47. Kofod H., Eyjólfsson R., (1966), *Tetrahedron Lett.*, 1289—1291.
48. Campbell R., Haworth W. N., (1924), *J. Chem. Soc.*, (London), **125**, 1337—1343.
49. Haworth W. N., Leitch G. C., (1922), *J. Chem. Soc.*, **121**, 1921—1929.
50. Haworth W. N., Wylam B., (1923), *J. Chem. Soc.*, **123**, 3120—3125.
51. Bertrand G., (1906), *R.C. hebd. séances Acad. Sci.*, **143**, 832—834.

52. Chaudhury D. N., Robertson A., (1949), *J. Chem. Soc.*, 2054—2057.
53. Kofod E., Eyjólfsson R., (1969), *Phytochem.*, **8**, 1509—1511.
54. Eyjólfsson R., (1971), *Acta Chem. Scand.*, **25**, 1898—1900.
55. Gmelin R., Schüler M., Bordas E., (1973), *Phytochem.*, **12**, 457—461.
56. Nahrstedt A., (1973), *Phytochem.*, **12**, 2799—2800.
57. Finnemore H., Copper J. M., (1936), *J. Proc. Roy. Soc. New South Wales*, **70**, 175—182.
58. Hübel W., Nahrstedt A., Fikenscher L. H., Hegnauer R., (1982), *Planta med.*, **44**, 178—180.
59. Finnemore H., Reichard S. K., Large D. K., (1936), *J. Proc. Roy. Soc. New South Wales*, **70**, 257—264.
60. Kofod H., Eyjólfsson R., (1966), *Tetrahedron Lett.*, 5349—5351.
61. Towers G. H., Mc Innes A. G., Neish A. C., (1964), *Tetrahedron*, **20**, 71—77.
62. Dunstan W. R., Henry T. A., (1902), *Proc. Roy. Soc. Lond.*, **70**, 153—154.
63. Mao C.-H., Blocker J. P., Anderson L., Smith D. C., (1965), *Phytochem.*, **4**, 297—303.
64. Abrol Y. P., Conn E. E., Stoker J. R., (1966), *Phytochem.*, **5**, 1021—1027.
65. Young R. L., Hamilton R. A., (1966), *Proc. VI. Ann. Meet. Hawai Macadamia Prod. Assoc.* p. 27, cyt. za Conn E. E., (1980), w „Encyclopedia of Plant Physiology”, Bell E. A., Charlwood B. V. wyd., New Series, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, str. 461—492.
66. Sharples D., Stoker J. R., (1969), *Phytochem.*, **8**, 597—601.
67. Ettliger M., Eyjólfsson R., (1972), *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 572—573.
68. Eyjólfsson R., (1970), *Phytochem.*, **9**, 845—851.
69. Sharples D., Spring M. S., Stoker J. R., (1972), *Phytochem.*, **11**, 3069—3071.
70. Coburn R. A., Long L., Jr., (1966), *J. org. Chem.*, **31**, 4312—4315.
71. Kim H. S., Jeffrey G. A., Panke D., Clapp R. C., Coburn R. A., Long L., Jr., (1970), *J. Chem. Soc. Sect. D, Chem. Commun.*, 381—382.
72. Spencer K. C., Seigler D. S., Fikenscher L. H., Hegnauer R., (1982), *Planta medica*, **44**, 28—29.
73. Clapp R. C., Ettliger M. G., Long L. Jr., (1970), *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6378—6379.
74. Russell G. B., Reay P. F., (1971), *Phytochem.*, **10**, 1373—1377.
75. Gondwe A., Seigler D. S., Dunn J. E., (1978), *Phytochemistry*, **17**, 271—274.
76. Paris M., Bouquet A., Paris R. R., (1969), *C.R. Acad. Sci.*, ser. D, **268**, 2804—2806.
77. Fischer F. C., Fung S. Y., Lankhorst P. P., (1982), *Planta med.*, **45**, 42—45.
78. Nahrstedt A., Kant J.-D., Wray V., (1982), *Phytochem.*, **21**, 101—105.
79. Pallares E. S., (1946), *Arch. Biochem.*, **9**, 105—108.
80. Tapper B. A., MacDonald M. A., (1974), *Can. J. Microbiol.*, **20**, 563—566.
81. Eyjólfsson R., (1970), *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.*, **28**, 74—108.
82. Conn E. E., (1973), *Biochem. Soc. Symp.*, **38**, 277—302.

83. Seigler D. S., (1975), *Phytochemistry*, **14**, 9—29.
84. Hegnauer R., (1977), *Plant Syst. Evol. Suppl.*, **1**, 191—209.
85. Fikenscher L. H., Hegnauer R., (1977), *Planta Medica*, **31**, 266—269.
86. Fikenscher L. H., Hegnauer R., (1981), *Planta Medica*, **43**, 323—335.
87. Fikenscher L. H., Hegnauer R., Ruijgrok H. W. L., (1980), *Planta Medica*, **40**, 202—211.
88. Fikenscher L. H., Hegnauer R., Ruijgrok H. W. L., (1981), *Planta Medica*, **41**, 313—327.
89. Fikenscher L. H., Ruijgrok H. W. L., (1977), *Planta Medica*, **31**, 290—293.
90. Hegnauer R., (1960), *Pharm. Zentralhalle*, **99**, 322—329.
91. Hegnauer R., (1962—1973), *Chemotaxonomie der Pflanzen* tom 1—6, Basel-Stuttgart: Birkehäuser Verlag.
92. Hegnauer R., (1973), *Biochem. Systematics*, **1**, 191—197.
93. Tjon Sie Fat L., (1977), *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.*, ser. C., **80**, 227—237.
94. Tjon Sie Fat L., (1978), *Lloyda*, **41**, 571—573.
95. Tjon Sie Fat L., (1978), *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.*, ser. C., **81**, 126—131.
96. Tjon Sie Fat L., (1978), *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.*, ser. C., **81**, 347—354.
97. Tjon Sie Fat L., (1979), *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.*, ser. C., **82**, 165—170.
98. Tjon Sie Fat L., (1979), *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.*, ser. C., **82**, 197—209.
99. Tjon Sie Fat L., Valen van F., (1978), *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.*, ser. C., **81**, 204—210.
100. Valen van F., (1978), *Planta Medica*, **34**, 408—413.
101. Valen van F., (1978), *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.*, ser. C., **81**, 132—140.
102. Valen van F., (1978), *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.*, ser. C., **81**, 198—203.
103. Valen van F., (1978), *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.*, ser. C., **81**, 355—362.
104. Valen van F., (1978), *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.*, ser. C., **81**, 492—499.
105. Valen van F., (1979), *Planta Medica*, **35**, 141—149.
106. Valen van F., (1979), *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.*, ser. C., **82**, 171—176.
107. Seigler D. S., (1977), w „Progress in Phytochemistry”; Reinhold L., Harborne J. B., Swain T. (wyd.), **4**, 83—120.
108. Butler G. W., (1965), *Phytochem.*, **4**, 127—131.
109. Nass H. G., (1972), *Crop Sci.*, **12**, 503—506.
110. Castric P. A., (1975), *Can. J. Microbiol.*, **21**, 613—618.
111. Castric P. A., Ebert R. F., Castric K. F., (1979), *Curr. Microbiol.*, **2**, 287—292.
112. Castric K. F., McDevitt D. A., Castric P. A., (1981), *Curr. Microbiol.*, **5**, 223—226.
113. Clawson B. J., Young C. C., (1913), *J. Biol. Chem.*, **15**, 419—422.

114. Freeman L. R., Angelini P., Silverman G. J., Merritt C., (1975), *Appl. Microbiol.*, **29**, 560—561.
115. Kralik C. A., Castric P. A., (1979), *Curr. Microbiol.*, **3**, 71—74.
116. Michaels R., Corpe W. A., (1965), *J. Bacteriol.*, **89**, 106—112.
117. Niven D. F., Collins P. A., Knowles C. J., (1975), *J. Gen. Microbiol.*, **90**, 271—285.
118. Patty F. A., (1921), *J. Infect. Dis.*, **29**, 73—77.
119. Brysk M. M., Lauinger C., Ressler C., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 583—588.
120. Collins P. A., Rodgers P. B., Knowles C. J., (1980), *J. Gen. Microbiol.*, **117**, 73—80.
121. Michaels R., Hankes L. V., Corpe W. A., (1965), *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 121—125.
122. Rodgers P. B., Knowles C. J., (1978), *J. Gen. Microbiol.*, **108**, 261—267.
123. Stevens D. L., Strobel G. A., (1968), *J. Bacteriol.*, **95**, 1094—1102.
124. Bunch A. W., Knowles C. J., (1980), *J. Gen. Microbiol.*, **116**, 9—16.
125. Ward E. W. B., (1964), *Can. J. Bot.*, **42**, 319—327.
126. Ward E. W. B., Starratt A. N., Robinson J. R., (1977), *Can. J. Bot.*, **55**, 2065—2069.
127. Ward E. W. B., Thorn G. D., Starratt A., (1971), *Can. J. Microbiol.*, **17**, 1061—1066.
128. Ward E. W. B., Thorn G. D., (1965), *Can. J. Bot.*, **43**, 997—998.
129. Knowles C. J., (1976), *Bacteriol. Rev.*, **40**, 652—680.
130. Blum M. S., Woording J. P., (1962), *Science*, **138**, 512—513.
131. Schildknecht H., Maschwitz U., Krauss P., (1968), *Naturwiss.*, **55**, 230.
132. Blum M. S., Jones T. H., House G. J., Tschinkel W. R., (1981), *Comp. Biochem. Physiol.*, **69B**, 903—904.
133. Duffey S. S., Underhill E. W., Towers G. H. N., (1974), *Comp. Biochem. Physiol.*, **43B**, 753—776.
134. Duffey S. S., Blum M. S., Fales H. M., Evans S. L., Rancadori R. W., Tiemann D. L., Nakagawa Y., (1977), *J. Chem. Ecol.*, **3**, 101—113.
135. Jones T. H., Meinwald J., Hicks K., Eisner T., (1976), *J. Chem. Ecol.*, **2**, 421—429.
136. Jones D. A., Parsons J., Rothschild M., (1962), *Nature*, **193**, 52—53.
137. Davis R. H., Nahrstedt A., (1982), *Comp. Biochem. Physiol.*, **71B**, 329—332.
138. Davis R. H., Nahrstedt A., (1979), *Comp. Biochem. Physiol.*, **64B**, 395—397.
139. Nahrstedt A., Davis R. H., (1981), *Comp. Biochem. Physiol.*, **68B**, 575—577.
140. Guignard L., (1907), *Bull. Sci. Pharmacol.*, **14**, 556—557.
141. Mirande M., (1909), *Compt. Rend. hebdomadaires seances Acad. Sci.*, **149**, 140—142.
142. Guilbault G. G., Kramer D. N., (1966), *Anal. Chem.*, **38**, 834—836.
143. Feigl F., Gentil V., (1959), *Microchim. Acta*, 44—46.
144. Butler G. W., Butler B. G., (1960), *Nature*, **187**, 780—781.
145. Bennet W. D., Tapper B. A., (1968), *J. Chromatogr.*, **34**, 428—429.
146. Aldridge W. N., (1944), *Analyst*, **69**, 262—265.

147. Epstein J., (1947), *Anal. Chem.*, **19**, 272—274.
148. Feldstein M., Klendshoj N. C., (1954), *J. Lab. clin. Med.*, **44**, 166—170.
149. Luis P., Carducci C. N., Sá A., (1969), *Microchim. Acta*, 7—11.
150. Nagashima S., (1977), *Anal. Chim. Acta*, **91**, 303—306.
151. Nomura T., Hattori A., (1980), *Anal. Chim. Acta*, **115**, 323—326.
152. Russell F. R., Wilkinson N. T., (1959), *Analyst*, **84**, 751—754.
153. Wokes F., Willimott S. G., (1951), *J. Pharm. Pharmacol.*, **3**, 905—917.
154. Claeys R. R., Freund H., (1968), *Environm. Sci. Technol.*, **2**, 458—460.
155. Funazo K., Tanaka M., Shono T., (1981), *Anal. Chem.*, **53**, 1377—1380.
156. Thomson I., Anderson R. A., (1980), *J. Chromatogr.*, **188**, 357—362.
157. Butterfield C. S., Conn E. E., Seigler D. S., (1975), *Phytochem.*, **14**, 993—997.
158. Zilg H., Tapper B. A., Conn E. E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2384—2386.
159. Mikołajczak K. L., Smith C. R., Tjarks L. W., (1970), *Lipids*, **5**, 672—677.
160. Mikołajczak K. L., Smith C. R., Tjarks L. W., (1970), *Lipids*, **5**, 812—817.
161. Viehovever A., Mack H., (1935), *Am. J. Pharmacol.*, **107**, 397—450.
162. Mao C.-H., Anderson L., (1965), *J. org. Chem.*, **30**, 603—607.
163. Plouvier V., (1935), *C.R. Acad. Sci.*, **200**, 1985.
164. Nahrstedt A., (1975), *Arch. Pharm.*, **308**, 903—910.
165. Ben-Yehoshua S., Conn E. E., (1964), *Plant Physiol.*, **39**, 331—333.
166. Reay P. F., Conn E. E., (1970), *Phytochem.*, **9**, 1825—1827.
167. Mikołajczak K. L., Smith C. R., Tjarks L., (1970), *Biochim. Biophys. Acta.*, **210**, 306—314.
168. Nahrstedt A., (1981), w „Cyanide in biology” wyd. Vennesland B., Conn E. E., Knowles C. J., Westley J., Wissing F., Acad. Press, New York, 145—181.
169. Cairns T., Froberg J. E., Gonzales S., Langham W. S., Stamp J. J., (1978), *Anal. Chem.*, **50**, 317—322.
170. Culcasi M., Cheung A., Shingai E., Jee J., Lim P., (1978), *J. Pharmaceut. Sci.*, **67**, 1190—1192.
171. Nahrstedt A., (1979), *J. Chromatogr.*, **177**, 157—161.
172. Dreifuss P. A., Wood G. E., Roach J. A. G., Brumley W. C., Andrzejewski D., Sphon J. A., (1980), *Biomed. Mass Spectrometry*, **7**, 201—204.
173. Turczan J. W., Medwick T., (1979), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 190—196.
174. Turczan J. W., Medwick T., Plank W. M., (1978), *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **61**, 192—207.
175. Mikołajczak K. L., Weisleder D., (1978), *Lipids*, **13**, 514—516.
176. Abrol Y. P., (1967), *Indian J. Biochem.*, **4**, 54—55.
177. Abrol Y. P., Conn E. E., (1966), *Phytochem.*, **5**, 237—242.
178. Bough W. A., Gander J. E., (1971), *Phytochem.*, **10**, 67—77.
179. Butler G. W., Conn E. E., (1964), *J. biol. Chem.*, **239**, 1674—1679.
180. Koukol J., Miljanich P., Conn E. E., (1962), *J. biol. Chem.*, **237**, 3223—3228.
181. Gander J. E., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 3229—3232.

182. Mentzer C., Favre-Bonvin J., (1961), *C.R. Acad. Sci.*, **253**, 1072—1074.
183. Mentzer C., Favre-Bonvin J., Massias M., (1963), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **45**, 749—760.
184. Nartey F., (1968), *Phytochem.*, **7**, 1307—1312.
185. Tschiersch B., (1966), *Flora, Abt. A.*, **157**, 358—364.
186. Uribe E., Conn E. E., (1966), *J. biol. Chem.*, **241**, 92—94.
187. Jaroszewski J. J., Ettliger M. G., (1981), *Phytochem.*, **20**, 819—821.
188. Seigler D. S., Kennard D., (1977), *Phytochem.*, **16**, 1826—1827.
189. Tapper B. A., Butler G. W., (1971), *Biochem. J.*, **124**, 935—941.
190. Tapper B. A., Zilg H., Conn E. E., (1972), *Phytochem.*, **11**, 1047—1053.
191. Hughes M. A., Conn E. E., (1976), *Phytochem.*, **15**, 698—701.
192. Tapper B. A., Butler G. W., (1972), *Phytochem.*, **11**, 1041—1046.
193. Farnden K. J. F., Rosen M. A., Liljengren D. R., (1973), *Phytochem.*, **12**, 2673—2677.
194. Rosen M. A., Farnden K. J. F., Conn E. E., (1975), *J. biol. Chem.*, **250**, 8302—8308.
195. Halbrock K., Conn E. E., (1970), *J. biol. Chem.*, **245**, 917—922.
196. Halbrock K., Conn E., (1971), *Phytochem.*, **10**, 1019—1023.
197. Reay P. F., Conn E. E., (1974), *J. biol. Chem.*, **249**, 5826—5830.
198. Hösel W., Nahrstedt A., (1980), *Archiv. Biochem. Biophys.*, **203**, 753—757.
199. Cutler A. J., Hösel W., Sternberg M., Conn E. E., (1981), *J. biol. Chem.*, **256**, 4253—4258.
200. Liljengren D. R., (1978), *Phytochem.*, **17**, 1695—1699.
201. Saunders J. A., Conn E. E., Lin C. H., Shimada M., (1977), *Plant Physiol.*, **60**, 629—634.
202. Conn E. E., (1973), *Biochem. Soc. Symp.*, **38**, 277—302.
203. Kindl H., Underhill E. W., (1968), *Phytochem.*, **7**, 745—756.
204. McFarlane I. J., Lees E. M., Conn E. E., (1975), *J. biol. Chem.*, **250**, 4708—4713.
205. Simada M., Conn E. E., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 199—207.
206. Möller B. L., Conn E. E., (1979), *J. biol. Chem.*, **254**, 8575—8583.
207. Cutler A. J., Conn E. E., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**, 468—474.
208. Möller B. L., Conn E. E., (1980), *J. biol. Chem.*, **255**, 3049—3056.
209. Saunders J. A., Conn E. E., Lin C. H., Stocking C. R., (1977), *Plant Physiol.*, **59**, 647—652.
210. Saunders J. A., Conn E. E., (1978), *Plant Physiol.*, **61**, 154—157.
211. Thayer S. S., Conn E. E., (1981), *Plant Physiol.*, **67**, 617—622.
212. Kojima M., Poulton J. E., Thayer S. S., Conn E. E., (1979), *Plant Physiol.*, **63**, 1022—1028.
213. Haisman D. R., Knight D. J., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 528—534.
214. Haisman D. R., Knight D. J., Ellis M. J., (1967), *Phytochem.*, **6**, 1501—1505.
215. Helferich B., Kleinschmidt T., (1965), *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **340**, 31—45.
216. Courtois J. E., Percheron F., Quang H. N., (1964), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **46**, 984—986.
217. Mao C.-H., Anderson L., (1967), *Phytochem.*, **6**, 473—483.

218. Hösel W., Nahrstedt A., (1975), *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 1265—1275.
219. Hösel W., Nahrstedt A., (1976), *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 1681.
220. Nahrstedt A., Hösel W., Walther A., (1979), *Phytochem.*, **18**, 1137—1141.
221. Heuser C. W., (1972), *Phytochem.*, **11**, 2455—2457.
222. Butler G. W., Bailey R. W., Kennedy L. D., (1965), *Phytochem.*, **4**, 369—381.
223. Rosenthaler L., (1908), *Arch. Pharmaz.*, **246**, 365—366.
224. Becker W., Benthin U., Eschenhof E., Pfeil E., (1963), *Biochem. Z.*, **337**, 156—166.
225. Gupta N. K., Vennesland B., (1964), *J. biol. Chem.*, **239**, 3787—3789.
226. Becker W., Pfeil E., (1966), *Biochem. Z.*, **346**, 301—321.
227. Gerstner E., Pfeil E., (1972), *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 271—286.
228. Bärwald K. R., Jaenicke L., (1978), *FEBS Lett.*, **90**, 255—260.
229. Jorns M. S., (1979), *J. biol. Chem.*, **254**, 12145—12152.
230. Seely M. K., Criddle R. S., Conn E. E., (1966), *J. biol. Chem.*, **241**, 4457—4462.
231. Blumenthal-Goldschmidt S., Butler G. W., Conn E. E., (1963), *Nature (London)*, **197**, 718—719.
232. Tschiersch B., (1966), *Flora, Abt. A*, **157**, 42—50.
233. Fowden L., Bell E. A., (1965), *Nature (London)*, **206**, 110—112.
234. Ressler C., Giza Y. H., Nigam S. N., (1963), *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2874—2875.
235. Tschiersch B., (1965), *Flora*, **156A**, 363—366.
236. Tschiersch B., (1964), *Phytochem.*, **3**, 365—367.
237. Floss H. G., Hadwiger L., Conn E. E., (1965), *Nature (London)*, **208**, 1207—1208.
238. Blumenthal-Goldschmidt S., Hendrickson H. R., Abrol Y. P., Conn E. E., (1968), *J. biol. Chem.*, **243**, 5302—5307.
239. Akopyan T. N., Braunstein A. E., Goryachenkova E. V., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1617—1621.
240. Hendrickson H. R., Conn E. E., (1969), *J. biol. Chem.*, **244**, 2632—2640.
241. Tsai M.-D., Weaver J., Floss H. G., Conn E. E., Creveling R. K., Mazelis M., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 553—559.
242. Castric P. A., Farnden K. J. F., Conn E. E., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 62—69.
243. Miller J. M., Conn E. E., (1980), *Plant Physiol.*, **65**, 1199—1202.
244. Anosike E. O., Ugochukwu E. N., (1981), *J. exp. Bot.*, **32**, 1021—1027.
245. Chew M. Y., (1973), *Phytochem.*, **12**, 2365—2367.
246. Tomati U., Federici G., Cannella C., (1972), *Physiol. Chem. Phys.*, **4**, 193—196.
247. Shirai R., (1977), *J. agr. chem. Soc. Jap. (Nōka)*, **51**, 531—534.
248. Shirai R., Hirota K., Sakaguchi T., (1977), *J. agr. chem. soc. Jap. (Nōka)*, **51**, 527—530.
249. Brysk M. M., Corpe W. A., Hankes L. V., (1969), *J. Bacteriol.*, **97**, 322—327.
250. Castric P. A., Strobel G. A., (1969), *J. biol. Chem.*, **244**, 4089—4094.

251. Dunnill P. M., Fowden L., (1965), *Nature* (London), **208**, 1206—1207.
252. Lauringer C., Ressler C., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 316—323.
253. Rodgers P. B., Knowless C. J., (1978), *J. gen. Microbiol.*, **108**, 261—267.
254. Strobel G. A., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 2618—2621.
255. Strobel G. A., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 3265—3269.
256. Allen J., Strobel G. A., (1966), *Can. J. Microbiol.*, **12**, 414—416.
257. Fry W. E., Millar R. L., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**, 468—474
258. Fry W. E., Munch D. C., (1975), *Physiol. Plant Pathol.*, **7**, 23—33.
259. Rissler J. F., Millar R. L., (1977), *Plant Physiol.*, **60**, 857—861.

KATARZYNA DZIEWANOWSKA *

Rola biologiczna związków cyjanogennych i cyjanowodoru Biological Role of Cyanogenic Compounds and of Hydrogen Cyanide

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Zmiany poziomu związków cyjanogennych w tkankach roślinnych i ich rola obronna
- III. Ewolucja gatunków cyjanogennych
- IV. Udział cyjanowodoru w kiełkowaniu nasion
- V. Udział cyjanowodoru w asymilacji azotanów
- VI. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Changes in the level of cyanogenic compounds in plant tissues and their defensive role
- III. Evolution of cyanogenic species
- IV. Involvement of hydrogen cyanide in seed germination
- V. The role of hydrogen cyanide in nitrate assimilation
- VI. Concluding remarks

I. Wstęp

Przez wiele lat związki cyjanogenne, rozpowszechnione metabolity wtórne, przyciągały uwagę badaczy nie tyle ze względu na ich rolę fizjologiczną w roślinie, co z powodu toksycznego oddziaływania na organizmy zwierzęce (np. 1). Fakt, że aktywność biologiczna HCN wiązana była głównie z hamowaniem przez ten związek oksydazy cytochromowej spowodował, że niewiele uwagi poświęcano możliwej roli HCN w normalnym metabolizmie. A tymczasem udział HCN w procesach życiowych

*) Dr, Instytut Botaniki, Uniwersytet Warszawski, Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa 64.

sięga okresu prebiotycznego i jest bardzo prawdopodobne, że związek ten odegrał istotną rolę w powstaniu życia na naszej planecie (2—8).

Już w 1888 roku sugerowano, że związki cyjanogenne w roślinach stanowią narzędzie obrony przeciwko ślimakom (9). Spotkało się to jednak z repliką (10), że związki te są zbyt mało skuteczne, aby spełniać funkcje ochronne i proponowano ich udział w biosyntezie białka. Inne, bardziej współczesne propozycje również odrzucały możliwość pełnienia roli ochronnej związków cyjanogennych, uważając je za produkty końcowe metabolizmu (11), bądź postulując, że HCN jest uniwersalnym prekursorem w syntezie związków azotowych w roślinach (12). Obecnie wiadomo, że HCN nie jest głównym prekursorem w syntezie aminokwasów, aczkolwiek należy pamiętać, że w wielu roślinach, zarówno cyjanogennych jak i niecyjanogennych, β -cyjanoalanina i asparagina są syntetyzowane przy udziale HCN (13—15).

II. Zmiany poziomu związków cyjanogennych w tkankach roślinnych i ich rola obronna

Przeciwko poglądom, że związki cyjanogenne, podobnie jak inne metabolity wtórne, mogą być końcowymi (odpadowymi) produktami przemiany materii, przemawiają wyniki doświadczeń nad biologicznym okresem półtrwania tych związków i nad zmianami ich poziomu w trakcie rozwoju roślin. Podanie znakowanych prekursorów związków cyjanogennych roślinie powoduje pojawianie się radioaktywności w tych związkach, która następnie szybko zanika (16). Biologiczny okres półtrwania cyjanogenów waha się od kilku minut do kilku dni, a znakowane atomy włączane są do innych metabolitów pierwszorzędowych i wtórnych lub tracone jako CO_2 . Okres półtrwania związków cyjanogennych w roślinie podlega wahaniom dobowym jak i zmienia się z jej wiekiem. Np. w nasionach *Ungandia speciosa*, cyjanolipidy stanowią 15% suchej masy. Podczas 3 dni kiełkowania zawartość cyjanolipidów obniża się bardzo znacznie co sugeruje, że związki te służą jako materiał zapasowy (17). Jednak nie we wszystkich przypadkach związki cyjanogenne zanikają podczas kiełkowania. W niektórych roślinach są one w tym samym stadium rozwojowym transportowane do innych organów (18) lub są syntetyzowane. I tak np. stężenie linamaryny i lotaustraliny w nasionach kasawy (*Manihot esculenta*) jest bardzo niskie i wzrasta gwałtownie podczas kiełkowania, przede wszystkim w korzeniu. Z chwilą powstania pierwszych liści przejmują one rolę głównego organu produkującego związki cyjanogenne, a następnie związki te są transportowane bezypetalnie do korzeni. W tym okresie zdolność korzenia do syntezy cyjanogenów obniża się (19). Ziarniaki prosa nie zawierają diuryny. Biosynteza tego związku zaczyna się we wczesnym stadium kiełkowania a następnie po kilkunastu

dniach poziom diuryny zaczyna się obniżać (20). Podobne zmiany w poziomie linamaryny i lotaustraliny zaobserwowano w siewkach lnu, z tą różnicą, że związki te znajdują się również w nasionach (21). Nagromadzenie się triglochiny zaobserwowano we wczesnych stadiach rozwoju świbki morskiej (22). Nagromadzenie się glikozydów cyjanogennych i następujący potem szybki spadek ich zawartości stwierdzono również w trakcie kiełkowania zarodków izolowanych z nasion jabłoni (badania własne niepublikowane). Poziom glikozydów cyjanogennych w młodych liściach i owocach *Heteromeles arbutifolia* jest wysoki, natomiast nie stwierdzono ich w dojrzałych owocach pomimo, że gromadzą się w nasionach (23). Obserwacje te wskazują na szybki transport i katabolizm tych związków w roślinie i stanowią podstawę do postulowania ich uczestnictwa w podstawowym metabolizmie w roślinach, co nie wyklucza oczywiście udziału tych związków w systemie obronnym rośliny.

Cyjanogeny mogą stanowić obronę rośliny przed szkodnikiem tylko wtedy, gdy występują w stężeniach, które są toksyczne dla zwierząt roślinożernych. Pomimo, że wielu badaczy postulowało jako podstawową rolę glikozydów cyjanogennych w roślinie ich obronę przed zwierzętami roślinożernymi i patogenami, do lat 60-tych bieżącego stulecia nie udało się tego wykazać w sposób jednoznaczny. Dopiero rozpoczęte przez Jonesa (24—26) badania *Lotus corniculatus* wykazały ostatecznie, że glikozydy cyjanogenne zawarte w tej roślinie odstraszaają ślimaki i polne myszy, które żerują na *Lotus* i innych roślinach cyjanogennych.

III. Ewolucja gatunków cyjanogennych

W 1973 r. Jones postawił hipotezę, że gromadzenie się metabolitów wtórnych jest wynikiem selekcji uwarunkowanej np. obronną rolą tych związków (27). Pogląd ten opierał się na wynikach badań prowadzonych na buraku cukrowym, w których przerobiono 500 ton materiału i wykazano obecność bardzo niewielkich ilości rzadkich aminokwasów, których nie stwierdzono uprzednio w tej roślinie (28). Świadczy to, że genetyczny potencjał roślin może okazać się znacznie bardziej jednolity, niż to wcześniej podejrzewano; natomiast różnice w ilości nagromadzonego produktu (od ilości śladowych, niewykrywalnych przy zastosowaniu metod rutynowych, do znacznych ilości w niektórych gatunkach) mogą odzwierciedlać różnice w stopniu włączenia odpowiednich genów.

Wykazano ponadto, że różnica pomiędzy odmianami koniczyny (*Trifolium repens*), które syntezują linamarynę i tymi, które tej zdolności nie wykazują w mierzalnym stopniu, ma charakter regulacyjny (29). Stwierdzono, że w roślinach nie nagromadzających linamaryny, brak enzymów przeprowadzających zarówno pierwszą jak i ostatnią reakcję w szlaku biosyntezy tego związku z waliny (16). W *T. repens* zdolność

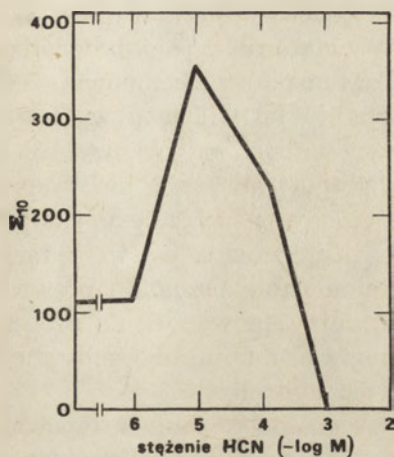
wytwarzania linamaryny jest cechą dominującą (30, 31). Za represją niektórych genów odpowiedzialnych za syntezę cyjanogenów przemawiają również wyniki badań prowadzonych na kukurydzy, którą uważa się za roślinę niecyjanogenną. W populacji kukurydzy zaobserwowano jednak osobniki cyjanogenne (32). Niezależnie stwierdzono (33), że kukurydza jest zdolna do syntezy związków cyjanogennych, lecz ich zawartość nie pozwala na wykrywanie metodami rutynowymi. Ważnym wydaje się również, że większość organizmów uważanych za niecyjanogenne, poczynając od bakterii poprzez rośliny i zwierzęta kończąc na człowieku, posiada zdolności asymilacji HCN (np. 15). W szczególności obecność cyjanowodoru stwierdzono, stosując dostatecznie czułe metody, we wszystkich badanych roślinach, a mianowicie w *Chlorella vulgaris*, liściach szpinaku i sinicach (*Plectonema boryanum*) (34). Nasuwa się wniosek, że HCN powszechnie występuje w pewnych przynajmniej stadiach życia większości roślin, zwierząt i mikroorganizmów.

Przytoczone powyżej wyniki i poglądy sugerują następujący mechanizm ewolucji gatunków cyjanogennych: Intensywne przemiany cyjanowodoru i jego pochodnych we wczesnych ewolucyjnie organizmach zostały następnie zdominowane przez inne szlaki syntezy aminokwasów i zasad organicznych. Następnie na skutek przypadkowych mutacji w genach regulatorach, odpowiedzialnych za utrzymanie biosyntezy związków cyjanogennych na bardzo niskim poziomie, wystąpiła nadprodukcja tych związków. W pewnych gatunkach taka nadprodukcja mogła być korzystna z punktu widzenia selekcji — np. ze względu na odstrasżające działanie wobec potencjalnych konsumentów. Na skutek tego taka nadprodukcja mogła się utrwalić jako stała cecha gatunku.

IV. Udział cyjanowodoru w regulacji kiełkowania nasion

Interesujący wkład do dyskusji nad udziałem endogennego HCN i związków cyjanogennych w metabolizmie roślin stanowią dane mówiące o ustępowaniu spoczynku i stymulacji kiełkowania nasion pod wpływem HCN. Stwierdzono, że klasyczne inhibitory łańcucha oddechowego: cyjanki, azydki i hydroksyloamina stymulują w stężeniach milimolarnych kiełkowanie szeregu nasion: ryżu (35, 36), sałaty, *Lepidium*, *Amaranthus* (37, 38), uczezu (39), jabłoni (40—42). Nasiona roślin większości z badanych gatunków nie kiełkowały w obecności CN^- , natomiast po przeniesieniu ich do warunków kontrolnych po pewnym okresie preinkubacji z HCN/ CN^- , powodowało znaczne zwiększenie dynamiki kiełkowania. Wykres na rycinie 1 przedstawia typowe wyniki uzyskane przez autorkę podczas badań nad wpływem HCN na kiełkowanie spoczynkowych zarodków jabłoni. Na podstawie wyników badań nad wpływem temperatury, składu atmosfery i obecności, ograniczających wymianę gazową

okryw nasiennych na kiełkowanie przypuszczano, że ustępowanie spoczynku nasion zależało od bliżej nieokreślonego procesu oksydacyjnego zachodzącego przy udziale tlenu (43). Uwzględniając fakt, że HCN stymuluje kiełkowanie zakładano, że reakcja ta powinna być niewrażliwa



Ryc. 1. Wpływ HCN w powietrzu na kiełkowanie spoczynkowych zarodków jabłoni. Σ_{10} — zdolność do kiełkowania, wyrażona jako suma procentów zarodków kiełkujących w ciągu 10 pierwszych dni.

na cyjanek. Stwierdzono dalej, że aktywność szlaku pentozofosforanowego (PPP) jest jednym z procesów niezbędnych dla ustąpienia spoczynku (44—49) a reakcją ograniczającą szybkość tej drogi jest reoksydacja NADPH, który jest koenzymem uczestniczącym w dwóch reakcjach odwodowania tego szlaku. Dane dotyczące oksydazy końcowej tej drogi wskazują, że jej powinowactwo do tlenu jest znacznie niższe niż oksydazy cytochromowej (50) oraz że jest ona niewrażliwa na cyjanek (51). Wiadomo było również, że dodanie katalazy wywołuje utratę aktywności tego enzymu (52). Opierając się na powyższych danych, jak i na własnych badaniach nad stymulacją kiełkowania nasion (*Amaranthus* i *Lactuca* przez HCN, Hendricks, i Taylorson (53) wywnioskowali, że stymulacja kiełkowania spoczynkowych nasion przez HCN polega na zahamowaniu aktywności katalazy, co z kolei stymuluje aktywność oksydazy NADPH, a więc i szlaku pentozofosforanowego. Ponieważ HCN hamuje również aktywność cytochromową, jego działanie stymulujące na aktywność szlaku pentozofosforanowego może wynikać ze zmniejszenia kompetycji o tlen przez łańcuch oddechowy, co również sprzyja utlenianiu NADPH (54).

Oprócz łańcucha cytochromowego, w wielu tkankach wyższych roślin i grzybów działa w mitochondriach alternatywna, niewrażliwa na cyjanek, droga transportu elektronów (55). Ostatnio ukazała się na łamach

Postępów Biochemii praca w której przedstawiono szczegółowy przegląd literatury dotyczącej tego zagadnienia (56), toteż nie wydaje się celowym omawianie tego problemu w tym miejscu.

Funkcjonowanie alternatywnej drogi transportu elektronów stwierdzono we wczesnych stadiach kiełkowania wielu nasion (np. 39, 57—59). Jest zatem możliwe, że jeden z mechanizmów stymulacji kiełkowania nasion przez HCN, jest związany z jego bezpośrednim oddziaływaniem na procesy oddechowe. Transport elektronów przez drogę alternatywną jest znacznie mniej wydajny jeśli idzie o wytwarzanie ATP niż transport przez cytochromowy łańcuch oddechowy. W związku z tym HCN wpływając na zmianę drogi transportu elektronów, wywołuje zmianę ładunku energii od którego wartości zależy aktywność szeregu kluczowych enzymów. Być może ta zmiana we względnej aktywności różnych enzymów powoduje zainicjowanie przemian prowadzących do kiełkowania. Niezależnie od wpływu cyjanowodoru na procesy oddechowe wydaje się, że HCN może stymulować mobilizację substancji zapasowych nasion, wpływając na szybkość ich hydrolizy.

W czasie poprzedzającego kiełkowanie ustępowania spoczynku nasion jabłoni stwierdzono, że powstaje wolny cyjanowodór (60), w okresie poprzedzającym mobilizację zapasowych białek i tłuszczu (61, 62). Wielu badaczy w różnych okresach postulowało udział HCN w metabolizmie białek poprzez aktywację proteaz. Już w 1932 roku Schulze, biorąc pod uwagę fakt, że HCN jest aktywatorem papainy, postulował, że w roślinach zawierających glikozydy cyjanogenne, HCN spełnia rolę naturalnego aktywatora proteaz (63). Bardziej współcześnie (64) badając działanie HCN jako aktywatora proteaz, sugerowano, że glikozydy cyjanogenne mogą pełnić rolę rezerwy HCN, uwalnianego w miarę zapotrzebowania, aby służyć jako aktywator proteaz i w ten sposób uczestniczyć w metabolizmie białek.

Jeszcze inna droga, na której HCN mógłby oddziaływać na kiełkowanie nasion może polegać na jego współdziałaniu z mechanizmami inicjowanymi przez światło. Wydaje się obecnie, że w kiełkowaniu nasion wszystkich gatunków współdecyduje stosunek formy aktywnej fitochromu (Pfr) do całkowitej ilości tego barwnika w komórce (65). O wielkości tego stosunku decyduje nie tylko naświetlanie światłem czerwonym, ale także szybkość destrukcji aktywnej formy fitochromu. Stwierdzono, że cyjanek może ten proces hamować (66). Na oddziaływanie cyjananku z fitochromem, podczas stymulacji kiełkowania nasion mozgi (*Phalaris arundinaceae* L.) przez cyjanek, zwrócili uwagę Junttila i Nilsen (67).

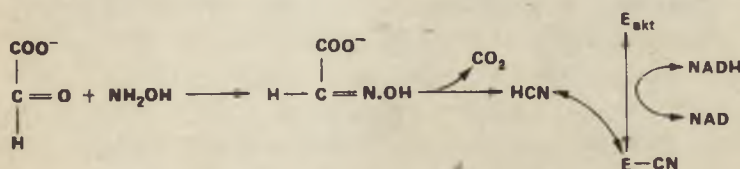
W innym materiale roślinnym wykazano, że cyjanek nie jest w stanie całkowicie zastąpić ekspozycji na światło czerwone; kiełkowanie izolowanych zarodków jabłoni jest stymulowane przez HCN tylko na świetle albo w obecności gibereliny (41).

V. Udział cyjanowodoru w asymilacji azotanów

Asymilacja azotanów jest jednym z dwóch najważniejszych biologicznych procesów, w wyniku którego azot nieorganiczny jest przekształcany do amoniaku, a następnie w azot organiczny. Pierwszą reakcją uczestniczącą w tym procesie jest redukcja azotanów do azotynów, katalizowana przez reduktazę azotanową (EC 1.6.6.1). Reduktaza azotanowa z *Chlorella* i szeregu innych organizmów może występować w formie aktywnej lub nieaktywnej (68).

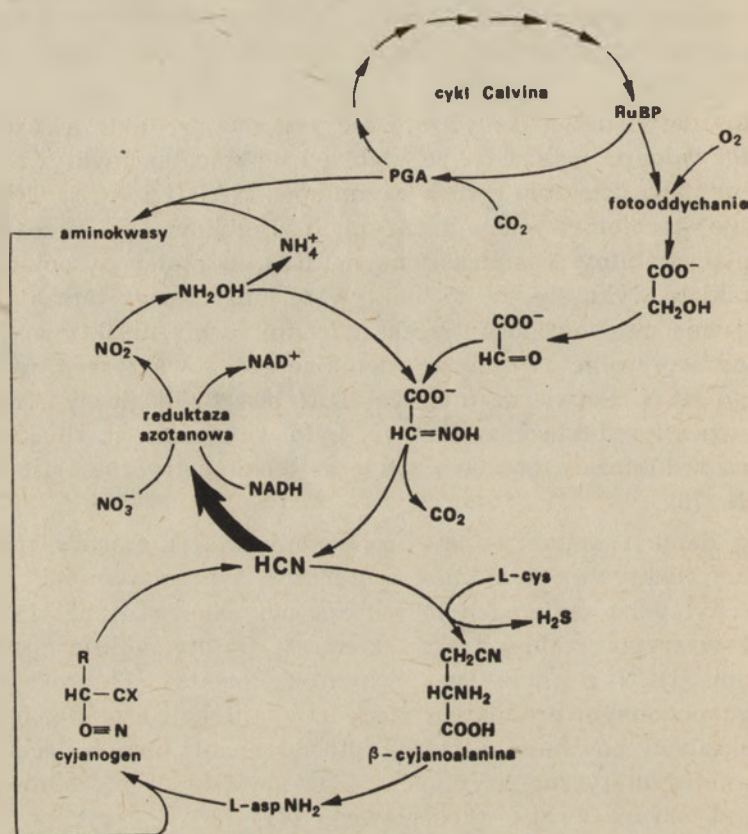
Wyniki doświadczeń *in vitro* z oczyszczoną reduktazą azotanową z *Chlorella vulgaris* wykazały, że szybka i odwracalna inaktywacja tego enzymu wymaga działania dwóch czynników: NADH i HCN. Cyjanowodor reaguje stechiometrycznie z enzymem zredukowanym przez NADH, wytwarzając stabilny kompleks enzym-HCN, o stałej dysocjacji 10^{-10} (69). Wyniki te wykazały, że do inaktywacji enzymu wystarczają bardzo niskie stężenia cyjanowodoru. Przekształceniu formy nieaktywnej w aktywną pod wpływem czynnika utleniającego, towarzyszy uwolnienie związanego HCN. Potwierdzeniem że HCN jest fizjologicznym regulatorem aktywności reduktazy azotanowej było wykazanie, iż zainaktywowana *in vivo* reduktaza azotanowa zawiera stechiometryczną ilość związanego HCN (70).

Szereg danych wskazuje na bezpośredni związek między produkcją HCN, który inaktywuje reduktazę azotanową, a intensywnością fotosyntezy. U schyłku lat siedemdziesiątych opisano układ enzymatyczny, występujący w rozpuszczalnej frakcji komórek *Chlorella*, który katalizuje powstawanie HCN z gliksalanu i hydroksyloaminy. Hydroksyloamina jest prawdopodobnym produktem pośrednim redukcji azotanu, natomiast kwas gliksalowy powstaje w trakcie fotooddychania, procesu ściśle związanego z fotosyntetyczną asymilacją CO_2 . Związkiem pośrednim w tej reakcji jest oksym kwasu gliksalowego (71, 72). Reakcja ta wymaga obecności Mn^{2+} i ADP. Zapotrzebowanie na Mn^{2+} jest związane prawdopodobnie z jego udziałem w powstawaniu nieaktywnej formy reduktazy azotanowej (E-CN, Ryc. 2), ponieważ stwierdzono, że przy deficycie Mn^{2+} komórki *Chlorella* tracą zdolność do wytwarzania tej postaci reduktazy (73). Natomiast ADP działa prawdopodobnie jako aktywator w reakcji powstawania HCN z gliksalanu (72). Obecność podobnego układu



Ryc. 2. Powstawanie HCN z gliksalanu i hydroksyloaminy.

enzymatycznego, zależnego od ADP i Mn^{2+} , stwierdzono również w ekstrakcie enzymatycznym z liści szpinaku (74). W 1977 zaproponowano przebieg skoordynowanej regulacji fotosyntetycznego włączenia CO_2 i redukcji azotanów przez HCN wytworzony na tej drodze (71) (Ryc. 3). Schemat ten opiera się na następujących danych doświadczalnych:



Ryc. 3. Przebieg regulacji asymilacji azotanów przez HCN.

1) Inaktywacja reduktazy azotanowej u *Chlorella vulgaris* jest stymulowana *in vivo* przez O_2 a hamowana przez CO_2 i azotany; zarówno efekt O_2 jak i CO_2 /azotan zależą od światła. Te same czynniki, które powodują inaktywację reduktazy azotanowej, tzn. światło o wysokiej intensywności w połączeniu z wysokim stężeniem tlenu i niskim CO_2 , zwiększają wytwarzanie HCN przez *Chlorella* (73).

2) Tlen hamuje fotosyntetyczne włączenie CO_2 (75).

3) Karboksylaza 1,5-bis-fosforanu rybulozy może działać jako karboksylaza lub jako oksigenaza (76). Wysokie stężenie tlenu i niskie CO_2 powoduje, że z 1,5-bis-fosforanu rybulozy, który gromadzi się dzięki naswietlaniu światłem o wysokiej intensywności, powstaje fosfoglikolan.

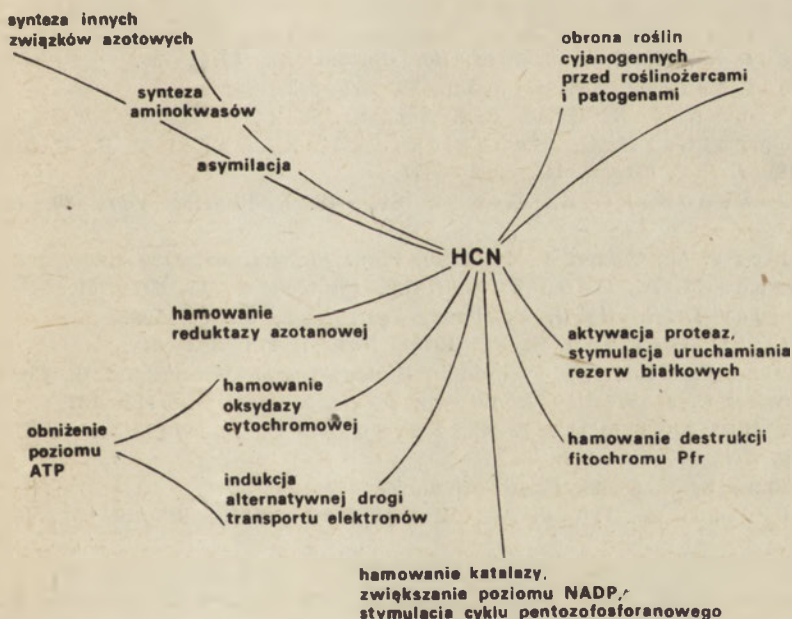
Fosfoglikolan ulega przekształceniu w glikolan, który z kolei jest utleniany do glioksalanu, jednego z substratów w reakcji, w której powstaje HCN. Tak więc powstający HCN może inaktywować reduktazę azotanową w warunkach, kiedy jest niedostatek związków węgla, będących akceptorami NH_3 . Przedstawiony schemat regulacji ten dostarcza również racjonalnych przesłanek, świadczących o możliwości regulacji reduktazy azotanowej przez HCN *in vivo*.

VI. Uwagi końcowe

Przedstawione w artykule dane pozwalają na wyciągnięcie dwóch zasadniczych wniosków dotyczących roli cyjanowodoru i związków cyjanogennych w roślinie:

1) Zdolność do ich syntezy i przemian występuje powszechnie, aczkolwiek w wielu przypadkach jest bardzo ograniczona. Nieuzasadnionym okazał się pogląd, że związki cyjanogenne są statycznymi, końcowymi produktami metabolizmu, a także wysoce dyskusyjnym wydaje się ich traktowanie jako typowych metabolitów wtórnych.

2) Przy rozważaniach dotyczących funkcji związków cyjanogennych i HCN należy uwzględnić fakt, że poziom ich w roślinach waha się od ilości śladowych do kilku procent suchej masy i rozważania na temat funkcji obronnych HCN lub jako metabolitu mają sens tylko w tych



Ryc. 4. Funkcje HCN w roślinach wyższych.

przypadkach, gdzie związki cyjanogenne występują w wysokich stężeniach. Natomiast w przypadkach gdzie HCN występuje w ilościach śladowych, można rozważać jego działanie regulacyjne.

Schemat na ryc. 4 stanowi próbę podsumowania dotychczas uzyskanych danych dotyczących roli fizjologicznej cyjanowodoru w roślinach cyjanogennych. W schemacie wyróżniono funkcje „metaboliczne” (górna część rysunku) i funkcje regulacyjne (dolna część). Systematyczne badania nad rolą biologiczną cyjanowodoru i związków cyjanogennych rozpoczęto dopiero w ostatnich latach, toteż należy mieć nadzieję, że w niedługim czasie schemat ten będzie można znacznie wzbogacić.

Zaakceptowano do druku 15.12.1982

PISMIENNICTWO

1. Swain T., (1977), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 479—501.
2. Dickerson R. E., (1978), *Sci. Amer.*, **239**, 70—86.
3. Ferris J. P., Joshi P. C., (1978), *Science*, **201**, 361—362.
4. Ferris J. P., Joshi P. C., Edelson E. H., Lawless J. C., (1978), *J. Mol. Evol.*, **11**, 293—311.
5. Ferris J. P., Joshi P. C., Lawless J. G., (1977), *Biosystems*, **9**, 81—86.
6. Meot-Ner (Mautner) M., (1978), *Origins of Life*, **9**, 115—131.
7. Mizutani H., Mikuni H., Takahasi M., Noda H., (1975), *Origins of Life*, **6**, 513—525.
8. Oró J., (1980), w „The Origins of Life and Evolution”, wyd. Halvorson H. A., Von Holde K., str. 47—63 Alan R. Liss, New York.
9. Stahl E., (1888), *Jenaische Z. Naturwiss. Med.*, **22**, 557—684.
10. Treub M., (1896), *Ann. Jard. Bot. Buitenzorg.*, **13**, 1—89.
11. Goris A., (1921), *Rev. Gen. Sci.*, **32**, 337—342.
12. Robinson M. E., (1930), *Biol. Rev.*, **5**, 126—141.
13. Blumenthal S. G., Hendrickson H. R., Abrol Y. P., Conn E. E., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5302—5307.
14. Dziewanowska K., Lewak St., (1982), *Physiol Veg.*, **20**, (2) 165—170.
15. Miller J. M., Conn E. E., (1980), *Plant Physiol.*, **65**, 1199—1202.
16. Hughes M. A., Conn E. E., (1976), *Phytochem.*, **15**, 697—701.
17. Seigler D. S., (1977), *Biochem., Syst. Ecol.*, **5**, 195—199.
18. Clegg D. O., Conn E. E., (1979), *Nature*, **278**, 343—344.
19. Nartey F., (1981), w „Cyanide in Biology”, wyd. Vennesland B., Conn E. E., Knowless C. J., Westley J., Wissing F., Acad. Press, str. 115—132.
20. Eck H. V., Glimore E. C., Ferguson D. B., Wilson G. C., (1975), *Crop. Sci.*, **15**, 421—424.
21. Trione E. J., (1960), *Phytopathol.*, **50**, 482—486.
22. Nahrstedt A., Hösel W., Walther A., (1979), *Phytochem.*, **18**, 1137—1141.
23. Dement W. A., Mooney H. A., (1974), *Oecologia*, **15**, 65—76.
24. Angseesing J. P. A., Angseesing W. J., (1973), *Heredity*, **31**, 276—282.
25. Ellis W. M., Keymer R. J., Jones D. A., (1977), *Heredity*, **39**, 45—65.

26. Jones D. A., (1962), *Nature* (London), **193**, 1109—1110.
27. Jones D. A., (1973), w „Taxonomy and ecology”, wyd. V. H. Heywood, Acad Press. New York, str. 213—242.
28. Fowden L., (1972), *Phytochem.*, **11**, 2271—2276.
29. Conn E. E., (1973), *Biochem. Soc. Symp.*, **38**, 277—302.
30. Attwood S. S., Sullivan J. T., (1943), *J. Hered.*, **34**, 311—320.
31. Corkill L., (1942), *N.Z.J. Sci. Technol.*, **23**, 178—193.
32. Nass H. G., (1972), *Crop. Sci.*, **12**, 503—506.
33. Ajani A., Lonquist J. H., (1975), *Can. J. Plant Sci.*, **56**, 429.
34. Gewitz H.-S., Lorimer G. H., Solomonson L. P., Vennessland B., (1974), *Nature*, **249**, 79—81.
35. Roberts E. H., (1964a), *Physiol. Plant.*, **17**, 14—29.
36. Roberts E. H., (1964b), *Physiol. Plant.*, **17**, 30—43.
37. Hendricks S. B., Taylorson R. B., (1972), *Nature*, **237**, 169—170.
38. Taylorson R. B., Hendricks S. B., (1973), *Plant Physiol.*, **52**, 23—27.
39. Rollin P., (1975), *Physiol. Vég.*, **13**, 369—382.
40. Dziewanowska K., Niedźwiedź I., Chodelska I., Lewak St., (1979), *Physiol. Vég.*, **17**, 297—303.
41. Dziewanowska K., Lewak St., (1982), *Physiol. Vég.*, **20**, 171—177.
42. Perino C., Côme D., (1981), *Physiol. Vég.*, **19**, 219—227.
43. Roberts E. H., (1962), *J. exp. Bot.*, **13**, 75—94.
44. Bogatek R., Lewak St., (1978), *Acta Physiol. Plant.*, **1**, 45—51.
45. Kovacs M. I. P., Simpson G. M., (1976), *Phytochem.*, **7**, 455—458.
46. La Croix L. J., Jaswal A. S., (1967), *Plant Physiol.*, **42**, 479—480.
47. Roberts E. P., (1969), *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **23**, 161—192.
48. Simmonds J. A., Simpson G. M., (1971), *Can. J. Bot.*, **49**, 1833—1840.
49. Simmonds J. A., Simpson G. M., (1972), *Can. J. Bot.*, **50**, 1041—1048.
50. Bahr J. T., Bonner W. D., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3446—3450.
51. Olosuyi S. A., (1973), Rozprawa doktorska, University of Reading, U. K., cyt. za Roberts E. H., Smith R. D., (1977) w „The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination”, wyd. Khan A. A., Elsevier/North Holland Biomedical Press, str. 385—408.
52. Conn E. E., Kraemer L. M., Liu P., Vennessland B., (1952), *J. biol. Chem.*, **194**, 143—151.
53. Hendricks S. B., Taylorson R. B., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 306—309.
54. Roberts R. H., Smith R. D., (1977), w „The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination”, wyd. Khan A. A., Elsevier/North Holland Biomedical Press, str. 385—408.
55. Henry M. F., Nyns E. J., (1975), *Sub.-Cell. Biochem.*, **4**, 1—65.
56. Rychter A., (1982), *Post. Biochem.*, **28**, (w druku).
57. Bogatek R., Rychter A., w przygotowaniu do druku.
58. Esashi Y., Sakai Y., Uskizawa R., (1981), *Plant. Physiol.*, **67**, 503—508.
59. Yentur S., Leopold A. C., (1976), *Plant Physiol.*, **57**, 274—276.
60. Dziewanowska K., Niedźwiedź I., Lewak St., (1979), *Physiol. Vég.*, **17**, 681—686.
61. Zarska-Maciejewska B., Sińska I., Witkowska E., Lewak St., (1980), *Physiol. Plant.*, **48**, 532—535.
62. Zarska-Maciejewska B., Lewak St., — w przygotowaniu do druku.
63. Schulze T., (1932), *Planta (Berl.)*, **16**, 116—173.
64. Ludtke M., (1952), *Biochem. Z.*, **322**, 310—319.

65. Kopcewicz J., (1979), *Post. Biochem.*, **25**, 211—229.
66. Yu R., (1977), *Z. Pflanzenphysiol.*, **85**, 165—169.
67. Junttila O., Nilsen A. J., (1980), *Z. Pflanzenphysiol.*, **97**, 429—435.
68. Solomonson L. P., Lorimer G. H., Hall R. L., Borchers R., Bailey J. L., (1975), *J. biol. Chem.*, **250**, 4120—4127.
69. Lorimer G. H., Gewitz H. S., Volker W., Solomonson L. P., Vennesland B., (1974), *J. biol. Chem.*, **249**, 6074—6079.
70. Gewitz H. S., Piefke J., Vennesland B., (1978), *Planta*, **141**, 323—328.
71. Solomonson L. P., Spehar A. M., (1977), *Nature*, **265**, 373—375.
72. Solomonson L. P., Spehar A. M., (1979), *J. biol. Chem.*, **254**, 2176—2179.
73. Pistorius E. K., Gewitz H. S., Voss H., Vennesland B., (1976), *Planta*, **128**, 73—80.
74. Solomonson L. P., Spehar A. M., (1981), „Cyanide in Biology”, wyd. B. Vennesland, Conn E. E., Knowless C. J., Westley J., Wissing F., Acad. Press, str. 363—370.
75. Warburg O., (1920), *Biochem. Z.*, **103**, 188—217.
76. Lorimer G. H., (1981), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **32**, 349—383.

SPRAWOZDANIE

Międzynarodowa Szkoła Letnia Biologii Molekularnej i Komórkowej

Spetsai, Grecja, 30.08—11.09.1982

W dniach od 30 sierpnia — 11 września 1982 r. na greckiej wyspie Spetsai odbyło się kolejne spotkanie młodych biochemików w Letniej Szkole Biologii Molekularnej pod patronatem FEBS i EMBO. W skład komitetu organizacyjnego tegorocznego zjazdu weszli: M. Grunberg-Manago (Francja), A. L. Haenni (Francja), E. N. Brody (Francja) i A. E. Evankelopoulos (Grecja). W szkole uczestniczyło ok. 150 osób. Najliczniej reprezentowane były: Francja, RFN, Anglia i USA. Delegacja polska liczyła 4 osoby.

Program szkolenia, na który złożyło się 40 godzin wykładów monograficznych i dwie sesje posterowe, obejmował szeroki wachlarz zagadnień związanych z regulacją ekspresji genów u organizmów pro- i eukariotycznych. Obszerną problematykę zjazdu można podzielić na kilka zasadniczych grup tematycznych:

1. Transkrypcyjna, translacyjna oraz metaboliczna kontrola wybranych operonów bakteryjnych.
2. Struktura i funkcja genów oraz dojrzewanie eukariotycznych RNA.
3. Komponenty aparatu translacyjnego oraz mechanizmy regulacji biosyntezy białka.
4. Regulacja rozwoju wirusów roślinnych i zwierzęcych.
5. Różnicowanie komórkowe.

Poszczególnym wykładom czy też grupom tematycznym towarzyszyły ożywione dyskusje, odbywające się najczęściej w plenerze malowniczej wyspy.

Regulacja ekspresji genów u prokariotów analizowana była na przykładzie kilku charakterystycznych operonów. Szeroko dyskutowano nowy model kaskadowej regulacji operonów wiązania azotu u *Klebsiella pneumoniae* zaprezentowany przez R. A. Dixon'a (Anglia). W regulacji syntezy nitrogenazy, kluczowego enzymu w wiązaniu azotu, zaangażowanych jest 17 genów (geny *nif*). Geny te należą do przynajmniej siedmiu jednostek transkrypcyjnych i podlegają skoordynowanej kontroli. W regulacji zaangażowane są geny regulatorowe *nif L* i *nif A*, których produkty wpływają na aktywację (*nif A*) bądź represję (*nif L*) transkrypcji innych operonów *nif*. Ponadto ekspresja genów *nif* podlega nadzycznej kontroli poprzez produkty genów *ntr A*, *ntr B* i *ntr C* zaangażowanych w regulacji poziomu azotu w komórce. Ten złożony model jest dobrze genetycznie udokumentowany.

Model translacyjnej regulacji transkrypcji poprzez przedwczesną terminację (atenuacja) został omówiony przez P. Blazi (Włochy), a zagadnienia dotyczące regulacji katabolicznych operonów laktozy i galaktozy oraz regulonów arabinozy i maltozy u *E. coli* zreferowała A. Ullmann (Francja). Przedstawiony został udział cAMP i wiążącego go białka (CRP lub CAP) w ekspresji tych operonów. Rola kompleksu cAMP-CRP w dalszym ciągu nie została w pełni wyjaśniona.

Niewątpliwie największym zainteresowaniem cieszyły się wykłady dotyczące struktury i funkcji genów. Żywo dyskutowany był wykład Ch. Weissmanna (Szwajcaria) dotyczący techniki tzw. „*reversed genetics*” do badania funkcji genów.

Technika polega na izolowaniu genów wraz z sąsiadującymi fragmentami materiału genetycznego drogą klonowania, ich ściśle określonej modyfikacji *in vitro* i ponownym wprowadzeniu zmienionych genów do homologicznych komórek w celu przeprowadzenia ich funkcjonalnej analizy. Technika stosowana była między innymi do badania regionów promotorowych genu β -globiny i interferonu α oraz charakterystyki miejsc wycinania intronów w prekursorowym mRNA β -globiny.

Połączoną technikę rekombinacji DNA i fuzji genów (na przykładzie genu galaktokinazy z *E. coli*) zastosował M. Rosenberg (USA) do badania sekwencji DNA zaangażowanych w regulacji inicjacji bądź terminacji transkrypcji. Wiele miejsca poświęcono charakterystyce sekwencji regionów promotorowych uczestniczących w regulacji inicjacji transkrypcji genów u eukariontów. Odpowiednikami prokariotycznych sekwencji TATAATG (*Pribnow-boxes*) są u Eukaryota nukleotydy ułożone w kolejności TATAAAA (*Goldberg-Hogness boxes*). Wykazano także wpływ sekwencji CAAT oraz obecność modulatorów i innych elementów regulujących zlokalizowanych w różnych odległościach w kierunku 5' od miejsca inicjacji transkrypcji.

Kolejnym interesującym problemem był proces dojrzewania eukariotycznych RNA. Między innymi W. Keller (RFN) przedstawił nowe dane dotyczące powstawania funkcjonalnych form rRNA i tRNA z ich prekursorów. Dużym powodzeniem cieszył się wykład P. Słonimskiego (Francja) na temat dojrzewania pierwotnych transkryptów genów apocytochromu b (*cob-box*) i podjednostki I oksydazy cytochromowej (OXI 3) w mitochondriach drożdży oraz udziału mRNA-maturaz w wycinaniu sekwencji interweniujących, które je kodują.

Zagadnienia dotyczące translacji prezentowane były przez kilku wybitnych specjalistów z tej dziedziny: M. Grunberg-Manago (Francja), T. Hunt (Anglia), B. B. Clark (Dania), A. L. Haenni (Francja) i inni.

Z grupy tematycznej dotyczącej regulacji rozwoju wirusów na szczególną uwagę zasługuje wykład D. Baltimore (USA), których scharakteryzował wirusy onkogenne z grupy retrowirusów oraz proces transformacji nowotworowej, w której są one zaangażowane. Wśród białek zaangażowanych w transformacji zwracają uwagę kinazy białkowe specyficjnie fosforylujące reszty tyrozynowe.

Na zakończenie warto podkreślić, że prowadzonym dyskusjom towarzyszyła swobodna, przyjacielska atmosfera. Nawiązane zostały nowe kontakty a w przyszłości możliwości współpracy naukowej.

Teresa Jakubowicz

RECENZJE

Biochemisches Praktikum

Red. H. P. Kleber, D. Schlee, W. Schöpp, G. Fischer Verlag, Jena, 1982, stron 260

Podręczniki do praktycznego nauczania biochemii mają z reguły istotne znaczenie dla jednostek szkolących na różnym poziomie studentów, są jednak również przydatne dla laboratoriów badawczych zatrudniających pracowników, którzy takiego szkolenia nie przeszli lub tylko w niewielkim zakresie, a mają do czynienia z oznaczaniem składników biologicznych, lub aktywności enzymów. Literatura w języku polskim w tym zakresie jest stosunkowo bogata, począwszy od „Praktikum z biochemii” — red. W. Brzeski i Z. Kaniuga (PWRiL 1970 i 1972), a na skrypcie wydanym centralnie w PWN pod redakcją Prof. L. Kłyszajko-Stefanowicz (1980) „Ćwiczenia z biochemii” skończywszy. Wśród tego typu wydawnictw nie małą rolę grają też liczne wewnętrzne skrypty uczelniane, przystosowane do lokalnych programów biochemii.

Niemniej pojawienie się na rynku wydawniczym książki „Biochemisches Praktikum” należy powitać z zadowoleniem, gdyż każda tego typu pozycja, a ta może nawet w większym stopniu, wnosi nowe elementy, które mogą być wykorzystane, zwłaszcza w dydaktyce.

Opiniowana książka dzieli się na 5 zasadniczych rozdziałów, które są poprzedzone wprowadzeniem w technikę laboratoryjną i uzupełnione zakończeniem zawierającym sporządzanie roztworów i liczne tabele pomocnicze. Właściwe rozdziały (od 2 do 6) obejmują: 2 — podstawy teoretyczne i metodyczne prac biochemicznych, 3 — rozdzielanie, izolowanie i charakterystyka składników niskocząsteczkowych, 4 — rozdzielanie i izolowanie składników wysokocząsteczkowych, 5 — charakterystyka i właściwości funkcjonalne składników wysokocząsteczkowych i 6 — metabolizm i jego regulacja. Rozdział 2 obejmuje podstawy teoretyczne i stosowane techniki w zakresie podstawowych metod laboratorium biochemicznego, jak: oznaczanie suchej substancji, rozdrabnianie, uzyskiwanie niskich i wysokich temperatur, wirowanie, pomiar i utrzymywanie stałego pH, fotometria, badanie enzymów oraz charakterystyka i badanie składników komórki. We wszystkich wymienionych punktach za wyjątkiem dwóch ostatnich, ograniczono się do opisu techniki i urządzeń pomiarowych oraz teorii, natomiast w przypadku enzymów i składników komórkowych podano konkretne przykłady postępowania analitycznego. To samo dotyczy też treści pozostałych rozdziałów, w których obok podstaw teoretycznych przytaczane są przykłady analiz, które mogą być podstawą do konstruowania programów praktikum biochemicznego. Opis każdej metody jest przy tym bardzo szczegółowo wypunktowany (nawet chyba przesadnie), z uwzględnieniem zasady metody, materiałów, toku postępowania, oceny wyników i uzupełnień. Każdy podrozdział i każda metoda jest ponadto uzupełniona literaturą, co znacznie podnosi wartość opracowania. Niestety jest stosunkowo mało ćwiczeń krótkich, przewidzianych na 3—4 godzinne zajęcia, jakie przeważają np. w programach biochemii Akademii Rolniczych, stąd dla tych Uczelni może stanowić podstawę po odpowiednich przeróbkach zamieszczonych ćwiczeń. Natomiast dobrze się nadaje

dla jednostek dysponujących większą liczbą godzin przeznaczonych na organizowanie typowego praktikum biochemicznego. Walorem książki jest uwzględnienie stosunkowo nowoczesnych technik, jak chromatografia powinowactwa, elektroforeza w żelu poliakryloamidowym, charakterystyka kinetyczna działania enzymów, czy frakcjonowanie struktur podkomórkowych. Inną cechą wartą podkreślenia jest wyjaśnienie licznych mechanizmów reakcji zwłaszcza charakterystycznych dla określonych grup związków. Wreszcie zwraca uwagę użycie w większości ćwiczeń materiału roślinnego, co jest stosunkowo rzadkie w porównaniu z liczniejszymi opracowaniami tego typu np. o kierunku lekarskim.

Podsumowując uważam, że opiniowana książka ma istotną wartość dla laboratorium naukowego i dydaktycznego i winna się znaleźć w ich bibliotekach.

Jerzy Kączkowski

SPIS TREŚCI

Minireview:

- J. Zborowski — Cytoplazmatyczne białka transportujące fosfolipidy . . . 101

Artykuły przeglądowe:

- P. Masłowski, H. Masłowska — Niektóre właściwości, struktura i funkcja chloroplastowego czynnika sprzęgającego (CF₁) 111
E. Karczmarewicz — Karboksykinaza fosfoenolpirogonianowa 125
J. Łomako — Glikogenosomy 149
B. Grzelakowska-Sztabert — Molekularne mechanizmy oporności komórek na antyfoliany 167
K. Dziewanowska — Naturalne związki cyjanogenne 191
K. Dziewanowska — Rola biologiczna związków cyjanogennych i cyjanowodoru 227

Sprawozdanie:

- Międzynarodowa Szkoła Letnia Biologii Molekularnej i Komórkowej, Spetsai, Grecja (T. Jakubowicz) 239

Recenzja książki:

- Biochemisches Praktikum (I. Kąkol) 241

POSTĘPY BIOCHEMII

June 1983

ARTICLES IN POLISH

Volume 29

Number 2

Minireview:

- J. Zborowski — Cytoplasmic Proteins Transferring Phospholipids (Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa) 101

Articles:

- P. Masłowski, H. Masłowska — Some Properties, Structure and Function of a Chloroplast Coupling Factor (CF₁) (Institute of Biology, Kopernik University, Toruń) 111
- E. Karczmarewicz — Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (Hospital—Monument Child's Health Center, Warszawa-Międzylesie) 125
- J. Łomako — Glycogenosomes (Institute of Biochemistry, University of Wrocław) 149
- B. Grzelakowska-Sztabert — Molecular Mechanisms of Cellular Resistance to Antifolates (Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa) 167
- K. Dziewanowska — Cyanogenic Compounds of Natural Origin (Institute of Botany, University of Warsaw) 191
- K. Dziewanowska — Biological Role of Cyanogenic Compounds and of Hydrogen Cyanide (Institute of Botany, University of Warsaw) 227
- Meeting Report 239
- Book Review 241

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

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

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a), inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, 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 egz. 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 powinny 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 omawiania 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: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny 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.

Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku prac wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów do artykułu przeznaczonego do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy zatem uzyskać zgodę na przedruk lub wykorzystanie danych i przedłożyć ją Redakcji. W razie modyfikowania rycin zaczerpniętych z opublikowanych prac należy także przedłożyć Redakcji do wglądu kopie oryginalnych ilustracji.

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

SPIS TREŚCI

Mini-review:

- J. Zborowski — Cytoplazmatyczne białka transportujące fosfolipidy . . . 101

Artykuły przeglądowe:

- P. Masłowski, H. Masłowska — Niektóre właściwości, struktura i funkcja chloroplastowego czynnika sprzęgającego (CF₁) 111
 E. Karczmarewicz — Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa 125
 J. Łomako — Glikogenosomy 149
 B. Grzelakowska-Sztabert — Molekularne mechanizmy oporności komórek na antyfoliany 167
 K. Dziewanowska — Naturalne związki cyjanogenne 191
 K. Dziewanowska — Rola biologiczna związków cyjanogennych i cyjanowodoru 227

Sprawozdanie:

- Międzynarodowa Szkoła Letnia Biologii Molekularnej i Komórkowej, Spetsai, Grecja (T. Jakubowicz) 239

Recenzja książki:

- Biochemisches Praktikum (I. Kąkol) 241