

P.2131

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1967
tom 13
nr 1

KWARTALNIK



<http://rcin.org.pl>

INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1967
tom XIII
zeszyt 1

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: B. Filipowicz (Łódź)

Członkowie: J. Chmiel (Poznań), W. Gajewski (Warszawa),
Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen
(Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), J. Trojanowski
(Lublin).

Komitet Redakcyjny

Redaktor — Zofia Lassota

Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1966

Nakład 1490 (1336+154)	Oddano do składania 22.X.1966
Ark. wyd. 9,0; ark. druk, 7,75	Podpisano do druku w styczniu 1967
Papier druk. sat. kl. 70×100	Druk ukończono w styczniu 1967
Cena zł 20.—	Zam. nr 1567/66. M-3

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT*

Drogi biosyntezy pterydyn i tetrahydrofolanu

The Pathways of Biosynthesis of Pteridines and Tetrahydrofolate

The new hypothesis dealing with the biosynthesis of different kinds of pteridines and tetrahydrofolate are reviewed.

I. Biosynteza pterydyn

Podobieństwo strukturalne układów: pterydynowego, purynowego i flawinowego od dawna nasuwało przypuszczenie o wspólnej drodze ich biosyntezy**.

Już w latach 1924-1925 Schöpf stwierdził, że substancje barwne ze skrzydeł motyli z rodziny *Pieridae* mają wiele podobnych własności do moczanów, różnią się jednak od nich składem pierwiastkowym (79). Fakt znajdowania złożeń kwasu moczowego (38, 58, 73, 93, 113, 114) oraz różnych barwników pterydynowych w tkankach owadów (4, 25, 26, 42, 43, 95, 109, 115, 116) zdawał się również wskazywać na możliwość wspólnej drogi biosyntezy tych związków. Chemiczna przemiana puryn w pterydyny przeprowadzona przez Alberta wzmocniła prawdopodobieństwo tej hipotezy (1, 2). Weygand (100, 102) wprowadzając do poczwerek *Pieris brassicae* związki znakowane ^{14}C wykazał, że niektóre atomy N i C w układach pterydynowym i purynowym pochodzą z tych samych prekursorów: mrówczanu, dwutlenku węgla i glicyny.

O wzajemnych powiązaniach biosyntezy puryn i pterydyn świadczyło pojawienie się radioaktywnych pterydyn po dodaniu puryn znakowanych ^{14}C do środowiska, w którym rosły *Eremothecium ashbyii* (61, 62), *Corynebacterium* sp. (78, 96, 106) i *E. coli* (76, 77) oraz po wstrzykiwaniu znakowanych puryn kijankom *Xenopus* (112). Na uwagę zasłu-

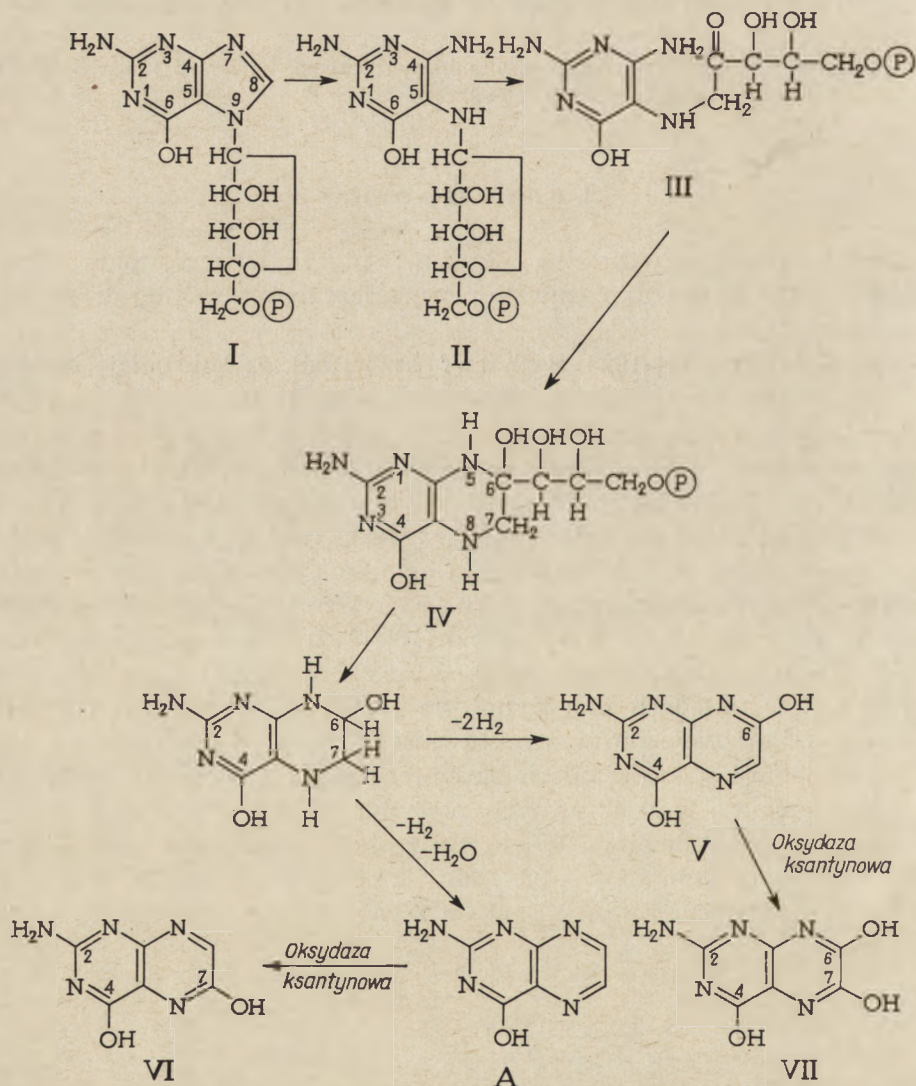
* Dr, adiunkt Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im M. Nenckiego, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: PGP — 2-amino-4-hydroksy-6-terydynylo-glicerofosforan, pAB — kwas p-aminobenzoowy.

** Flawinogeneza i jej powiązania z biogenezą puryn i pterydyn są tematem artykułów przeglądowych Bułhak (39) i Jeżewskiej (48) w *Postęпах Biochemii*.

guje fakt, że w pierścieniu pterydynowym syntetyzowanym *de novo* nigdy nie odnajdywano węgla z pozycji 8 puryny (87).

Nasuwa się zatem pytanie, jakie związki mogą być prekursorami C-6 i C-7 rdzenia pterydynowego. Weygand (103) i Brenner-Holzach (9, 10) doszli do wniosku, że atomów tych dostarczają atomy C-1 i C-2 rybozy. Badając wbudowywanie ^{14}C z rybozy i glukozy do pterydyn u *P. brassicae* i u *Drosophila melanogaster* autorzy ci wykazali również, że najwięcej ^{14}C wbudowywało się do układu pterydynowego po wstrzyknięciu 1- ^{14}C -rybozy oraz 2- ^{14}C -glukozy, przy czym C-2 glukozy jest wbudowywany dopiero po przekształceniu glukozy w rybozę.



Schemat 1. Hipotetyczny przebieg biosyntezy prostych pterydyn. Zachowano numerację pozycji atomów w pierścieniu, stosowaną w oryginale (wg 103)

Weygand (103) zaproponował następującą drogę biosyntezy kilku prostych pterydyn, spotykanych u owadów (schemat 1).

Wyjściowym związkiem w tym procesie jest guanozyno-monofosforan (I). W pierwszym etapie następuje rozerwanie pierścienia imidazolowego GMP połączone z jednoczesnym usunięciem atomu węgla z pozycji 8 i utworzeniem 5(5'-fosforybozylo-amino)-2,4-dwuamino-6-hydroksypirymidyny (II). Usunięcie C-8 z rdzenia purynowego podczas biosyntezy pterydyn postulowali również u *Corynebacterium* sp. Forrest (24) oraz Vieira i Shaw (96).

Dalsze przegrupowania dotyczą fragmentu cukrowego omawianej pochodnej pirymidyny. Po pojawieniu się formy łańcuchowej rybozy (III) tworzy się w wyniku tzw. przegrupowania Amadori'ego pierścień pterydynowy zawierający w pozycji 6 łańcuch trójwęglowy, z resztą fosforanową przy ostatnim atomie węgla (fosforan 2-amino-4-hydroksy-6-(D-erytro)-trójhydroksypropylo)dwuhydropterydyny (IV). Z tego związku po odszczepieniu bocznego łańcucha i odwodorowaniu lub odwodorowaniu połączonym z dehydratacją powstają pterydyny, ksantopteryna (2-amino-4,6-dwuhydroksypterydyna) (V), izoksantopteryna (2-amino-4,7-dwuhydroksypterydyna) (VI), i leukopteryna (2-amino-4,6,7-trójhydroksypterydyna) (VII). W utlenieniu ksantopteryny do leukopteryny oraz intermediatu A (schemat 1) do izoksantopteryny bierze udział oksydaza ksantynowa (oksydoreduktaza ksantyna: O_2 (1.2.3.2) (27, 38, 44, 57) — enzym, dla którego właściwym substratem są pochodne purynowe (22). Możliwość zużytkowania rybozydu aminopirymidyny do chemicznej syntezy ksantopteryny (91) potwierdza hipotezę Weyganda.

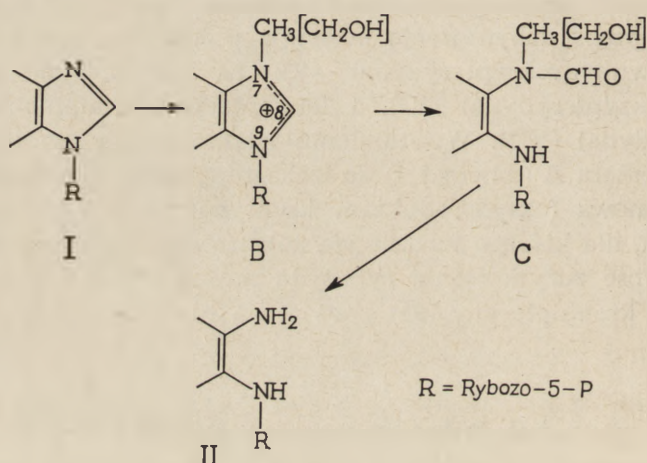
II. Prekursory purynowe pterydyn

U *Escherichia coli* (76, 77) i *Lactobacillus plantarum* (86) prekursorem pterydyn jest nukleotyd guanylowy (GMP). Guanina służyła jako substrat w tym procesie tylko w obecności 5-fosforybozylo-1-pirofosforanu, guanozyna zaś w obecności ATP. U *Salmonella typhimurium* i *Pseudomonas cocovenans* (56) właściwym prekursorem pterydynowym okazał się GTP. Dalali Gots (21) zwracają uwagę, że nukleotydy adenylowe hamują u *S. typhimurium* przemianę GTP w pochodną pterydynową.

Jak już wspomniano, znakowany C-8 puryny nie jest wbudowywany do rdzenia pterydynowego, co pozwalało przypuszczać, że przemiana prekursora purynowego zaczyna się od rozbicia wiązań i usunięcia C-8 z pierścienia imidazolowego. Townsend i Robins (94) wykazali, że metylacja pierścienia imidazolowego puryn ułatwia jego chemiczne rozerwanie. Pfleiderer i wsp. (71) (schemat 2) wysunęli hipotezę,

że metylacja lub też hydroksymetylacja pierścienia imidazolowego jest pierwszym etapem w przemianach puryn w pterydyny.

Proces ten zachodzący być może przy udziale pochodnych tetrahydrofolanu (N-5-metylotetrahydrofolanu i N-5,10-metylenotetrahydrofolanu) prowadziłby do zmiany rozmieszczenia ładunków elektronowych w cząsteczce puryny (I) i powstania związku B, co mogłoby ułatwiać rozbitcie wiązania pomiędzy C-8, a N-9. Wówczas powstawałaby uformylowana pochodna aminowa (C), która po odszczepieniu grupy formylowej i demetylacji (dehydroksymetylacji) przechodziłaby w 5(5'-fosforybozyl)-amino-2,4-dwuamino-6-hydroksypirymidynę (II). Dotychczas jednak badania enzymatyczne nie potwierdziły udziału metylowych pochodnych puryn w biosyntezie pterydyn. Metylowe pochodne guanozyny, łatwo ulegające degradacji chemicznej, nie są bowiem, jak wykazali Reynolds i Brown (77) prekursorami pterydyn w biosyntezie folanu u *E. coli*.



Schemat 2. Rozbitcie pierścienia imidazolowego w GMP (wg 71)

Wysuwane są także sugestie udziału Cu^{++} w procesie rozerwania pierścienia imidazolowego (23, 86). Esposito (23) przypuszcza, że wskutek utworzenia związku kompleksowego pochodnej purynowej z Cu^{++} , wiązania pomiędzy C-8 i atomami N w pierścieniu imidazolowym ulegają osłabieniu, co mogłoby ułatwiać rozbitcie pierścienia.

Stwierdzono, że u wielu mikroorganizmów (*E. coli*, *L. plantarum*, *S. typhimurium*, *P. cocovenans*) eliminowany z pierścienia imidazolowego fragment jednowęglowy pojawia się w środowisku reakcji w formie mrówczanu (17, 56, 86). Burg i Brown (17) wyizolowali z *E. coli* i oczyścili 570-krotnie układ enzymatyczny rozszczepiający pierścień imidazolowy puryny i usuwający C-8. Dane tych autorów, jak również wyniki prac Levenberga (56) nad biosyntezą pterydyn u *P. cocovenans*

sugerują, że po usunięciu z GTP węgla z pozycji 8 pozostaje rybozylowa pochodna 2,4,5-trójamino-6-hydroksypirymidyny (II).

III. Prekursory pirymidynowe pterydyn

Eksperymentalne stwierdzenie wykorzystania aminowych pochodnych pirymidyny do biosyntezy *de novo* rdzenia pterydynowego, byłoby dowodem przemawiającym za przemianą związków purynowych w pterydyny wg schematu 1. Pojawienie się radioaktywnych pterydyn po podaniu znakowanej ^{14}C pirymidyny (2,4,5-trójamino-6-hydroksypirymidyny, VIII) stwierdzono wprawdzie u bakterii (5), u pierwotniaka *Crithidia fasciculata* (65) i u owadów (100). Okazało się jednak, że w bezkomórkowych ekstraktach z *E. coli* pirymidyny nie stanowią bezpośrednich prekursorów układu pterydynowego. Co więcej, 2,4,5-trójamino-4-hydroksypirymidyna hamowała zużytkowanie guanozyny do biosyntezy układu pterydynowego u tej bakterii. Zahamowanie to ustępowało po podaniu większych ilości guanozyny (77).

IV. Intermediaty pterydynowe

W wyniku przemian według schematu 1 z GMP powstaje pochodna pterydynowa z bocznym łańcuchem węglowym. Związek tego typu, (2-amino-4-hydroksy-6-terydynylo-)glicerolo-fosforan (PGP, IX), wyizolowano z *E. coli* (33). Możliwości dalszych przemian tego intermediatu przedstawia schemat 3.

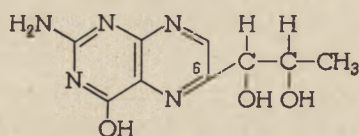
Sądząc z podobieństwa budowy PGP mógłby być związkiem pośrednim w biosyntezie niektórych pterydyn owadzych, odznaczających się obecnością bocznego łańcucha węglowego: biopteryyny (XIV) (19, 74, 75), drosopteryyny (XV), sepiapteryny (XVI) i izosepiapteryny (XVII, 97).

Z drugiej strony, obecność bocznego łańcucha węglowego przy C-6 rdzenia pterydynowego w PGP nasuwa przypuszczenie, że może on także być intermediatem w biosyntezie pterydynowego składnika cząsteczki folanu.

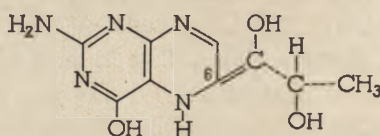
Przejęcie PGP w pochodne typu biopteryyn mogłoby polegać na usunięciu grupy fosforanowej i różnych przegrupowaniach oksydo-redukcyjnych w bocznym łańcuchu węglowym. Wskazują na to doświadczenia, w których larwy *D. melanogaster* żywiono uwodowaną pochodną PGP, znakowaną ^{14}C w pozycji 10 (37), a następnie z dorosłych owadów wyizolowano radioaktywne pochodne pterydynowe: 2-amino-4-hydroksy-6-trójhdroksypropylopterydynę (XVIII) oraz 2-amino-4-hydroksy-6-metylopterydynę (XII) (schemat 3). Nie wykazano natomiast radioaktywności

w drosopterynach, zawierających trójwęglowy boczny łańcuch. Przemiana PGP w tkankach *D. melanogaster* nie jest zatem jedyną drogą prowadzącą do powstawania pterydyn z boczny łańcuchem.

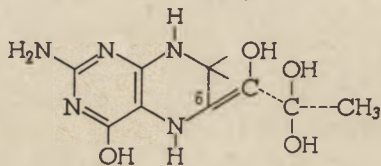
Zdaniem Goto (37) pojawienie się 6-metylo pochodnej pterydyny (XII, schemat 3) jest szczególnie interesujące, ponieważ po przeprowadzeniu jej w pochodną hydroksymetylową, uwodorowaniu, a następnie ufosforylowaniu, mogłaby ona być włączona w ciąg przemian prowadzących do syntezy dwuhydrofolanu. Wyizolowanie radioaktywnych sepiapteryny, biopteryny, drosopteryny po podaniu larwom *Drosophila* 2-amino-4-hydroksy-6-hydroksymetylopterydyny (XIII, schemat 3) znakowanej ^{14}C w pozycji 2 wskazuje na jej udział w syntezie pterydyn z boczny łańcuchem (75).



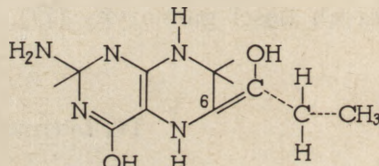
XIV Biopteryna



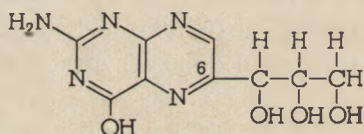
XV Drosopteryna



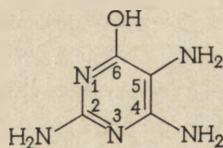
XVI Sepiapteryna



XVII Izo-sepiapteryna



XVIII



VIII

Inną hipotezę o przemianie PGP (IX) wysunęli Forrest i Nawa (29). Uważają oni (p. schemat 3), że łańcuch boczny PGP uwodorowanego (X) ulega odsczepieniu i powstaje 2-amino-4-hydroksypterydyna uwodorowana w pozycji 7 i 8 (XI). Pochodne takie rzeczywiście znaleziono w materiale biologicznym (3, 28, 45, 63, 90).

Forrest i Nawa (29), jak również Viscontini (97) stwierdzili, że związek ten (XI) zdolny jest do przyłączenia podstawników anionowych w pozycji 6. Tego typu połączenie, kwas pterydino-2-amino-

-4-hydroksy-6-sulfonowy wyizolowano ze środowiska, w którym rósł *Azotomonas insolita* (35).

Ponadto wykazano u *Drosophila*, że węgiel izotopowy z 2-amino-4-hydroksytetrahydropterydyny znakowanej w pozycji 5 pojawia się w izoksantopterynie (VI) i w drosopterynie (XV) (29, 92). Wydaje się zatem, że uwodorowane pochodne 2-amino-4-hydroksypteryny znajdują się w węglowym punkcie przemian prowadzących do utworzenia nie tylko pterydyn prostych, lecz również związków typu bioptryny (XIV) (92, 104) oraz pochodnych folanu (29), drogą przyłączania odpowiednich bocznych łańcuchów.

Nasuwa się pytanie, jakie związki mogą być prekursorami bocznego łańcucha węglowego powstających tą drogą pterydyn i jaki jest mechanizm przyłączania tego łańcucha. Forrest i wsp. (34, 66) stwierdzili, że w syntezie pterydyn typu bioptryny u *Drosophila* mogą być wykorzystane kwas α -keto- β -hydroksymasłowy oraz kwas propionowy, synteza ta wymaga jednak obecności tiaminy. Zdolność reagowania pterydyn z anionami nasunęła przypuszczenie, że atom C dołączony do rdzenia pterydynowego, mógłby występować w formie karboanionu. Karboanion taki mógłby powstać w wyniku współdziałania z tiaminą, która łącząc się z różnymi łańcuchami węglowymi bierze udział w wielu przegrupowaniach wewnątrzcząsteczkowych, prowadzących do powstawania stosunkowo stabilnego karboanionu (29).

Forrest i Nawa (29), przeprowadzając chemiczną syntezę niektórych pterydyn, wykazali następnie, że w wypadku dołączania kwasu α -ketomasłowego przy udziale tiaminy do rdzenia pterydynowego powstawała izosepiapteryna (XVII). Schemat 4 przedstawia hipotetyczny mechanizm tej syntezy.

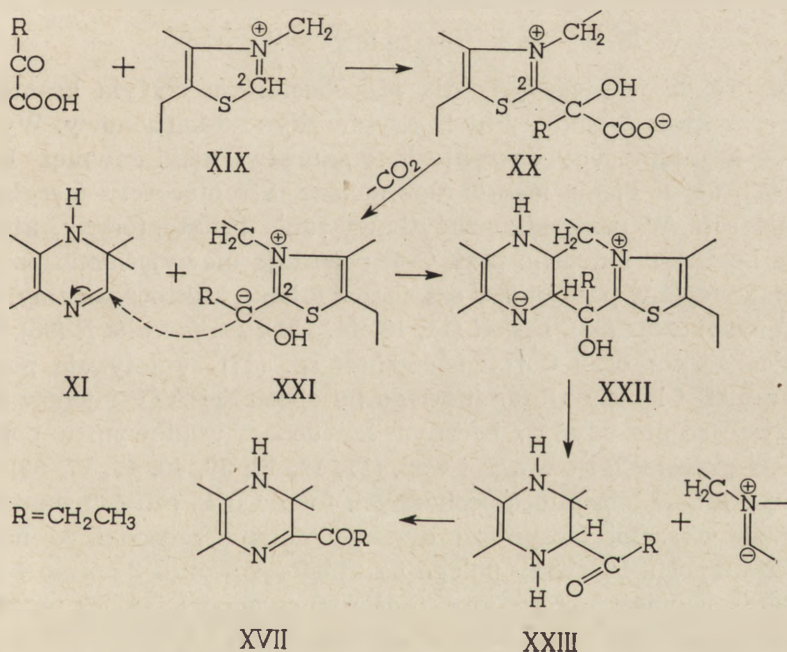
Do C-2 pierścienia tiazolowego w tiaminie (XIX) dołącza się ketokwas. Na skutek obecności w cząsteczce tiaminy centrum dodatniego przy atomie N następuje wewnątrzcząsteczkowe przegrupowanie powstałego związku (XX) połączone z dekarboksylacją ketokwasu i utworzeniem karboanionu. Karboanion związany z tiaminą (XXI) łączy się następnie z centrum dodatnim, które na skutek elektronowych przesunięć powstaje przy C-6 w cząsteczce pterydyny (XI). Utworzony kompleks (XXII) rozpada się i powstają cząsteczka tiaminy oraz pterydyna z bocznym łańcuchem w pozycji 6 (XXIII). Przez odwodorowanie tego związku (XXIII) tworzy się cząsteczka izosepiapteryny (XVII).

Maclea, Forrest i Myers (59) wykazali, że z glonu *Anacystis nidulans*, rosnącego w obecności treoniny znaczonej ^{14}C , można wyizolować glukozyd radioaktywnej bioptryny. Autorzy ci sądzą, że treonina drogą deaminacji i dekarboksylacji, przekształca się w pochodną aldehydu propionowego, która dołącza się do uwodorowanej 2-amino-4-hydroksypterydyny. Wbudowanie ^{14}C z treoniny w pochodną pterydynową przemawia za hipotezą Forresta i Nawy o możliwości biosyntezy

pterydyn z bocznym łańcuchem węglowym drogą przyłączenia tego łańcucha do układu pterydynowego.

Analogiczną drogą mogłaby powstawać też ufosforylowana hydroksymetylowa pochodna dwuhydropterydyny, związek pośredni w biosyntezie dwuhydrofolanu (36, 46, 49, 84, 85), okazało się bowiem, że u *D. melanogaster* uwodorowane 2-amino-4-hydroksypterydyny są wykorzystywane do biosyntezy pochodnych folanu (110, 111).

Grupa hydroksymetylowa intermediatu mogłaby pochodzić z fragmentu jednowęglowego, dołączona przy udziale kwasu foliowego lub też z kwasu glioksalowego dołączonego przy współudziale tiaminy. Na schemacie biosyntezy tetrahydrofolanu przedstawiono obie możliwości, jakkolwiek nie uzyskano dotąd biologicznego potwierdzenia sugestii *Forresta i Nawy* (29) (schemat 5).



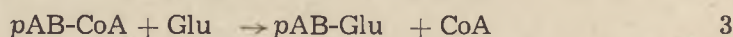
Schemat 4. Synteza izosepiapteryny (wg 29)

V. Biosynteza tetrahydrofolanu

Zdolność syntetyzowania *de novo* i przekształcania w tkankach owadów różnych pochodnych pterydynowych nie jest wystarczającym dowodem syntetyzowania folanu przez te organizmy. Co więcej, wyniki doświadczeń, w których hodowano larwy różnych owadów w warunkach sterylnych wskazują, że wśród szeregu witamin z grupy B również folan

jest niezbędny dla zapewnienia normalnego wzrostu i rozwoju owadów (15, 20, 30, 31, 60, 80). Dotychczas procesy biosyntezy pochodnych folanu poznano jedynie u bakterii.

Enzymatyczną syntezę folanu wykazał K a t u n u m a (51) w 1957 r. Stwierdził on, że ekstrakty z bakterii rodzaju *Mycobacterium* przeprowadzają syntezę folanu z prekursora pterydynowego, kwasu *p*-aminobenzoowego i kwasu glutaminowego. K a t u n u m a wykazał ponadto, że pochodna pterydynowa łączy się z preformowanym kwasem *p*-aminobenzoiloglutaminowym (pABGlu), enzymatyczna zaś synteza tego związku zachodzi przy udziale ATP i CoA (reakcja 1—3). Jak dotąd tylko u tego mikroorganizmu stwierdzono udział koenzymu A w syntezie pABGlu.



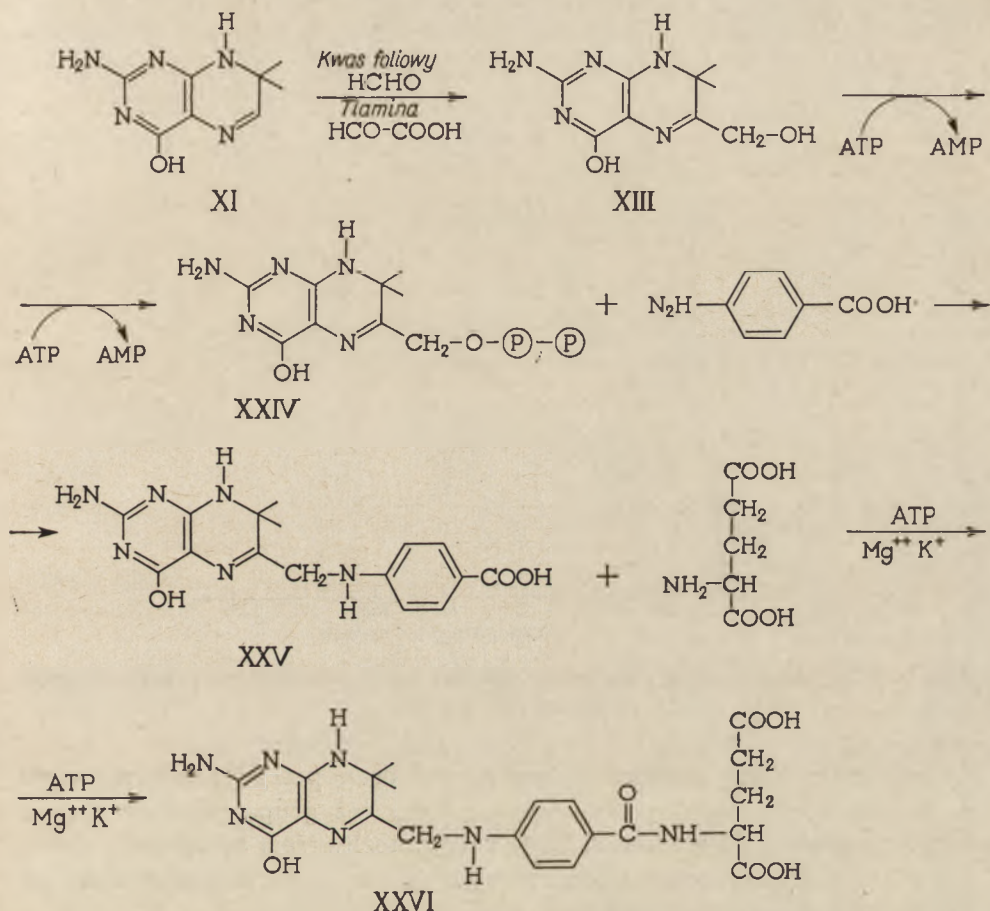
Jako prekursor pterydyny dla *Mycobacterium* służyła ksantopteryna (V) oraz kwas 2-amino-4-hydroksypterydino-6-karbonowy. Wykorzystywanie ksantopteryny do syntezy folanu stwierdzili również K o r t e i wsp. (53, 54) u *Pichia membranae-faciens*, *Streptococcus faecalis* i *Escherichia coli*. W przypadku zużytkowywania ksantopteryny, która nie zawiera bocznego łańcucha przy C-6, pozostaje niewyjaśnione pochodzenie atomu węgla w pozycji 9 w cząsteczce folanu. Mikroorganizmy: *Lactobacillus arabinosus* (81), *E. coli* (11, 12, 14, 101), *St. faecalis* R (98), *Micrococcus aerogenes* oraz *Corynebacterium* sp. (47) syntetyzują pochodną folanu z pAB i kwasu glutaminowego (w obecności ATP i jonów Mg^{++}), wykorzystując pterydyny z bocznym łańcuchem węglowym w pozycji 6.

Dzięki pracom B r o w n a i wsp. (11, 12, 13, 39, 40, 49, 77, 99) najdokładniej poznano biosyntezę pochodnych folanu u *E. coli* (schemat 5).

Jak się okazało, biosynteza dwuhydrofolanu zachodzi co najmniej w trzech etapach. Pierwszy polega na ufosforylowaniu 2-amino-4-hydroksy-6-hydroksymetylopterydyny (XIII) przy udziale ATP; w drugim, w wyniku połączenia pirofosforanu pochodnej pterydynowej (XIV) z kwasem *p*-aminobenzoowym, tworzy się kwas dwuhydropteroinowy (XXV); w trzecim zaś kwas dwuhydropteroinowy łączy się z glutaminianem dając dwuhydrofolan (XXVI). Sulfonamidy hamują syntezę kwasu dwuhydropteroinowego z pterydyny, ATP i pAB (12, 13). Pierwsze dwie reakcje katalizuje układ enzymatyczny składający się z dwóch frakcji — A i B (99). Frakcja A katalizuje fosforylację pterydyny, zaś B — kondensację z pAB.

Prekursorami pterydynowymi w syntezie dwuhydrofolanu u *E. coli* mogą być oprócz pochodnej hydroksymetylowej także pterydyny z bocznym trójwęglowym łańcuchem o konfiguracji przestrzennej L i D-treo oraz L i D-erytro (rys. 1) (49).

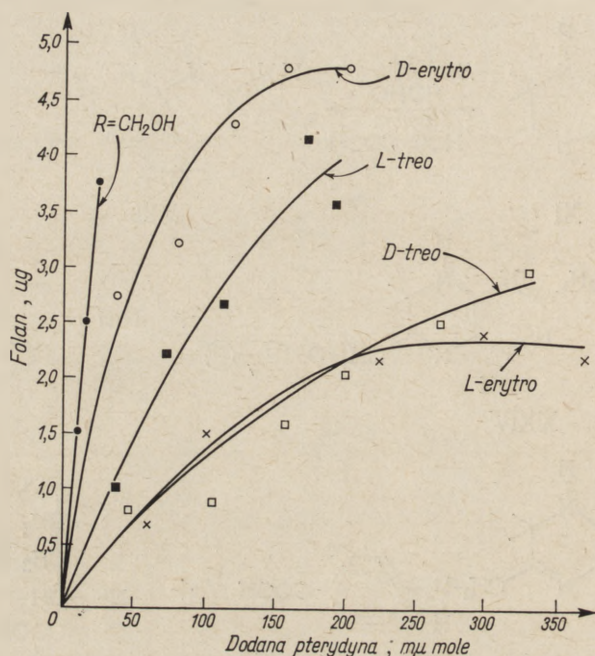
Jones, Reynolds i Brown (49) przypuszczają, że pterydyny te kondensują z pAB dopiero po przekształceniu w XIII. Dotychczas jednak nie wyjaśniono, czy odszczepianie fragmentu dwuwęglowego, być może aldehydu glikolowego, następuje pod działaniem jednego enzymu, czy też złożonego układu enzymatycznego.



Schemat 5. Biosynteza dwuhydrofolanu (wg 29, 40)

Wyjaśnienie roli ATP przy syntezie kwasu pteroinowego jest sprawą ostatnich kilku lat. Shiota i Disraeli (82) stwierdzili, że ATP nie jest niezbędny w biosyntezie folanu, gdy substratami są ufosforylowane pochodne pterydyny. Co więcej, Jaenicke i Chan (47) stosując różne, częściowo oczyszczone preparaty enzymatyczne z *E. coli*, *Corynebacterium* sp. i z drożdży piekarnianych wykazali za pomocą znakowanego ^{32}P ortofosforanu i ADP pojawianie się w środowisku pirofosforanu pochodnej pterydynowej. Wyizolowanie przez Weismana i Browna (99) układu enzymatycznego zdolnego do katalizowania fosforylacji pterydyny

z podstawnikiem węglowym w pozycji 6 potwierdziło ostatecznie udział tego związku w biosyntezie dwuhydrofolanu u *E. coli*. Pirofosforan dwuhydropterydyny stanowił także substrat pterydynowy w biosyntezie folanu przeprowadzonej przez *Lb. arabinosus* (81, 83, 84, 85) oraz przez różne szczepy *Pneumococcus* (68).



Rys. 1. Biosynteza kwasu dwuhydropteroinowego z różnych prekursorów pterydynowych (wg 49)

Nie wyjaśniono ostatecznie czy pirofosforan pterydynowy powstaje w drodze dwóch kolejnych fosforylacji, czy też grupa pirofosforanowa zostaje przeniesiona w całości. Za tą drugą możliwością przemawia obserwacja, że u *E. coli* monofosforan pterydyny nie jest wykorzystywany do syntezy kwasu dwuhydropteroinowego (99).

Frakcja B układu enzymatycznego z *E. coli* (99) katalizująca syntezę kwasu dwuhydropteroinowego z pirofosforanu pochodnej pterydynowej i pAB zużytkowuje również pABGlu, jednak ze znacznie niższą wydajnością (10%); w tym przypadku powstaje wprost dwuhydrofolan. Nie wiadomo zatem, czy u *E. coli* występują dwa oddzielne enzymy, jeden katalizujący syntezę kwasu dwuhydropteroinowego, drugi — dwuhydrofoliowego, czy też obie reakcje przeprowadza jeden enzym, zdolny do wykorzystywania dwóch różnych substratów.

Griffin i wsp. (40) wyodrębnili z *E. coli* układ enzymatyczny katalizujący trzeci etap procesu syntezy dwuhydrofolanu. Enzym ten — li-gaza kwasu dwuhydropteroinowego i kwasu glutaminowego występuje

także u wielu innych gatunków bakterii (40). Enzym z *E. coli* charakteryzuje się znaczną specyficznością substratową, wykorzystuje bowiem tylko kwas dwuhydropteroinowy i kwas glutaminowy. Kwasy pteroinowy i tetrahydropteroinowy, jak również kwasy dwuglutaminowy i trójglutaminowy nie są jego substratami. Działanie ligazy wymaga obecności ATP oraz jedno i dwuwartościowych kationów. ATP może być zastąpione przez ITP lub GTP, wydajność reakcji maleje jednak wówczas do 60% lub 35%.

Uwodorowanie dwuhydrofolanu do koenzymu — tetrahydrofolanu, przeprowadza oksydoreduktaza folanowa (1.5.1.3) przy udziale NADPH₂ jako donora wodoru. Oksydoreduktaza 5,6,7,8-tetrahydrofolan:NADP (1.5.1.3), jak również enzym redukujący folan do dwuhydrofolanu — oksydoreduktaza 7,8-dwuhydrofolan:NADP (1.5.1.4) rozpowszechnione są w materiale bakteryjnym (8, 18, 52, 67, 88, 89, 105) oraz w niektórych tkankach zwierzęcych (6, 7, 32, 64, 69, 107).

Z materiału biologicznego izolowano ponadto różne poliglutamylowe pochodne folanu: z wielu gatunków bakterii — kwas pteroiłotrójglutaminowy (41, 50, 72, 108), z drożdży zaś — kwas pteroiłoheptaglutaminowy (70). Dotychczas jedynie u *E. coli* wykryto układ enzymatyczny katalizujący syntezę poliglutamylowych pochodnych tetrahydrofolanu (40), niewiele jednak wiadomo o jego własnościach.

Z przedstawionych danych o biosyntezie układu pterydynowego i cząsteczki folanu wynika, że wszystkie atomy węgla i azotu w pterydynowym fragmencie folanu pochodzą z puryny oraz rybozy kwasu guanylowego, a zatem z nukleotydu, w którego biosyntezie współuczestniczą pochodne folanu. Wynika z tego zatem, że pochodne folanu mogą w pewnej mierze kontrolować biosyntezę swego prekursora pterydynowego (55).

LITERATURA

1. Albert A., *Biochem. J.* **57**, X (1954).
2. Albert A., *Biochem. J.* **65**, 124 (1957).
3. Van Baalen C., Forrest H. S., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1770 (1959).
4. Bartel A. H., Hudson B. W., Craig R. J., *Ins. Physiol.* **2**, 348 (1958).
5. Baugh C. M., Shaw E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 28 (1963).
6. Bertino J. R., Gabrio B. W., Huennekens F. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 461 (1960).
7. Bertino J. R., Simmons B., Donohue D., *Fed. Proc.* **21**, 476 (1962).
8. Blakley R. L., McDougall B., *J. Biol. Chem.* **236**, 1163 (1961).
9. Brenner-Holzach O., Leuthardt F., *Helv. Chim. Acta* **42**, 2254 (1959).
10. Brenner-Holzach O., Leuthardt F., *Helv. Chim. Acta* **44**, 1480 (1961).
11. Brown G. M., Abstr. Vth Intern. Congr. Biochem. Moscow str. 5, 22, 1225 (1961).
12. Brown G. M., Abstr. VIth Intern. Congr. Biochem., New York str. 384 (1964).
13. Brown G. M., Weisman R. A., Molnar D. A., *J. Biol. Chem.* **236**, 2534 (1961).

14. Brown G. M., Reynolds J. J., *Ann. Rev. Biochem.* **32**, 419 (1963).
15. Brust M., Fraenkel G., *Physiol. Zool.* **28**, 186 (1956).
16. Bulhak B., *Post. Biochem.* **6**, 13 (1960).
17. Burg A. W., Brown G. M., *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 275 (1966).
18. Burschall J. J., Nitchings G. H., Abstr. VIth Intern. Congr. Biochem., New York str. 428 (1964).
19. Butenandt A., Rembold H., *Z. Physiol. Chem.* **311**, 79 (1958).
20. Dadd R. H., *J. Ins. Physiol.* **6**, 1 (1961).
21. Dalal F. R., Gots J. S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 509 (1965).
22. De Renzo E. C., *Adv. Enzymol.* **17**, 293 (1956).
23. Esposito R. G., Pletcher A. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 369 (1961).
24. Forrest H. S., XVIIth Intern. Congress of Pure and Applied Chemistry, München, 1959, 40 (1960).
25. Forrest H. S., Mitchell H. K., Ciba Found. Symp. on Biology and Biochemistry of Pteridines, str. 143 (1954).
26. Forrest H. S., Mitchell H. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4865 (1955).
27. Forrest H. S., Glassman E., Mitchell H. K., *Science* **124**, 725 (1956).
28. Forrest H. S., Hanly E. W., Lagowski J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 596 (1961).
29. Forrest H. S., Nawa S., w Pteridine Chemistry red. Pfeleiderer W. Taylor E. C., 1964, str. 281.
30. Fraenkel G., Blewett M., *Biochem. J.* **37**, 688 (1943).
31. Fraenkel G., Blewett M., *Nature* **157**, 697 (1946).
32. Futterman S., *J. Biol. Chem.* **228**, 1031 (1957).
33. Goto M., Forrest H. S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 180 (1961).
34. Goto M., Okada T., Forrest H. S., *J. Biochem.* **56**, 379 (1964).
35. Goto M., Forrest H. S., Dickerman L. H., Urushibara T., *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 8 (1965).
36. Goto M., Ohno M., Forrest H. S., Lagowski J. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **110**, 444 (1965).
37. Goto M., Okada T., Forrest H. S., *Arch. Biochem. Biophys.* **110**, 409 (1965).
38. Graf G. E., Hadorn E., Ursprung M., *J. Ins. Physiol.* **3**, 120 (1959).
39. Griffin M. J., Brown G. M., *Fed. Proc.* **22**, 231 (1963).
40. Griffin M. J., Brown G. M., *J. Biol. Chem.* **239**, 310 (1964).
41. Hakala M. T., Welch A. D., *Fed. Proc.* **14**, 222 (1955).
42. Harmsen R., *J. Ins. Physiol.* **12**, 23 (1966).
43. Harmsen R., *J. Ins. Physiol.* **12**, 9 (1966).
44. Hayashi Y., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 351 (1962).
45. Hudson B. W., Bartel A. M., Craig R., *J. Ins. Physiol.* **3**, 63 (1959).
46. Jaenicke L., w Pteridine Chemistry red. Pfeleiderer W., Taylor E. C. 1964, str. 377.
47. Jaenicke L., Chan C., *Angew. Chemie* **72**, 752 (1960).
48. Jeżewska M. M., *Post. Biochem.* **9**, 497 (1963).
49. Jones T. H. P., Reynolds J. J., Brown G. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 486 (1964).
50. Jukes T. H., Stokstad E. L. R., *Physiol. Rev.* **28**, 51 (1948).
51. Katunuma H., Congr. Japan. Biochem. Assoc. 32 nd, Kyoto, July 1957.
52. Kessel D., De Wayne R., *Biochemistry* **4**, 2631 (1965).
53. Korte F., Schicke H. G., Weitkamp H., *Angew. Chem.* **69**, 96 (1957).
54. Korte E., Aldag H. U., Bannuscher H., Barkemeyer H., Ludwig G., Synnatschke G., Weitkamp H., Abstr. IVth Intern. Congr. Biochem. Vien. str. 93 (1958).

55. Krumdieck C. I., Shaw E., Bough Ch. M., *J. Biol. Chem.* **241**, 383 (1966).
56. Levenberg B., Kaczmarek D. K., *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 272 (1966).
57. Lowry O. H., Bessey O. A., Crawford E. J., *J. Biol. Chem.* **180**, 399 (1949).
58. Ludwig D., Cullen W. P., *Physiol. Zool.* **29**, 153 (1956).
59. Maclean F. J., Forrest H. S., Myers J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 623 (1965).
60. McGinnis A., J., Newburgh R. W., Cheldelin V. H., *Nutrition* **58**, 309 (1955).
61. McNutt W. S., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 217 (1960).
62. McNutt W. S., Forrest H. S., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 951 (1958).
63. Merlini L., Nasini G., *J. Ins. Physiol.* **12**, 123 (1966).
64. Nath R., Greenberg D. M., *Biochemistry* **1**, 435 (1962).
65. Nathan H. A., Funk H. B., *Am. J. Clin. Nutr.* **7**, 375 (1959).
66. Nawa S., Forrest H. S., *National Institute of Genetics, Ann. Report (Mishima)* **13**, 23 (1962) cyt. wg Goto M., Okada T., Forrest H. S., 34.
67. Nurmikko V., Soini J., Aarumaa O., *Acta Chem. Scand.* **19**, 129 (1965).
68. Ortiz P. J., Hotchkiss R. D., Abstr. VIth Intern. Congr. Biochem. New York str. 434 (1964).
69. Peters J. M., Greenberg D. M., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2719 (1958).
70. Peters J. M., Greenberg D. M., *Nature* **181**, 1669 (1958).
71. Pfeleiderer W., Lohrmann R., Reisser F., Söl D., w *Pteridine Chemistry* red. Pfeleiderer W., Taylor E. C., 1964, str. 87.
72. Rabinowitz J. C., Pricer W. E. jr., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4176 (1956).
73. Razet P., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **243**, 185 (1956).
74. Rembold H., *Angew. Chem.* **72**, 46 (1960).
75. Rembold H., *Angew. Chem.* **73**, 543 (1961).
76. Reynolds J. J., Brown G. M., *J. Biol. Chem.* **237**, PC 2713 (1961).
77. Reynolds J. J., Brown G. M., *J. Biol. Chem.* **239**, 317 (1964).
78. Sankar D. V. S., Sankar D. B., *Fed. Proc.* **22**, 232 (1963).
79. Schöpf C., w *Pteridine Chemistry* red. Pfeleiderer W., Taylor E. C., 1964, str. 3.
80. Sedee D. J. W., *Experientia* **9**, 142 (1953).
81. Shiota T., *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 155 (1959).
82. Shiota T., Disraely M. N., *Bacteriol. Proc.* **60**, 174 (1960).
83. Shiota T., Disraely M. N., McCann M. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 194 (1962).
84. Shiota T., McCann M. P., Disraely M. N., *Fed. Proc.* **22**, 204 (1963).
85. Shiota T., Disraely M. N., McCann M. P., *J. Biol. Chem.* **239**, 2259 (1964).
86. Shiota T., Palumbo M. P., *J. Biol. Chem.* **240**, 4449 (1965).
87. Simon H., Wacker H., Walter J., w *Pteridine Chemistry* red. Pfeleiderer W., Taylor E. C., 1964, str. 327.
88. Sirotniak F. M., Donati G. J., Hutchison D. J., *J. Biol. Chem.* **239**, 2677 (1964).
89. Soini J., Nurmikko V., *Acta Chem. Scand.* **17**, 917 (1963).
90. Stackhouse H. L., *Comp. Biochem. Physiol.* **17**, 219 (1966).
91. Stuart A., Wood H. C. S., *Proc. Chem. Soc.* 151 (1962).
92. Taira T., *Nature* **189**, 231 (1961).

93. Terzian L. A., Irreverre F., Stahler N., *J. Ins. Physiol.* **1**, 221 (1957).
94. Townsend L. B., Robins R. K., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 242 (1963).
95. Tsutsue M., Akino M., *Zool. Mag.* **74**, 91 (1965).
96. Vieira E., Shaw E., *J. Biol. Chem.* **236**, 2507 (1961).
97. Viscontini M., w *Pteridine Chemistry* red. Pfeleiderer W., Taylor E. C., 1964, str. 267.
98. Wacker A., Lochman E., Kirschfeld S., w *Pteridine Chemistry* red. Pfeleiderer W., Taylor E. C., 1964, str. 403.
99. Weisman R. A., Brown G. M., *J. Biol. Chem.* **239**, 326 (1964).
100. Weygand F., Waldschmidt M., *Angew. Chem.* **67**, 328 (1955).
101. Weygand F., Wacker A., Trebst A., Swoboda O., *Z. Naturforsch.* **116**, 689 (1956).
102. Weygand F., Schliep H. J., Simon H., Dahms G., *Angew. Chem.* **71**, 522 (1959).
103. Weygand F., Simon H., Dahms G., Waldschmidt M., Schliep H. J., Wacker H., *Angew. Chem.* **73**, 402 (1961).
104. Wood H. C. S., Rowan T., Stuart A., w *Pteridine Chemistry* red. Pfeleiderer W., Taylor E. C., 1964, str. 129.
105. Wright B. E., Anderson M. L., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2027 (1957).
106. Young R. M., Sankar D. B., Sankar D. V. S., Abstr. Vith Intern. Congr. Biochem., New York str. 437 (1964).
107. Zakrzewski S. F., *J. Biol. Chem.* **235**, 1776 (1960).
108. Zakrzewski S. F., Nichol Ch. A., *Fed. Proc.* **14**, 311 (1955).
109. Ziegler-Günder I., *Biol. Rev. (Cambridge Phill. Soc.)* **31**, 313 (1956).
110. Ziegler I., *Naturwiss.* **48**, 458 (1961).
111. Ziegler I. w *Pteridine Chemistry* red. Pfeleiderer W., Taylor E. C. 1964, str. 295.
112. Ziegler-Günder I., Simon H., Wacker A., *Z. Naturforsch.* **116**, 82 (1956).
113. Zielińska Z. M., *Acta Biol. Exper.* **16**, 171 (1952).
114. Zielińska Z. M., *Łódzkie Towarzystwo Naukowe*, Wyd. III, nr 33 (1965).
115. Zielińska Z., Klita S., *Acta Physiol. Pol.* **8**, 584 (1957).
116. Zielińska Z. M., Abstr. IVth Intern. Congr. Biochem. Vien, str. 157, (1958).

GRAŻYNA PALAMARCZYK-LESZCZYŃSKA*,
ANNA MARIA KONECKA**

D(-)mleczanowe dehydrogenazy drożdży

D(-)Lactic Acid Dehydrogenases of Yeast

The structure and properties of D(-)lactate dehydrogenase from anaerobic yeast, as well as of D(-)lactate:cytochrom c and D(-)lactate:ferricyanide oxidoreductases from aerobic yeasts are reviewed.

Badania nad budową i funkcją enzymów stanowią istotny etap wyjaśnienia mechanizmu ich działania, a co za tym idzie ich biologicznego znaczenia. Szczególnie interesujące jest występowanie w tej samej komórce grupy enzymów o podobnych funkcjach katalitycznych. Taką właśnie grupą są dehydrogenazy D(-)mleczanowe drożdży (18). Jedną z nich występuje w komórkach drożdży hodowanych beztlenowo i nazywana jest przez niektórych autorów dehydrogenazą D(-) α -hydrokyskwasów (E.C.1.1.9.9.a) ze względu na zdolność utleniania oprócz D(-)mleczanu również innych D(-) α -hydrokyskwasów (2, 11, 6). Dwie pozostałe to oksydoreduktaza D(-)mleczan:cytochrom c (E.C.1.1.3.4.) i oksydoreduktaza D(-)mleczan:żelazycyjanek (inaczej dehydrogenaza D(-)mleczanowa), charakterystyczne dla drożdży tlenowych (11, 28, 31, 35).

I. Metody izolowania

Dehydrogenaza D(-)mleczanowa z drożdży beztlenowych. W r. 1957 Lindenmayer i Smith (21) stwierdzili, że ekstrakty z drożdży beztlenowych redukowały żelazycyjanek w obecności D(-)mleczanu jako substratu. W r. 1958 niezależnie od siebie Słonimski i Tysarowski (37) oraz Boeri i wsp. (2) podali metody wyodrębniania tego enzymu. Metoda opisana przez Słonimskiego i Tysarowskiego polegała na autolizie komórek drożdży, negatywnej adsorpcji białka enzymatycznego na żelu fosforanu wapnia, frakcjonowaniu siarczanem amonu i denaturacji cieplnej białek towarzyszących w obecności mleczanu. Metoda Boeri'ego

* Mgr, doktorant, Zakład Biochemii Akademii Medycznej, Warszawa

** Mgr, st. asystent, Zakład Biochemii Akademii Medycznej, Warszawa

była podobna, różniła się tylko zastosowaniem acetonu do frakcjonowania białka. W r. 1961 Iwatsubo i Curdel (17) uzupełnili metodę Słonimskiego i Tysarowskiego dalszym oczyszczeniem enzymu na kolumnie z wypełniaczem Sephadex G-75 i DEAE-Sephadex A-50. W trzy lata później Cremona (6) podał inną metodę (tablica 1), za pomocą której otrzymał enzym oczyszczony około 70 razy o specyficznej aktywności 28 μ moli mleczanu utlenionego /min./ mg białka.

Tablica 1

Oczyszczanie dehydrogenazy D(-) mleczanowej z drożdży beztlenowych metodą Cremony (6)

Etap	Aktywność	
	całkowita μ mole mleczanu utlenionego/min	specyficzna μ mole mleczanu utlenionego/mg białka/min
Ekstrakt wodny z komórek mechanicznie rozbitych	1770	0,40
Inaktywacja cieplna w 45°	1725	0,48
Po żelu alumina Cy	1725	0,70
Po frakcjonowaniu siarczanem amonu	1600	2,64
Po kolumnie z wypełniaczem Sephadex G-100	1550	6,06
Eluat z kolumny z wypełniaczem Sephadex G-200	1300	20,0
Osad po wytrąceniu siarczanu amonu	1240	28,0

Rytka i Tysarowski (34) otrzymali enzym oczyszczony 150 razy o specyficznej aktywności 31 μ moli mleczanu utlenionego /min./mg białka. Ich metoda (tablica 2) polegała na rozbijaniu zawieszonych w buforze komórek drożdżowych przez zamrażanie i rozmrażanie. Nowym elementem było wprowadzenie trypsyny, która usuwa białka towarzyszące, nie działając na dehydrogenazę D(-)mleczanową.

Rytka i Tysarowski (34) zbadali również wpływ różnych sposobów rozbijania komórek drożdży na aktywność ekstraktów. Porównując autolizę komórek drożdży w temperaturze 37°C, ekstrakcję z proszku acetonowego, rozcieranie z piaskiem oraz zamrażanie i rozmrażanie, stwierdzili, że ta ostatnia metoda dawała ekstrakt o największej stabilności i aktywności.

Żadna z wymienionych metod izolowania nie doprowadziła jednak do otrzymania krystalicznej dehydrogenazy D(-)mleczanowej.

Oksydoreduktaza D(-)mleczan:cytochrom c. Enzym ten związany jest ściśle z łańcuchem oddechowym drożdży (12, 28). Metody jego otrzymy-

Tablica 2

Oczyszczanie dehydrogenazy D(-)mleczanowej z drożdży beztlenowych metodą Rytki i Tysarowskiego (34)

Etap	Aktywność	
	całkowita μmole mleczanu utlenionego/min	specyficzna μmole mleczanu min/mg białka
Ekstrakt w buforze fosforanowym	300	0,2
Trawienie trypsyną i adsorpcja na żelu fosforanu wapnia	275	0,55
Osad po siarczanie amonu, 0,35—0,75 nasycenia	315	1,0
Ogrzewanie w obecności DL-mleczanu i ZnSO ₄ (53°C, 3 min.)	240	5,0
Drugie trawienie trypsyną i adsorpcja na żelu fosforanu wapnia	224	8,0
Osad po siarczanie amonu 0,50—0,55 nasycenia	140	15,5
Ogrzewanie w obecności DL-mleczanu i ZnSO ₄ (53°C, 3 min.)	93	31,0

wania podali Nygaard (28) oraz Singer i wsp. (14, 16) niezależnie od siebie. Nygaard (28) ekstrahował wodą proszek acetonowy z mechanicznie rozbitych komórek i oczyszczał wyciąg przez dwukrotną chromatografię na kolumnie z DEAE-celulozą. Otrzymał on enzym oczyszczony około 150 razy o aktywności specyficznej 5200 μmoli cytochromu c zredukowanego (godz./mg białka). W dwa lata później Singer i wsp. (14, 16) otrzymali preparat enzymu, oczyszczony 4100 razy, którego specyficzna aktywność wynosiła 1670 μmoli D(-)mleczanu utlenionego/min./mg białka. Poszczególne etapy oczyszczania stosowanego przez Singera i wsp. przedstawione są w tablicy 3.

Aktywność preparatu oksydoreduktazy D(-)mleczan:cytochrom c otrzymanej przez Nygaarda stanowiła zaledwie 28% aktywności preparatu Singera. Różnica ta może być spowodowana zastosowaniem przez Nygaarda kolumn z DEAE-celulozą, na których następuje częściowa dysocjacja flawiny od enzymu, oraz stosunkowo wysokiej temperatury (55°C), podczas gdy najwyższa temperatura stosowana przez Singera wynosiła 22°C.

Oksydoreduktaza D(-)mleczan:żelazicyjanek. Enzym ten jest również związany z cząsteczkami oddechowymi drożdży i izoluje się go podobnie jak oksydoreduktazę D(-)mleczan:cytochrom c. Aktywności obu tych enzymów towarzyszą sobie podczas pierwszego frakcjonowania na kolumnie DEAE-celulozowej ale podczas powtórnej chromatografii aktywność oksydoreduktazy D(-)mleczan:żelazicyjanek zanika (28). Enzym ten jest

trwały w ciągu 1—2 godz. w temp. 5°C. Po około 20 godzinach aktywność jego zanika całkowicie, podczas gdy aktywność oksydoreduktazy D(-)mleczan:cytochrom c pozostaje niezmienną.

Tablica 3

Oczyszczenie oksydoreduktazy D(-) mleczan:cytochrom c (wg 16)

Etap	Aktywność	
	całkowita μmole mleczanu utlenione/min.	specyficzna μmole mleczanu utlenione/min/mg białka
Cząsteczki oddechowe drożdży	115 000	0,4
Ekstrakcja tritonem X-100 z proszku acetonowego	97 200	7,0
Eluat z żelu fosforanowo-wapniowego	84 000	32,0
Po trawieniu fosfolipazą A z <i>Naja naja</i> i bakteryjną proteinazą	69 600	75,0
Eluat z kolumny z DEAE-celulozy	62 400	300,0
Frakcja wytrącona przy 0,53—0,68 na- syceniu siarczanem amonu	40 000	440,0
Eluat z CM-celulozy	24 000	940,0
Po preparatywnym ultrawirowaniu	8 000	1670,0

II. Własności fizyko-chemiczne

Koenzymy. Wszystkie dehydrogenazy D(-)mleczanowe drożdży są flawoproteidami. Koenzymem dehydrogenazy D(-)mleczanowej z drożdży beztlenowych i oksydoreduktazy D(-)mleczan:cytochrom c jest FAD, natomiast oksydoreduktazy D(-)mleczan:żelazicyjanek — FMN.

Obecność FAD jako koenzymu w preparatach dehydrogenazy D(-)mleczanowej drożdży beztlenowych została stwierdzona niezależnie przez kilku autorów różnymi metodami. Boeri i wsp. (2, 3) badając widmo enzymu stwierdzili odpowiadające flawinie maksimum absorpcji w przedziale 420—450 mμ. Słonimski i Tysarowski (37) wykazali, że inkubacja z FAD chroni enzym przed inaktywacją, FMN natomiast nie daje tego efektu. Na tej podstawie wysunięto wniosek, że FAD jest prawdopodobnie koenzymem dehydrogenazy D(-)mleczanowej, co potwierdziły dalsze badania (1, 38). Iwatsubo i Curdel (17) otrzymali apoenzym, który nie utleniał mleczanu, a uzyskiwał aktywność po inkubacji z FAD. Również Rytko i Tysarowski (34) inkubując z FAD zinktywowane cieplnie preparaty enzymu odzyskiwali 35—50% aktywności

Flawoproteidową naturę oksydoreduktazy D(-)mleczan:cytochrom c wykazał Nygaard po zbadaniu widma tego enzymu (22, 28). Widmo różni-

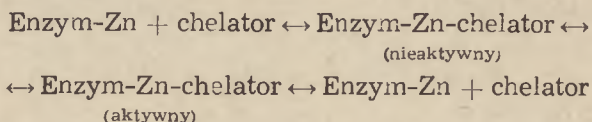
cowe wykazywało maksimum absorpcji w 450 m μ , w pH 3,0 pojawiała się silna fluorescencja związana z oddysocjowaniem flawiny. Badania widma emisji fluorescencyjnej oraz test z oksydazą D-aminokwasów i metody chromatografii bibułowej potwierdziły identyczność flawiny z FAD (28). Do tego samego wniosku doszli również Gregolin i Singer (16). Wykazali oni, że apoenzym otrzymany przez wytrącanie w kwaśnym środowisku siarczanem amonu reaktywuje się FAD, podczas gdy FMN nie przywraca aktywności.

Badania fluorometryczne nad oksydoreduktazą D(-)mleczan:żelazicyjanek wskazują na obecność FMN związanego z tym enzymem (28). Nie jest jednak zupełnie jasne czy oksydoreduktaza D(-)mleczan:żelazicyjanek jest rzeczywiście odrębnym enzymem współdziałającym z FMN. Stwierdzono bowiem, że preparatom wykazującym aktywność obu oksydoreduktaz: D(-)mleczan:cytochrom c i D(-)mleczan:żelazicyjanek towarzyszą enzymy proteolityczne i pirofosfatazy, które mogą powodować hydrolizę FAD do FMN. Wobec tego można przypuszczać, że oksydoreduktaza D(-)mleczan:żelazicyjanek jest produktem degradacji oksydoreduktazy D(-)mleczan:cytochrom c.

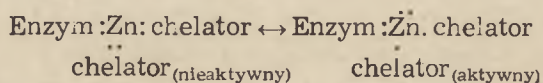
Dehydrogenaza D(-)mleczanowa drożdży beztlenowych i oksydoreduktaza D(-)mleczan:cytochrom c są metaloflawoproteidami. Stwierdzono, że obydwa te enzymy są hamowane w odwracalny sposób przez związki chelatujące (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 38). Identyfikację metalu związanego z dehydrogenazą D(-)mleczanową drożdży beztlenowych przeprowadzano jedynie metodami kinetycznymi. Dlatego też zapewne Curdel, Labeyrie i wsp. (8, 9, 17, 38) identyfikują metal jako cynk, a Cremona (6) uważa, że również kobalt może odgrywać taką samą rolę. Curdel, Labeyrie i wsp. (8, 9, 28) inaktywowali enzym przy pomocy EDTA i osiągnęli pełną reaktywację po dodaniu cynku. Po dodaniu nasycających stężeń kobaltu maksymalna aktywność była w porównaniu z cynkiem czterokrotnie mniejsza (9), przy czym K_m dla cynku wynosiło 6 μ moli, a dla kobaltu 20 μ moli D(-)mleczanu. Inne badane dwuwartościowe metale: Mn, Ni, Mg, Ca, V, nie reaktywowały enzymu (8). Ponadto wykazano, że nieaktywny apoenzym odzyskiwał aktywność po dodaniu FAD i cynku (10, 17). Natomiast Cremona (6) uzyskał pełną reaktywację enzymu zinaktywowanego przez EDTA zarówno po dodaniu cynku jak i kobaltu. Wartości K_m były identyczne dla obu metali ($9,3 \times 10^{-4}$ M przy utlenianiu D(-)mleczanu i $4,8 \times 10^{-3}$ M przy utlenianiu D- α -hydroksymaślanu, co sugeruje ich jednakowy udział w katalizowanej reakcji.

Hamowanie enzymu przez EDTA zaobserwowane przez badaczy francuskich (8, 9, 38) było ich zdaniem związane z usunięciem przez chelator metalu z cząsteczki enzymu. Cremona (6) stwierdził jednak reaktywację nie tylko po dodaniu metalu, lecz również po dializie i ogrzewaniu zinaktywowanego preparatu, co pozwoliło na postawienie wniosku o od-

miennym mechanizmie działania chelatorów na ten enzym. Polega on na utworzeniu nieaktywnego kompleksu: enzym-Zn-chelator, który wskutek ogrzewania lub dializy może ulegać reaktywacji i rozpadowi wg następujących reakcji (4, 5, 6):



Rola metalu w dehydrogenazie D(-)mleczanowej polega raczej na wiązaniu substratu niż na udziale w przenoszeniu elektronów. Wskazuje na to fakt, że obecność mleczanu chroni enzym przez inaktywacją spowodowaną przez EDTA ((20, 38). Reaktywacja cieplna nieaktywnego kompleksu: enzym-Zn-chelator sprowadzałaby się do uwolnienia dwóch miejsc koordynacyjnych cynku, które mogą przyłączyć substrat.



Oksydoreduktaza D(-)mleczan:cytochrom c również zawiera cynk (5, 7, 11, 12, 15, 16). W najbardziej jednorodnych preparatach tego enzymu stwierdzono obecność trzech gramoatomów cynku na jeden mol FAD, z których dwa znajdują się w centrum aktywnym (7, 16). Trzeci atom cynku może odgrywać rolę w utrzymywaniu drugorzędowej struktury białka. Wniosek ten potwierdza fakt, że przedłużenie inkubacji enzymu ze związkiem chelatującym uniemożliwia odzyskanie pełnej aktywności po zastosowaniu któregośkolwiek z czynników reaktywujących (7). Jak już wspomniano związki chelatujące inaktywują oksydoreduktazę D(-)mleczan:cytochrom c w sposób odwracalny. Mechanizm ich działania polega również na utworzeniu nieaktywnego kompleksu enzym-Zn-chelator (4, 5, 6). Hamowanie to zachodzi według reakcji I rzędu. Wiązanie cynku z FAD można wykluczyć, gdyż usunięcie całej flawiny nie powoduje dysocjacji cynku (7). Rola cynku, podobnie jak w dehydrogenazie D(-)mleczanowej drożdży beztlenowych polega na wiązaniu substratu, ponieważ substrat chroni enzym przed inaktywującym działaniem chelatora (7).

Specyficzność substratowa i akceptorowa. Obecność FAD i cynku w dehydrogenazie D(-)mleczanowej drożdży beztlenowych i oksydoreduktazie D(-)mleczan:cytochrom c świadczą o podobieństwie tych dwóch enzymów. Różnią się one jednak zasadniczo specyficznością substratową i akceptorową (13).

Dotychczas nie znaleziono naturalnego akceptora elektronów, który byłby redukowany przez dehydrogenazę D(-)mleczanową drożdży beztlenowych. Enzym ten redukuje w obecności substratu żelazycyjanek, 2,6-dwuchlorofenoloindofenol, błękit metylenowy i menadion. Cytochrom c nie jest redukowany przez enzym. Z danych przedstawionych

w tablicy 4 wynika, że żelazicyjanek jest najlepszym akceptorem elektronów.

Oksydoreduktaza D(-)mleczan:cytochrom c wykazuje aktywność w stosunku do cytochromu c i metasiarczanu fenazyny. 2,6-dwuchlorofenolindofenol może być redukowany jedynie w obecności metasiarczanu fenazyny jako pośrednika. Szybkości maksymalne uzyskane z metasiarczanem fenazyny są ośmiokrotnie większe niż z cytochromem c (12). Stałe Michaelisa dla cytochromu c i metasiarczanu fenazyny wynoszą odpowiednio $5,4 \times 10^{-6}$ M i $4,45 \times 10^{-3}$ M (16).

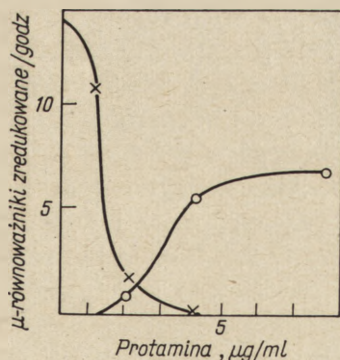
T a b l i c a 4

Aktywność dehydrogenazy D(-)mleczanowej z drożdży beztlenowych wobec różnych akceptorów elektronów (wg 6)

Akceptor	Względna szybkość reakcji
Żelazicyjanek	100
2,6-dwuchlorofenolindofenol	5,6
Błękit metylenowy	0,3
Menadion	9,8
Cytochrom c	0
Metasiarczan fenazyny	0
1,2-naftochinono-4-sulfonian	0

Oksydoreduktaza D(-)mleczan:żelazicyjanek utlenia substrat jedynie w obecności żelazicyjanku i 2,6-dwuchlorofenolindofenolu jako akceptorów (28).

Jest rzeczą interesującą, że specyficzność akceptorową oksydoreduktazy D(-)mleczan:cytochrom c można zmienić. Dodanie siarczanu protaminy powoduje zanik zdolności redukcji cytochromu c i pojawianie się zdolności redukcji żelazicyjanku (31, 32) (rysunek 1).



Rys. 1. Zmiana specyficzności akceptorowej oksydoreduktazy D(-)mleczan:cytochrom c pod wpływem siarczanu protaminy (wg 31)

○—○—○ K₃(Fe(CN)₆)
 ×—×—× cytochrom c

Zmiana wywołana przez siarczan protaminy jest odwracalna przez DNA i wielowartościowe aniony. To zaobserwowane przez Nygaarda zjawisko jest jeszcze jedną wskazówką, że oksydoreduktaza D(-)mleczan:żelazicyjanek z drożdży tlenowych może być produktem degradacji oksydoreduktazy D(-)mleczan:cytochrom c.

Dehydrogenaza D(-)mleczanowa drożdży beztlenowych jest enzymem o dość szerokiej specyficzności substratowej. Utlenia ona szereg D- α -hydroksykwasów (3, 6, 19, 34), największe powinowactwo wykazuje jednak w stosunku do kwasu D(-)mlekowego (tablica 5).

T a b l i c a 5

Specyficzność substratowa dehydrogenazy D(-)mleczanowej z drożdży beztlenowych (wg 6)

Substrat	$K_m \times 10^{-3} M$
D-mleczan	1,0
D-jabłczan	4,9
DL- α -hydroksymasłowy	5,0
DL-glicerynian	11,5

Oksydoreduktaza D(-)mleczan:cytochrom c ma dość ograniczoną specyficzność substratową i oprócz D(-)mleczanu (K_m $2,8 \times 10^{-4} M$) utlenia jedynie DL- α -hydroksymasłan (K_m $1,4 \times 10^{-3} M$) (12, 16) i kwas D- α -hydroksywalerianowy (K_m $2,5 \times 10^{-3} M$) (28).

Taką samą specyficzność substratową wykazuje oksydoreduktaza D(-)mleczan:żelazicyjanek, przy czym szybkości utleniania D(-)mleczanu, DL-hydroksymasłanu są jednakowe, a kwas D- α -hydroksywalerianowy utleniany jest dwa razy wolniej (28).

Zależność od pH. Optimum pH dehydrogenazy D(-)mleczanowej drożdży beztlenowych wynosi 8,0 (6). Preparaty otrzymane przez Rytkę i Tysarowskiego (34) przejawiały największą aktywność w zakresie pH 8,6—8,9. Jednocześnie enzym ten był bardziej stabilny w alkalicznym środowisku, odmiennie niż preparaty Cremony (6), które wykazywały największą stabilność w pH 6,8.

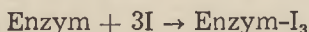
Dla oksydoreduktazy D(-)mleczan:cytochrom c optimum pH zależy od rodzaju użytego akceptora elektronów i wynosi dla cytochromu c 8,0, a dla metasiarczanu fenazy 7,5. Enzym był stabilny w środowisku obojętnym i słabo kwaśnym, gwałtowna inaktywacja następowała w pH powyżej 8,0 (12).

Oksydoreduktaza D(-)mleczan:żelazicyjanek wykazuje największą aktywność w pH 6,0, czym różni się od dwóch poprzednich enzymów (28).

Inhibitory. Dehydrogenaza D(-)mleczanowa drożdży beztlenowych jest hamowana kompetycyjnie przez kwasy monokarboksylowe i kwas szcza-

wiowy, który wykazuje największe powinowactwo do enzymu (34). Kompetycyjne hamowanie powoduje też wiele α -ketokwasów takich jak: pirogronian, α -ketoglutaran, szczawiooctan, przy czym najsilniej hamuje α -ketoglutaran. Hydroksykwasy: DL- α -hydroksymasłowy, DL-jabłkowy i mezowinowy nie wpływają na aktywność enzymu. Na podstawie badań kinetycznych wykazano, że na jedną cząsteczkę enzymu przypada jedna cząsteczka inhibitora (34). Cremona stwierdził hamujący wpływ L(+)-mleczanu i L(-)-jabłczanu (6). Również odczynniki na grupy -SH są bardzo silnymi kompetycyjnymi inhibitorami enzymu (34).

W przeciwieństwie do enzymu z drożdży beztlenowych oksydoreduktaza D(-)-mleczan:cytochrom c jest mało wrażliwa na analogi substratów i odczynniki na grupy -SH. Pirogronian, L(+)-mleczan, L(-)-jabłczan nie hamują wcale enzymu, a działanie szczawianu jest słabsze w porównaniu do jego hamującego wpływu na dehydrogenazę D(-)-mleczanową drożdży beztlenowych (16). Oksydoreduktaza D(-)-mleczan:cytochrom c jest wrażliwa na kationy, które jak wynika z kinetycznych badań Nygåarda (29, 30, 32) działają kompetycyjnie w stosunku do akceptora. Nygård (33) sądzi, że w miejscu wiązania akceptora znajdują się ujemnie naładowane grupy karboksylowe, które reagują z kationami według reakcji:

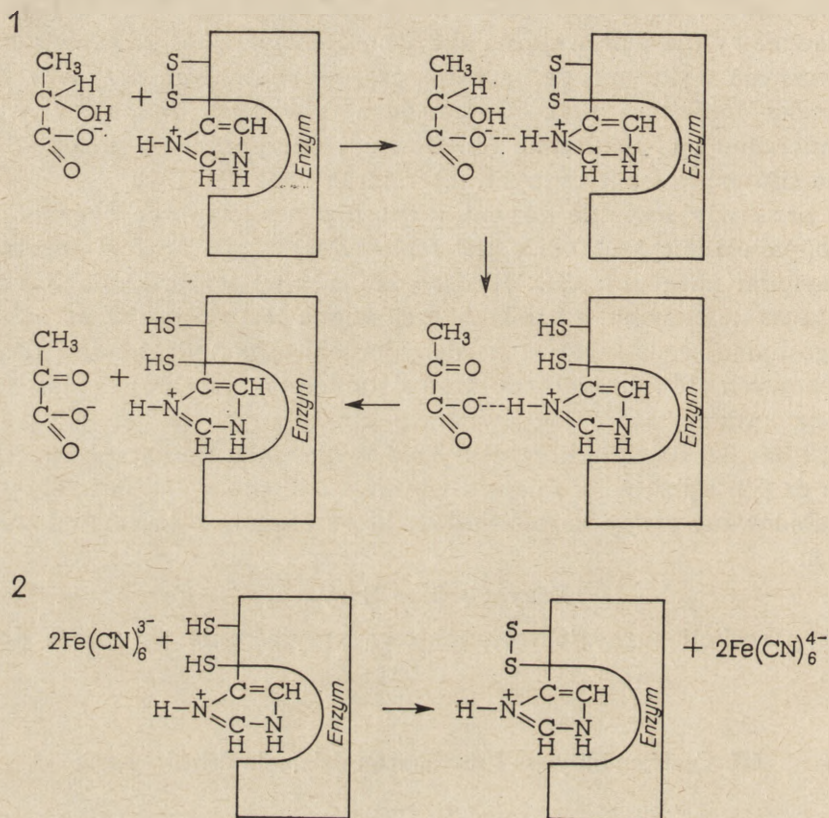


Ten typ reakcji sugeruje trójpunktowe przyłączenie akceptora do enzymu.

III. Centrum aktywne i mechanizm działania dehydrogenaz

Rytka i Tysarowski (34) zaproponowali schemat budowy centrum aktywnego i reakcji mleczanu z dehydrogenazą D(-)-mleczanową drożdży beztlenowych (schemat 1). Postulują oni udział grupy karboksylowej substratu, a nie grupy hydroksylowej, ponieważ po zastąpieniu α -ketokwasów hydroksykwasami nie obserwowano hamowania. Na podstawie wartości pK równej 7,0 i ciepła jonizacji — 6000 cal wnioskowano o obecności histydyny w centrum aktywnym i jej udziale w wiązaniu substratu. Z prac Curdel, Labeyrie i wsp. wynika jednakże, że również cynk może brać udział w wiązaniu mleczanu (20, 38). Ponieważ enzym jest wrażliwy na PCMB prawdopodobnie zatem grupy -SH biorą udział w reakcji enzymatycznej. Wniosek ten potwierdzają prace Tysarowskiego i Palamarczyk (39, 40) nad modyfikacją grup -SH znajdujących się w centrum aktywnym dehydrogenazy z drożdży beztlenowych. Zablockowanie grup -SH enzymu przez utlenienie, powoduje utratę jego aktywności w stosunku do żelazicyjanku, nie narusza natomiast zdolności redukcji 2,6-dwuchlorofenolindofenolu. Można więc przypuszczać, że podczas utlenienia substratu żelazicyjanek reaguje z gru-

pami -SH znajdującymi się w centrum aktywnym, a 2,6-dwuchlorofenoloindofenol może być redukowany przy udziale innych grup funkcyjnych enzymu np. flawiny.



Schemat 1. Proponowany schemat utleniania D(-)mleczanu przez dehydrogenazę D(-)mleczanową w obecności żelazicyjanku jako akceptora elektronów (wg 34)

O mechanizmie działania i budowie centrum aktywnego dwóch pozostałych enzymów nie ma na razie bliższych danych. Dotychczasowe doświadczenia (5, 7, 11, 12, 15, 16) wskazują na obecność cynku w centrum aktywnym oksydoreduktazy D(-)mleczan:cytochrom c, którego rola polega prawdopodobnie na reakcji z substratem. Ponadto prace Nygåarda sugerują obecność grup karboksylowych odpowiedzialnych za reakcję enzymu z akceptorem elektronów (33).

IV. Dehydrogenazy mleczanowe podczas adaptacji tlenowej drożdży

Wielu badaczy (17a, 23, 24, 25, 27, 37) sugerowało możliwość konwersji dehydrogenazy D(-)mleczanowej drożdży hodowanych beztlenowo w tlenowe dehydrogenazy mleczanowe w czasie adaptacji oddechowej.

Nygaard stwierdził, że w czasie aeracji drożdży beztlenowych aktywność dehydrogenazy D(-)mleczanowej obniża się, a jednocześnie pojawia się i wzrasta aktywność oksydoreduktaz D i L-mleczan:cytochrom c (27). Indukcja tych enzymów nie była hamowana przez aminokwasy i ich analogi, podczas gdy w tych warunkach hamowana była aktywność innych enzymów oddechowych jak oksydaza cytochromowa i dehydrogenaza jabłczanowa. Na tej podstawie Nygaard uważa, że podczas adaptacji tlenowej drożdży oksydoreduktazy D i L-mleczan:cytochrom c powstają w odmienny sposób niż inne enzymy oddechowe, a mianowicie kosztem dehydrogenazy D(-)mleczanowej (24). Późniejsze prace Singera (12, 36) wykazały jednak, że wprawdzie podczas adaptacji tlenowej drożdży zachodzi gwałtowna degradacja dehydrogenazy D(-)mleczanowej, ale nie towarzyszy jej pojawianie się aktywności oksydoreduktaz D i L-mleczan:cytochrom c. Możliwość konwersji tych enzymów pozostaje więc nadal otwarta.

Dehydrogenazy D(-)mleczanowe drożdży nie zostały wyodrębnione w stanie krystalicznym, co znacznie utrudnia możliwość ich dokładnego zbadania. Otrzymywane metodami kinetycznymi dane bardzo często nie są ze sobą zgodne. Z niepublikowanych prac Singera oraz Ghiretti-Magaldi i Kearney (6) wynika, że np. własności dehydrogenazy D(-)mleczanowej drożdży beztlenowych zależą od wielu różnych czynników takich jak warunki hodowli drożdży i metody otrzymywania enzymu. Nasuwa się wniosek, że być może w drożdżach beztlenowych występują różne formy dehydrogenazy D(-)mleczanowej.

LITERATURA

1. Baudras A., Iwatsubo M., Labeyrie F., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **250**, 2621 (1960).
2. Boeri E., Cutulo E., Saccomani R., *Bool. Soc. Ital. Biol. Sperim.* **34**, 1887 (1958).
3. Boeri E., Cremona T., Singer T. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2**, 298 (1960).
4. Cremona T., Singer T. P., *Nature* **194**, 836 (1962).
5. Cremona T., Singer T. P., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 412 (1962).
6. Cremona T., *J. Biol. Chem.* **239**, 1457 (1964).
7. Cremona T., Singer T. P., *J. Biol. Chem.* **239**, 1466 (1964).
8. Curdel A., Naslin L., Labeyrie F., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **249**, 1959 (1959).
9. Curdel A., Labeyrie F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 175 (1961).
10. Curdel A., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **254**, 4092 (1961).
11. Ghiretti-Magaldi A., Cremona T., Singer T. P., Bernath P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 334 (1961).
12. Gregolin C., Singer T. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 189 (1961).
13. Gregolin C., Singer T. P., Kearney E. B., Boeri E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **94**, 780 (1961).

14. Gregolin C., Singer T. P., *Nature* **193**, 659 (1962).
15. Gregolin C., Singer T. P., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 410 (1962).
16. Gregolin C., Singer T. P., *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 201 (1963).
17. Iwatsubo M., Curdel A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 385 (1961).
- 17a. Kattermann R., Słonimski P. P., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **250**, 220 (1960).
18. Konecka A. M., Palamarczyk-Leszczyńska G., *Post. Biochem.* **13**, 31 (1967).
19. Labeyrie F., Słonimski P. P., Naslin L., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 262 (1959).
20. Labeyrie F., Stachiewicz E., *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 136 (1961).
21. Lindenmayer A., Smith L., *Fed. Proc.* **16**, 212 (1957).
22. Nygaard A. P., *Acta Chem. Scand.* **14**, 1843 (1960).
23. Nygaard A. P., *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 317 (1960).
24. Nygaard A. P., *Arch. Biochem. Biophys.* **87**, 178 (1960).
25. Nygaard A. P., *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 155 (1960).
26. Nygaard A. P., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **94**, 774 (1961).
27. Nygaard A. P., *J. Biol. Chem.* **236**, 1585 (1961).
28. Nygaard A. P., *J. Biol. Chem.* **236**, 920 (1961).
29. Nygaard A. P., *J. Biol. Chem.* **236**, 2128 (1961).
30. Nygaard A. P., *J. Biol. Chem.* **236**, 2779 (1961).
31. Nygaard A. P., *Acta Chem. Scand.* **15**, 1627 (1961).
32. Nygaard A. P., *J. Biol. Chem.* **237**, 742 (1962).
33. Nygaard A. P., D and L-cytochrome c reductase and some related enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*, Norwegian Universities Press 1962.
34. Rytka J., Tysarowski W., *Acta Biochim. Polon.* **12**, 229 (1965).
35. Singer T. P., Kearney E. B., Gregolin C., Boeri E., Rippa M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 428 (1960).
36. Singer T. P., Kearney E. B., Gregolin C., Boeri E., Rippa M., *Biochim. Biophys. Acta* **54**, 52 (1961).
37. Słonimski P. P., Tysarowski W., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **246**, 1111 (1958).
38. Stachiewicz E., Labeyrie F., Curdel A., Słonimski P. P., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 45 (1961).
39. Tysarowski W., Palamarczyk G., III Sympozjum PTBioch. Budowa i funkcje enzymów, Kazimierz 1964.
40. Tysarowski W., Palamarczyk-Leszczyńska G., Materiały II Zjazdu Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych, Wiedeń 1965.

ANNA MARIA KONECKA *,
GRAŻYNA PALAMARCZYK-LESZCZYŃSKA **

Budowa i mechanizm działania cytochromu b_2

The Structure and Function of Cytochrome b_2

The structure and mechanism of action of L(+)lactate:cytochrom c oxidoreductase from yeasts are discussed.

Cytochrom b_2 jest jedyną spośród czterech znanych dotychczas dehydrogenaz mleczanowych drożdży, zdolną do utleniania izomeru L(+) kwasu mlekowego; pozostałe trzy katalizują utlenianie izomeru D(-).

Enzym ten, którego pełna nazwa brzmi oksydoreduktaza L(+)mleczan:cytochrom c (E.C. 1.1.2.3), został po raz pierwszy wyizolowany z *Saccharomyces cerevisiae* przez Dixon a i wsp. (11, 12, 13, 22).

I. Metody izolowania

Metoda izolowania cytochromu b_2 stosowana przez Dixon a i wsp. (11, 12, 13, 22) polegała na autolizie świeżych komórek drożdżowych w temperaturze 37°C, kilkakrotnej adsorpcji i elucji z żelu fosforanu wapnia i wysalaniu siarczanem amonu. Otrzymany w ten sposób cytochrom b_2 nie zawierał wprawdzie cytochromu c, ale nie był białkiem krystalicznym.

W latach 50-tych prace nad izolowaniem i krystalizacją cytochromu b_2 prowadzono głównie w pracowni Morton a i tam też udało się otrzymać preparat krystaliczny (2, 3, 4). Jako źródło enzymu służyły w tych badaniach wysuszone komórki drożdżowe odtłuszczone n-butanolem w ciągu 20 min. w temperaturze pokojowej (28). Cytochrom b_2 wraz z towarzyszącym cytochromem c ekstrahowano roztworem mleczanu z dodatkiem EDTA i frakcjonowano acetonem w temperaturze -5°C. Po dializie w warunkach beztlenowych wobec roztworu mleczan-EDTA w pH 6,8 cytochrom b_2 wytrącał się w postaci różowych, tetragonalnych kryształów (rysunek 1), podczas gdy cytochrom c pozostawał w roztworze. Tą

* Mgr, st. asystent Zakładu Biochemii Akademii Medycznej, Warszawa.

** Mgr, doktorant Zakładu Biochemii Akademii Medycznej, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: NEM — imid kwasu N-etylomaleinowego, PCMS — kwas p-chlorortęciowo-sulfonowy.

metodą otrzymano około 10—20 mg krystalicznego białka z 1 kilograma suchych drożdży.

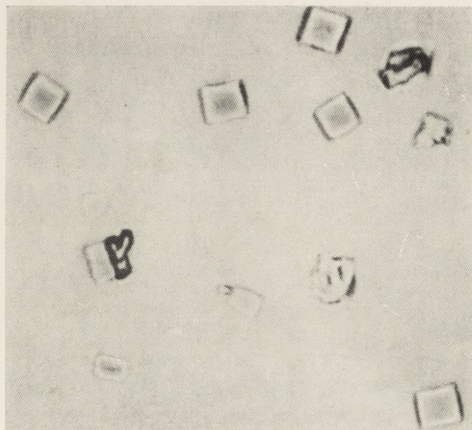
Inną metodę otrzymywania krystalicznego cytochromu b_2 opisał R i p p a (38). Frakcjonował on białka mechanicznie rozbitych komórek drożdży różnymi stężeniami acetonu w temperaturze 0°C . Cytobrom b_2 wytrącał się w postaci krystalicznej po kilkakrotnej dializie wobec roztworu mleczan-EDTA o pH 6,8.

Prace nad oczyszczaniem cytochromu b_2 prowadzili również B o e r i i wsp. (14) oraz Y a m a n a k a i wsp. (41). Stosowali oni frakcjonowanie siarczanem amonu oraz wielokrotną adsorpcję i elucję z żelu fosforanu wapnia lub alumina Cy. Y a m a s h i t a i wsp. (42) oraz H a s e g a w a (24) stosowali autolizę komórek drożdżowych działającą na nie octanem etylu w temperaturze 0°C . N y g a a r d (34, 35) zaproponował metodę polegającą na mechanicznym rozbiciu komórek drożdży, frakcjonowaniu acetonem i chromatografii rozdzielczej na kolumnie z DEAE-celulozą. Wszystkie te metody nie doprowadziły jednak do otrzymania krystalicznego enzymu.

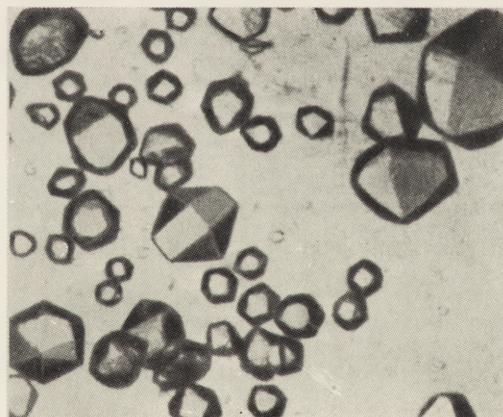
II. Budowa cytochromu b_2

Cytochrom b_2 jest dezoksyrybopolinukleoproteidem, zawierającym ekwimolarne ilości fosforanu ryboflawiny i protohemu (5, 14, 29, 35, 28) w stosunku 2:2 (9, 10). O jednorodności białka enzymatycznego świadczą wyniki długotrwałej elektroforezy w buforze o wysokiej sile jonowej. W zakresie pH 5,0—8,0 stwierdzono obecność pojedynczego składnika wędrującego do anody (7, 9). Również w analizie sedymentacyjnej w pH 6,8 uzyskano tylko pojedynczy szczyt (7, 9, 25).

Ciężar cząsteczkowy cytochromu b_2 określono w oparciu o analizę zawartości hemu jako równy $81\,800 \pm 900$, z oznaczenia zawartości flawiny wynikało, że ciężar ten wynosi $83\,300 \pm 1700$, a z zawartości żelaza hemowego — $67\,900$ (5, 9). Najczystsze frakcje enzymu otrzymanego przez N y g a a r d a (35) miały ciężar cząsteczkowy $97\,000$ (36). B o e r i i wsp. opierając się na analizie zawartości hemu w niekrystalicznym cytochromie b_2 podawali, że jego ciężar cząsteczkowy wynosi $230\,000$ i $140\,000$ (14, 16). Z pomiarów szybkości sedymentacji i dyfuzji wynika, że ciężar cząsteczkowy krystalicznego cytochromu b_2 wynosi $183\,400 \pm 3900$ (9) tzn. jest dwa razy większy niż wartość obliczona na podstawie analizy chemicznej. Prawdopodobnie zatem krystaliczny cytochrom b_2 jest dimerem zawierającym dwie grupy hemowe i dwie flawinowe w cząsteczce (9). Badania kinetyczne (29, 17) wykazały, że w pewnych warunkach redukcja enzymu przez mleczan wymaga więcej niż dwóch moli substratu na grupę hemową, co potwierdza wniosek o dimerycznej strukturze cytochromu b_2 .



Rys. 1. Kryształy cytochromu b_2 typu I (wg 4)



Rys. 3. Kryształy cytochromu b_2 typu II (wg 30)

Krystaliczny cytochrom b_2 zawiera składnik niebiałkowy — dezoksyrybopolinukleotyd (DNA) powodujący silną absorpcję światła w 265 m μ (1, 5, 29, 39). DNA występuje w cytochromie b_2 w stałych ilościach i stanowi około 6% jego suchej masy. Analiza składu nukleotydowego (7, 27) wykazała obecność 15 nukleotydów na mol protohemu: 6 nukleotydów adenylowych, 5 tymidylowych, 2 guanylowe i 2 cytydylowe. Ciężar cząsteczkowy DNA związanego z cytochromem b_2 wynosi 10 000 (31) co potwierdza dimeryczną budowę enzymu. Rola DNA w cytochromie b_2 nie jest znana. Składnik ten można usunąć bez straty aktywności enzymu (7, 27, 30), a włączanie ^{32}P do dezoksypoliribonukleotydu podczas utleniania mleczanu nie jest katalizowane przez cytochrom b_2 (29). Rekrystalizowany cytochrom b_2 nie zawiera rybozy ani uracylu, co wskazuje na brak rybonukleotydów związanych z tym białkiem (7). Nygaard znalazł wprawdzie rybonukleotydy związane z niekrystalicznym cytochromem b_2 (34), jednak Morton (29) wykazał, że pozostawały one w roztworze po krystalizacji enzymu.

Tablica 1

Skład aminokwasowy krystalicznego cytochromu b_2 (wg 6)

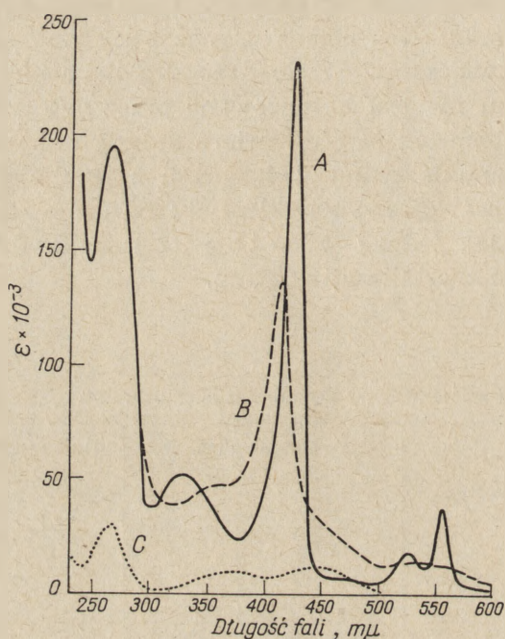
Nazwa	Azot aminowy jako % suchej masy	Ilość reszt aminokwasowych na 1 mol hemu
Alanina	4,55	39,5
Arginina	9,70	21,0
Kwas asparaginowy	6,85	59,5
1/2 cz. cystyny	2,12	18,5
Kwas glutaminowy	6,81	59,1
Glicyna	4,77	41,4
Histydyna	2,14	6,2
Izoleucyna	3,20	27,8
Leucyna	6,35	55,2
Lizyna	10,42	45,7
Metionina	—	0
Fenylalanina	1,61	14,0
Prolina	3,79	32,9
Seryna	3,08	26,5
Treonina	2,52	22,1
Tryptofan	0,79	3,4
Tyrozyna	1,60	13,8
Walina	4,85	42,1

Skład aminokwasowy cytochromu b_2 podany jest w tablicy 1. Enzym nie zawiera metioniny (6).

Widmo absorpcji utlenionego i zredukowanego enzymu przedstawiono na rysunku 2. Zredukowany cytochrom b_2 posiada maksimum absorpcji

przy długości fali 556, 528, 424, 330 i 265 m μ (5). Utleniony enzym ma typowe ferrichromowe widmo ze słabym, szerokim pasmem pomiędzy 530 i 560 m μ i maksimum przy długości fali 413 i 359 m μ .

Zmiana pH w zakresie od 5,0—7,0 nie powoduje przesunięć w pozycjach głównych pasm absorpcji zredukowanego cytochromu b_2 . W pH 10 pojawia się natomiast nowy szczyt przy długości fali 450 m μ spowodowany prawdopodobnie oddysocjowaniem flawiny od enzymu (5).



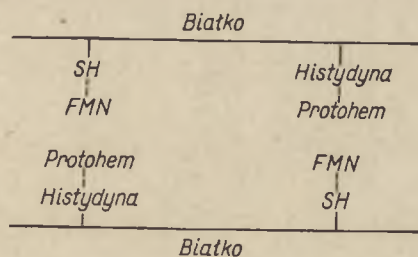
Rys. 2. Widmo absorpcji utlenionej i zredukowanej formy cytochromu b_2 (wg 5)
A — zredukowany cyt. b_2 , B — utleniony cyt. b_2 , C — FMN

Grupę flawinową zidentyfikowano jako FMN metodami fluorometrycznymi i chromatograficznymi po cieplnej lub kwaśnej denaturacji białka (1, 5). Grupa ta łatwo ulega dysocjacji. Dysocjację flawiny powodują niektóre metale, np. miedź, która katalizuje autooksydację enzymu. Procesowi temu zapobiega dodanie EDTA chelatującego metal, lub dodanie substratu, który powoduje redukcję flawiny i w ten sposób obniża jej stałą dysocjacji (29). Czynniki działające na grupy -SH, np. PCMB, PCMS, NEM powodują dysocjację flawiny i związaną z tym fluorescencję cytochromu b_2 (1, 8, 10, 14, 29). Fakt ten świadczy o podstawianiu fosforanu ryboflawiny przez te związki. Inkubacja enzymu w warunkach tlenowych powoduje również pojawienie się fluorescencji i spadek lub całkowity zanik aktywności enzymu (5, 8). Fluorescencji flawin indukowanej przez tlen towarzyszy powstawanie agregatów białka, których obecność została potwierdzona na podstawie analizy sedymentacyjnej.

Dodanie odczynników na grupy -SH zapobiega tworzeniu się agregatów. Na podstawie tych danych Morton i wsp. (10, 29) doszli do wniosku, że flawina związana jest mostkami wodorowymi z grupami -SH białka, przy czym ze strony FMN reaguje grupa iminowa pierścienia izoalloksazyny. W cytochromie b_2 wykazano obecność 18 reszt półcystyny na 1 mol hemu (6), z których cztery do sześciu są łatwo dostępne dla odczynników tiolowych. Dwie z tych grup znajdują się w centrum aktywnym i biorą udział w wiązaniu flawiny (10). Wnioski te potwierdza również obserwacja, że mocznik w stężeniu 0,5—5,0M inaktywuje gwałtownie cytochrom b_2 na skutek rozerwania mostków wodorowych pomiędzy flawiną, a resztami cysteiny (10, 18).

Grupa hemowa cytochromu b_2 jest identyczna z protohemem, który podobnie jak w innych cytochromach jest silnie związany z białkiem i można go oddzielić przez działanie na enzym acetonem zakwaszonym kwasem solnym (29). Widmo zredukowanego cytochromu b_2 (rysunek 2) sugeruje, że pozycje 5 i 6 żelaza hemowego są związane z silnie zasadową grupą (29), którą jest prawdopodobnie azot imidazolowy histydyny.

Boeri i wsp. (15) znaleźli w niekrystalicznym cytochromie b_2 osiem gramoatomów żelaza niehemowego na jeden gramoatom żelaza hemowego, jednakże dializa wobec czynników chelatujących nie powodowała zmniejszenia się aktywności enzymu. Analiza krystalicznego preparatu wykonana przez Mortona i wsp. (5, 29) wykazała, że niehemowe żelazo oraz kobalt, nikiel, miedź i srebro nie występują w cytochromie b_2 . Dodanie siarczuanu żelazawego do krystalicznego preparatu nie stymulowało jego aktywności. Prawdopodobnie zatem znalezione przez Boeri'ego niehemowe żelazo było jedynie zanieczyszczeniem niekrystalicznego preparatu.



Schemat 1. Model centrum aktywnego cytochromu b_2 (wg 9)

Morton i wsp. zaproponowali następujący model centrum aktywnego cytochromu b_2 (Schemat 1). Należy podkreślić, że krystaliczny cytochrom b_2 , w którym badacze ci znaleźli ekwimolowe ilości FMN i protohemu był jednorodny i wykazywał zdolność utleniania mleczanu, oraz, że obecność flawiny i hemu stwierdzono w aktywnych preparatach otrzymanych różnymi metodami.

Badacze japońscy (26, 42, 43) wyizolowali z drożdży krystaliczny hemoproteid, który nie miał zdolności utleniania mleczanu i nie zawierał flawiny i sugerowali, że w drożdżach występują dwa odrębne białka: flawoproteid — dehydrogenaza mleczanowa i hemoproteid, który działa jako specyficzny akceptor elektronów dla flawoproteidu. Prawdopodobnie jednak warunki izolowania enzymu zastosowane przez Yamashita (42) (siedmiodniowa autoliza drożdży w pH 8,5) powodowały dysocjację grupy flawinowej i związaną z tym utratę aktywności, a otrzymany hemoproteid był zmodyfikowaną pochodną cytochromu b_2 .

II. Modyfikacje cytochromu b_2

W pracowni Mortona otrzymano kilka zmodyfikowanych form cytochromu b_2 (31, 32).

Tabela 2

Nomenklatura i własności różnych form cytochromu b_2 (wg 31)

Nazwa	Grupy niebiałkowe	Aktywność L-mleczan: cytochrom c reduktazy	Główne pasma absorpcji $m\mu$
Typ I cytochrom b_2 Flawoproteid + dezoksyrybopolinukleotyd	DNA (5—6%) FMN protohem = 1	Aktywny	α -557 β -528 γ -423,5 UV. 265
Typ II cytochrom b_2 Flawohemoproteid	FMN protohem = 1	Aktywny	α -557 β -528 γ -423,5 UV. 269,5
Typ III hemoproteid 550	DNA żelazoporfiryna c	Nieaktywny	α -550 β -521 γ -415 UV. 257
Typ IV hemoproteid 557	protohem	Nieaktywny	α -557 β -528 γ -423,5 UV. 276
Typ V flawoproteid	DNA FMN	Nieaktywny	Utleniony 445,375
Typ VI apoenzym	DNA	Nieaktywny	UV. 266 UV 260

Naturalną formą enzymu jest cytochrom b_2 (typ I) zawierający DNA oraz dwie grupy protohemowe i dwie grupy flawinowe związane z jedną częścią białka (9, 10, 31).

Morton i Shepley (30) otrzymali krystaliczną formę cytochromu b_2 pozbawioną DNA, ale zawierającą ekwimolarne ilości FMN i protohemu (typ II). Otrzymywano ją przez trzykrotną krystalizację typu I i 15—25-godzinną dializę wobec siarczanu amonu (0,5 i 0,7 nasycenia, pH 8,0). Supernatant po dializie zawierał DNA, a wytrącone białko pozbawione było tego składnika. Białko ponownie dializowano wobec roztworu mleczan-EDTA — siarczan magnezu w pH 6,8. Po około 24 dniach pojawiały się heksagonalne kryształy typu II cytochromu b_2 , które różniły się znacznie od krystalicznego typu I (rysunek 3; porównaj z rysunkiem 1).

Usunięcie DNA nie zmieniało aktywności specyficznych enzymu z różnymi akceptorami elektronów, a w niewielkim tylko stopniu obniżało stałą sedymentacji i przesuwало maksimum absorpcji w ultrafiolecie.

Hemoproteid 550 (typ III) jest enzymatycznie nieaktywną formą cytochromu b_2 nie zawierającą FMN (31). Otrzymano ją w postaci nieregularnych, krystalicznych płytek. Hemoproteid 550 zawiera jedną grupę hemową na cząsteczkę białka, jego ciężar cząsteczkowy jest prawdopodobnie mniejszy niż cytochromu b_2 , a podczas elektroforezy podobnie jak natywny enzym wędruje jako pojedynczy składnik. Widmo absorpcji zredukowanej i utlenionej formy hemoproteidu 550 jest podobne do widma cytochromu c z mięśnia serca końskiego i drożdży, a niewielka różnica w ultrafiolecie spowodowana jest obecnością DNA. Hemoproteid 550 podobnie jak cytochrom c jest redukowany przez oksydoreduktazy cytochromu c i utleniany przez oksydazy cytochromu c .

Hemoproteid 557 (typ IV) otrzymany z natywnego cytochromu b_2 przez usunięcie FMN i wytrącenie białka siarczanem amonu w pH 3,2 krystalizował wolno w postaci prostokątnych płytek. Analiza sedymentacyjna wykazała jednorodność białka. Położenie maksimum absorpcji wskazuje, że grupą prostetyczną, podobnie jak w cytochromie b_2 , jest protohem. Strata aktywności tej formy cytochromu b_2 jest proporcjonalna do ilości usuniętego FMN-u. Inkubacja z fosforanem ryboflawiny powoduje przywrócenie aktywności (31).

Otrzymanie flawoproteidu (typ V) przez selektywne usunięcie grupy hemowej z cytochromu b_2 następczało duże trudności ze względu na labilność flawiny. Morton (31) zastosował z powodzeniem metodę opartą na rozpuszczaniu cytochromu b_2 w 0,1M KCN i działaniu acetonem w $-5^{\circ}C$. Aktywności nieczynnego enzymatycznie flawoproteidu nie udało się przywrócić przez inkubację w $0^{\circ}C$ z protohemem. Flawoproteid był nietrwały i łatwo ulegał denaturacji z jednoczesną dysocjacją grupy flawinowej.

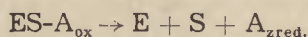
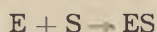
Równoczesne odłączenie grupy flawinowej i hemowej uzyskał Morton (31) działając na typ I cytochromu b_2 zakwaszonym acetonem w temperaturze -40 do $-50^{\circ}C$. Bezbarwny apoenzym (typ VI) miał maksimum absorpcji przy 260 m μ . Inkubacja z protohemem i fosforanem ryboflawiny przywracała aktywność enzymatyczną.

IV. Mechanizm utleniania mleczanu

Cytochrom b_2 katalizuje reakcję utleniania kwasu mlekowego do kwasu pirogronowego w obecności odpowiednich akceptorów elektronów: żelazicyjanku, cytochromu c , błękitu metylenowego, 2,6-dwuchlorofenolo-indofenolu, 2-naftochinono-4-siarczanu oraz tlenu (1, 5, 13, 15, 29).

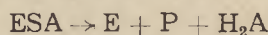
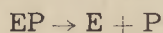
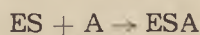
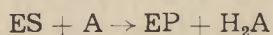
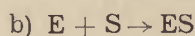
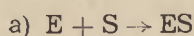
Z prac Alberty i Chance'a (1, 20) wynika, że utlenienie katalizowane przez enzymy flawinowe może przebiegać trzema różnymi drogami:

1. Utlenienie podwójnego kompleksu:



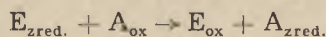
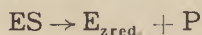
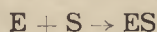
(E — enzym, P — produkt, S — substrat, A_{ox} , A_{zred} — formy utleniona i zredukowana akceptora).

2. Powstanie kilku podwójnych (a) lub potrójnych (b) kompleksów:



(A , H_2A — formy utleniona i zredukowana akceptora).

3. Utworzenie pośrednich zredukowanych form enzymu:



Z pierwszych badań kinetycznych Mortona i wsp. (29) wynikało, że mechanizm utleniania mleczanu przez cytochrom b_2 zmienia się w zależności od akceptora elektronów. W przypadku żelazicyjanku jako akceptora reakcja miała przebiegać z utworzeniem potrójnego kompleksu (według drogi 2b) i żelazicyjanek byłby redukowany tylko przez flawinę. Jednak późniejsze badania Mortona i Sturtevant'a (33) wskazują, że podczas redukcji żelazicyjanku podobnie jak cytochromu c powstają pośrednie zredukowane formy enzymu (według drogi 3) i kompleks flawina-mleczan jest utleniany przez protohem, który oddaje elektrony na żelazicyjanek lub cytochrom c . Badania reakcji z 2,6-dwuchlorofenolo-indofenolem i innymi akceptorami również sugerują mechanizm zachodzący według drogi 3 (29). Bezpośredni udział flawiny jako pierwszego akceptora elektronów z mleczanu stwierdzili Hasegawa i Ogura (23). Po kilkugodzinnej inkubacji cytochromu b_2 z ryboflawiną i następnym wytrąceniu białka siarczanem amonu, enzym nie ulegał redukcji przez mleczan, a jedynie przez dwutlenian, co wykluczało udział protohemu jako bezpośredniego biorcy elektronów z substratu. Chance

niny. Ze strony substratu reagują grupy H i OH w pozycji α i grupa karboksylowa (schemat 2).

Cytochrom b_2 jest jedynym znanym obecnie enzymem posiadającym dwie grupy prostetyczne, biorące prawdopodobnie równorzędny udział w utlenianiu mleczanu. Obydwie te grupy znajdują się obok siebie w szeregu komórkowych przenośników elektronów.

Fizjologiczna rola cytochromu b_2 w drożdżach nie jest znana. W literaturze brak jest dotychczas danych dotyczących mechanizmu powstawania kwasu L-mlekowego w drożdżach (37). Badania nad funkcją cytochromu b_2 należałoby zatem, być może, skierować na poszukiwanie dróg metabolicznych prowadzących do powstawania kwasu L-mlekowego w komórkach drożdży.

LITERATURA

1. Alberty R. A., *Advan. Enzymol.* **17**, 1 (1956).
2. Appleby C. A., Morton R. K., *Nature* **173**, 749 (1954).
3. Appleby C. A., Morton R. K., *Nature* **174**, 201 (1954).
4. Appleby C. A., Morton R. K., *Biochem. J.* **71**, 492 (1959).
5. Appleby C. A., Morton R. K., *Biochem. J.* **73**, 539 (1959).
6. Appleby C. A., Morton R. K., Simonds D. H., *Biochem. J.* **75**, 72 (1960).
7. Appleby C. A., Morton R. K., *Biochem. J.* **75**, 258 (1960).
8. Armstrong J. McD., Coates J. H., Morton R. K., *Nature* **186**, 1033 (1960).
9. Armstrong J. McD., Coates J. H., Morton R. K., *Biochem. J.* **86**, 136 (1963).
10. Armstrong J. McD., Coates J. H., Morton R. K., *Biochem. J.* **88**, 266 (1963).
11. Bach S. J., Dixon M., Keilin D., *Nature* **149**, 21 (1942).
12. Bach S. J., Dixon M., Zerfas L. G., *Nature* **149**, 48 (1942).
13. Bach S. J., Dixon M., Zerfas L. G., *Biochem. J.* **40**, 229 (1946).
14. Boeri E., Cutulo E., Luzzati M., Tosi L., *Arch. Biochem. Biophys.* **56**, 487 (1955).
15. Boeri E., Tosi L., *Arch. Biochem. Biophys.* **60**, 463 (1956).
16. Boeri E., Rippa M., w *Haematin Enzymes* wyd. Falk J. E., Lemberg R., Morton R. K. vol. II, str. 524, Pergamon Press, Oxford 1961.
17. Boeri E., Cutulo E., w *Haematin Enzymes* wyd. Falk J. E., Lemberg R., Morton R. K., vol. II, str. 568, Pergamon Press, Oxford 1961.
18. Boeri E., Rippa M., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 336 (1960).
19. Chance B., Kingenber M., Boeri E., *Fed. Proc.* **15**, 231 (1956).
20. Chance B., w *Techniques of Organic Chemistry* wyd. Friers S. L., vol. 8, str. 627, Interscience Publishers Inc, New York (1953).
21. Dickstein S., *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 397 (1959).
22. Dixon M., Zerfas L. G., *Naturwissenschaften* **143**, 557 (1939).
23. Hasegawa H., Ogura Y., w *Haematin Enzymes* wyd. Falk J. E., Lemberg R., Morton R. K., vol. II, str. 534, Pergamon Press, Oxford 1961.
24. Hasegawa H., *J. Biochem.* **52**, 5 (1962).
25. Hasegawa H., *J. Biochem.* **52**, 207 (1962).

26. Horio T., Yamashita J., Yamanaka T., Nozaki M., Okunuki K., w Haematin Enzymes wyd. Falk J. E., Lemberg R., Morton R. K., vol. II, str. 552, Pergamon Press, Oxford 1961.
27. Montague M. D., Morton R. K., *Nature* **187**, 916 (1961).
28. Morton R. K., *Nature* **166**, 1092 (1950).
29. Morton R. K., w Haematin Enzymes wyd. Falk J. E., Lemberg R., Morton R. K., vol. II, str. 501, Pergamon Press, Oxford 1961.
30. Morton R. K., Shepley K., *Nature* **192**, 639 (1963).
31. Morton R. K., *Nature* **192**, 727 (1963).
32. Morton R. K., Shepley K., *Biochem. J.* **89**, 257 (1963).
33. Morton R. K., Sturtewant J. M., *J. Biol. Chem.* **239**, 1614 (1964).
34. Nygaard A. P., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 450 (1956).
35. Nygaard A. P., *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 517 (1959).
36. Nygaard A. P., w Haematin Enzymes wyd. Falk J. E., Lemberg R., Morton R. K., vol. II, str. 554, Pergamon Press, Oxford 1961.
37. Nygaard A. P., D and L-lactic cytochrome c reductases and some related enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*, Norwegian Universities Press str. 15, 1962.
38. Rippa M., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 333 (1961).
39. Symons H., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 298 (1965).
40. Szumiel I., *Post. Biochem.* **7**, 29 (1961).
41. Yamanaka T., Horio T., Okunuki K., *J. Biochem.* **45**, 291 (1958).
42. Yamashita J., Higashi T., Yamanaka T., Nozaki M., Matsubara H., Horio T., Okunuki K., *Nature* **179**, 959 (1957).
43. Yamashita J., Horio T., Okunuki K., *J. Biochem.* **45**, 707 (1958).

ZBIGNIEW PRASAŁ *

Ceruloplazmina

Ceruloplasmin

The isolation, determination, physico-chemical properties and enzymatic activity of ceruloplasmin are reviewed.

Ze wszystkich pierwiastków występujących w żywych organizmach w ilościach śladowych miedź wykazuje największe powinowactwo do białek, a miedzioproteidy wykryto u bakterii, roślin i w różnych tkankach zwierząt. Większość miedzioproteidów posiada własności enzymatyczne. Duże zainteresowanie w tej grupie związków budzi ceruloplazmina, miedzioproteid zwierzęcy o funkcji oksydazy. Jest ona główną oksydazą osocza krwi (101, 125), kontroluje układ hematopoezy (115), jest nośnikiem transportującym miedź i usuwającym szkodliwy jej nadmiar z krwi do żółci (44, 63) oraz pełni funkcje regulatora wchłaniania miedzi z przewodu pokarmowego (110, 123). W chorobie Wilsona (126) i w schizofrenii (146) poziom ceruloplazminy jest obniżony, a są sugestie, że podwyższenie poziomu ceruloplazminy może się okazać skutecznym lekiem (8, 47). O roli ceruloplazminy w zagadnieniach klinicznych pisali Wald, Murawski i Schajbel (123). Własności fizyko-chemiczne i enzymatyczne ceruloplazminy nie zostały jeszcze dokładnie zbadane. Nie znamy jej struktury pierwotnej i wtórnej ani budowy jej centrów aktywnych. Nie wiadomo też, czy występowanie ceruloplazminy w krwi ssaków jest cechą swoistą i czy heterogenność tego białka jest uwarunkowana genetycznie. Niepełne, a niekiedy dyskusyjne wiadomości o ceruloplazminie skłaniają do rozpatrywania jej własności na tle innych miedzioproteidów. Dane o występowaniu i budowie miedzioproteidów naturalnych zebrano w tabelicy 1.

Na szczególną uwagę zasługują miedzioproteidy o funkcji enzymatycznej.

Tyrozynaza (oksydaza katecholowa, EC — 1.10.3.1) działa jako dehydrogenaza i hydroksylaza, ponieważ katalizuje utlenianie o-dwufenoli i wprowadzenie grupy hydroksylowej do monofenoli (82). Pierwotnie

* Dr adiunkt Katedry Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie.

Wykaz stosowanych skrótów: ESR — elektronowy rezonans spinowy, PPD — p-fenylenodwuamina, DIECA — dwuetylodwutiokarbaminian.

Tablica 1

Własności miedzioproteidów

Nazwa	Występowanie	m. cząst. $\times 10^3$	% miedzi	ilość Cu w cząsteczce	Piśmiennictwo
Hemocjanina	homary	780	0,16	20	38, 41
	ślimaki	6700	0,19	200	64
Cerebrokupyreina	mózg	35	0,30	2	100
Erytrokupyreina	erytrocyty	33	0,32—0,36	2	63, 80
Hepatokupyreina	wątroba wołu	30—40	0,30—0,40	2	78
Hemokupyreina	erytrocyty, wątroba	30	0,35	2	78
Azurina	bakterie <i>Bordetella</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>			1	17, 77
Niebieskie białko	fasola (<i>Phaseolus aureus</i>)	23	0,28		114
Niebieskie białko	drzewo żywiczne (<i>Rhus verni- cifera</i>)	25	0,33	1	41
Plastocjanina	chloroplasty				58
Tyrozynaza	ziemniaki, grzyby, czerniaki, poczwarki motyla <i>Ce- lerio euphorbiae</i>	130	0,20	4	29, 60, 61 65, 74
Lakaza	sumak garbarski, grzyby	120	0,22	4	87, 88, 89
Oksydaza kw. L-askorbinowego	moszcz	150	0,25	6	99
Oksydaza cytochromowa	serce, wątroba	530		3 atomy na mol cytoheminy	56
Oksydaza monoaminowa	mitochondria wątroby, osocze krwi, rośliny	247		4	120, 72
Oksydaza galaktozowa	pleśń <i>Polipo- rus circinatus</i>	75		1	39
Urykaza	wątroba	120	0,007	1	75
Transsulfuraza β -merkaptopiro- gronianu		35—40		1	36, 37
β -hydroksylaza 3, 4-dwuhydro- ksyfenyloetylo- aminy				4—7	68
Ceruloplazmina	surowica ludzka i zwierzęca	151—162	0,32 0,34	8	51

przypuszczano, że tyrozynaza zawiera tylko miedź dwuwartościową, jednak Kertesz wykazał metodą dwuchinilową także obecność miedzi jednowartościowej (62). Rodzima forma tyrozynazy zawiera według Flinga i wsp. (40) jedynie miedź jednowartościową. Zmienne ilości Cu^{2+} znajdowane metodą elektronowego rezonansu spinowego (ESR) w niektórych preparatach przypisano częściowej denaturacji enzymu (13).

Lakaza (oksydaza p-dwufenolowa, EC — 1.10.3.2) katalizuje przenoszenie czterech elektronów z p-dwufenoli i p-dwuamin na tlen cząsteczkowy. Badania spektrofotometryczne (76) i pomiary ESR (17) wykazały, że w czasie reakcji miedź enzymu zmienia wartościowość podobnie jak w ceruloplazminie.

Oksydaza kwasu L-askorbinowego (EC — 1.10.3.3) znana jest od 1930 roku (119). W czasie działania enzymu odbywa się wymiana jego miedzi z jonem miedziowym środowiska (73). Zjawisko to tłumaczono zmianą wartościowości miedzi enzymu, gdyż Cu^+ winna wymieniać się łatwiej niż Cu^{2+} (96). Okazało się jednak, że nawet w nieobecności substratu enzym zawiera nie tylko miedź dwuwartościową, lecz także jednowartościową, a stosunek Cu^+ do Cu^{2+} wynosi 1:1, a nie 1:3, jak sugerowały wyniki uzyskane metodą dwuchinilową (99). Obecność miedzi jednowartościowej w oksydazie kwasu askorbinowego powoduje tworzenie się H_2O_2 , która inaktywuje enzym, nie warunkuje natomiast jego niebieskiej barwy ani też aktywności (99).

Oksydaza cytochromowa (EC — 1.9.3.1) katalizująca utlenienie zredukowanego cytochromu c składa się z cytochromów a i a_3 w stosunku molowym 1:1 (67). Jako grupy prostetyczne zawiera ona 5 moli cytoheminy (56). Miedź dwuwartościowa tego enzymu przypuszczalnie ulega redukcji przez cytochrom c i ponownej oksydacji przez tlen cząsteczkowy (87). Redukcja Cu^{2+} jest tak szybka, że nie można jej stwierdzić sposobem Bray'a opartym na pomiarze ESR (14). Ostatnio dyskutuje się możliwość wzajemnego oddziaływania pary: $\text{Cu}^+ - \text{Cu}^{2+}$ w enzymie (5).

Oksydaza monoaminowa (EC — 1.4.3.4) znana jest od 1928 roku (45). Enzym jest mało swoisty, dość trwały w niskiej temperaturze, lecz wrażliwy na ciepło (28). Różowy enzym roślinny traci aktywność pod wpływem 2,2'-dwupirydyli i 1,10-fenantroliny (79). Serotonina nie jest substratem dla oksydazy monoaminowej. Dwudodatnia wartościowość miedzi enzymu nie zmienia się podczas utleniania monoamin alifatycznych pierwszo-, drugo i trzeciorzędowych (127).

Oksydaza galaktozowa (EC — 1.1.3.9) katalizuje utlenienie D-galaktozy przy szóstym atomie węgla z utworzeniem dwualdozy.

Urykaza (EC — 1.7.3.3) katalizuje rozkład kwasu moczowego.

Transsulfuraza β -merkaptopirogronianowa (EC — 2.8.1.2) katalizuje odłączenie siarki z substratu (HS-CH=COH-COOH) i jej przeniesienie na SO_3^{2-} z utworzeniem $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, jak również na CN^- z utworzeniem SCN^- (37).

β -hydroksylaza 3,4-dwuhydroksyfenyloetyloaminy (EC — 1.14.2.1) przekształca substrat w noradrenalinę (68). Enzym ten jest drugą obok tyronazy hydroksylazą ssaków otrzymaną w formie jednorodnej i zawierającą miedź. Mimo zawartości Cu^+ i Cu^{2+} enzym jest bezbarwny. Podczas działania enzymu Cu^{2+} podlega cyklicznej redukcji i oksydacji, podobnie jak w ceruloplazminie.

Ceruloplazmina jest α_2 -miedzioglobuliną o własnościach oksydazowych. Holmberg i Laurell w 1948 roku wykryli ją w surowicy ludzkiej i wieprza (51). Zawartość ceruloplazminy w surowicy ludzkiej waha się w granicach 15—30mg⁰%, a w innych płynach i narządach jest nieznaczna (123). W surowicy ludzkiej wykrywa się ją w immunoelektroforezie we frakcji α_2 -globulinowej IV (49).

I. Otrzymywanie i oznaczanie ceruloplazminy

Ceruloplazminę otrzymywano z surowicy wieprza (51, 97), z surowicy ciężarnych (51), z frakcji IV Cohna (33, 86, 108, 118), z surowicy pozałożyskowej (16), frakcji G₂ (27) i frakcji resztkowej B osocza ludzkiego (107). Białko towarzyszące usuwano za pomocą frakcjonowania siarczanem amonu (33, 51, 93, 97) i zimnym etanolem (51, 93, 104, 107, 117), a także denaturacji cieplnej (93) lub mieszaniną chloroformu i 90% etanolu (1:9) (51, 83, 97), mieszaniną eteru i 90% etanolu (1:9) (107) oraz rywanolem (117). Stosowano też niskonapięciową (93) i wysokonapięciową (109) elektroforezę kolumnową oraz chromatografię kolumnową na DEAE-celulozie (27, 33, 83, 107, 118), na hydroksyloapatycie (16, 33, 107), DEAE-Sephadex (16) i Sephadex G-100 (16) z elucją według liniowego gradientu soli (35, 66). Do sterylizacji frakcji używano β -propionolaktonu (118).

Najstarsza metoda Holmberga i Laurella (51) nie pozwalała uzyskać jednorodnej ceruloplazminy z łatwo dostępnego materiału wyjściowego jakim jest krew wieprza. Metodę tę modyfikowano w celu uzyskania jednorodnego produktu, zmieniając kolejność etapów (93), zastępując etanolem — chloroformowe wytrącanie białek towarzyszących chromatografią na DEAE-celulozie (97, 107) lub wprowadzając wysokonapięciową elektroforezę kolumnową na nośniku celulozowym w aparacie LKB 3340 zamiast izoelektrycznego strącania białek i ich frakcjonowania chloroformem i etanolem (104).

Jako źródło ceruloplazminy wykorzystywano też wzbogacone w α_2 -globuliny frakcje odpadowe przy produkcji γ -globulin i albumin (16, 33, 85, 108, 118).

Krystaliczną ceruloplazminę z frakcji IV-1 Cohna otrzymali Deutsch i wsp. (33). Richterich i wsp. (107) wyizolowali izoenzymy C-C i C-D ceruloplazminy z frakcji resztkowej B osocza ludzkiego,

otrzymywanej według Nitschmana i wsp. (90). Różnice własności izoenzymów podano w tablicy 2.

Rynek krajowy nie rozporządza własnymi preparatami ceruloplazminy. Handlowa amerykańska ceruloplazmina RC zawiera w 1ml 10,95mg białka i 22 μ g miedzi (czystość 60%), ceruloplazmina M z firmy Merck zawiera w 1ml 11,94mg białka i 32 μ g miedzi (czystość 80%).

Tablica 2

Własności fizykochemiczne izoenzymów
ceruloplazminy (wg 107)

	Izoenzymy ceruloplazminy	
	C-C	C-D
Masa cząsteczkowa	148 000	125 000
Ilość atomów Cu/mol	8	6
Cu/N, %	2,10	1,80
Cu/białko, %	0,34	0,32
heksoza/białko, %	7	3,2
E _{280 mμ} 1%, 1 cm	17,6	15,7
E _{605 mμ} 1%, 1 cm	0,56	0,54
K _m PPD	5,9 · 10 ⁻⁴	4,2 · 10 ⁻⁴

Do oznaczania ceruloplazminy stosuje się: pomiar spektrofotometryczny przy 610m μ jej błękitnego zabarwienia (31, 111), oznaczanie zawartości miedzi (83, 94) lub pomiar aktywności enzymatycznej metodą manometryczną (52) lub kolorymetryczną (53, 105).

Widma absorpcyjne niektórych związków chemicznych (salicylan żelazowy (43), fiolet Pontacyl 6R (48) oraz zasada Bandrowskiego (6)) są prawie identyczne z widmem absorpcyjnym produktu utlenienia *p*-fenylenodwuaminy (PPD) przez ceruloplazminę. Rice (106) opracował metodę standaryzacji aktywności ceruloplazminy w jednostkach międzynarodowych za pomocą wzorcowych roztworów zasady Bandrowskiego.

Najczulsze są metody immunochemiczne pozwalające na wykrycie 5–10 μ g ceruloplazminy (8). Oznaczanie polega na precypitacji ceruloplazminy przy użyciu króliczej surowicy antyceruloplazminowej i oznaczeniu ilości białka w precypitacie (109).

II. Własności fizyko-chemiczne preparatów ceruloplazminy

Na podstawie składu aminokwasowego krystalicznej ceruloplazminy (33) obliczono jej masę cząsteczkową na 152 000, z oznaczeń miedzi

i danych sedymentacyjnych na 160 000, różnicę przypisując obecności węglowodanów.

Widmo absorpcyjne rodzimej ceruloplazminy wykazuje dwa maksima: przy $610\text{m}\mu$ i $280\text{m}\mu$. Iloraz wartości absorpcji przy $610\text{m}\mu$ i $280\text{m}\mu$ stanowiący miarę oczyszczenia preparatu waha się dla najlepiej oczyszczonych preparatów od 0,0318 (107) do 0,043 (16, 33).

Zawartość miedzi w preparatach ceruloplazminy wynosi od 0,32 do 0,34%, co w przeliczeniu na masę cząsteczkową 152 000 daje osiem atomów miedzi w cząsteczce. Iloraz Cu:N oscyluje około wartości 0,02.

Szczególnie intensywna w porównaniu do sztucznych miedzioproteidów niebieska barwa ceruloplazminy wzbudziła zainteresowanie wielu autorów (10, 22, 91). Najintensywniejsza jest barwa ($E_{1\%, 1\text{cm}}^{610\text{m}} = 0,68$) rodzimej formy ceruloplazminy. Pierwotnie niebieską barwę przypisywano kompleksowi miedzi ceruloplazminy z tlenem cząsteczkowym (91). Pomiaru jądrowego rezonansu magnetycznego sugerują, że chromoforem jest Cu^{2+} , a różnica intensywności barwy w porównaniu do białek zawierających Cu^{2+} spowodowana jest obecnością w ceruloplazminie przynajmniej jednej sprzężonej pary: $\text{Cu}^{2+} - \text{Cu}^{+}$, w której elektron z Cu^{+} przeskakuje na lukę w orbicie $3d$ atomu Cu^{2+} (10). Niebieska barwa jest trwała w 25° w pH 4,93 — 7,05. Odbarwienie następuje po dodaniu czynnika redukującego lub przy zmianie pH . W pH 7,95 — 9,08 intensywność barwy przy $610\text{m}\mu$ maleje w czasie zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu. W pH 3,59 — 4,27 szczyt przy $610\text{m}\mu$ zanika, a równocześnie pojawia się przejściowo w widmie absorpcyjnym nowy szczyt przy $435\text{m}\mu$ (22, 23). Odwracalne pojawianie się i zanikanie szczytu przy $610\text{m}\mu$ zachodzi zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych, co wskazuje, że odbarwienie nie jest spowodowane dysocjacją kompleksu miedzi ceruloplazminy z tlenem cząsteczkowym (25). Odwracalnie odbarwiona ceruloplazmina denaturuje się z tą samą szybkością jak rodzima ceruloplazmina, co wskazuje, że atomy miedzi są jeszcze silnie związane z białkiem (25). EDTA 0,1M i stężone roztwory mocznika powodują spadek wartości absorpcji przy $610\text{m}\mu$, proporcjonalny do utraty miedzi w ceruloplazminie (81).

Izotop miedzi ^{64}Cu wprowadzony do ustroju wiąże się początkowo z albuminą surowicy, a potem przenosi się do frakcji globulinowej i włącza się w nowo syntetyzowaną cząsteczkę ceruloplazminy (7). Sposób powiązania miedzi z albuminą surowicy jest odmienny niż z ceruloplazminą (39). Kompleks Cu — albumina reaguje bezpośrednio z dwuetylodwutiokarbaminianem i traci podczas dializy jony miedzi. Natomiast ceruloplazmina nie reaguje bezpośrednio z tym odczynnikiem i nie odszczepia jonów miedzi podczas dializy przy pH około 7 (104). Z ośmiu atomów miedzi w ceruloplazminie tylko cztery mogą się wymieniać w obecności askorbinianu z izotopem miedzi ^{64}Cu (110). Dłuższe trawienie chymotrypsyną ceruloplazminy ludzkiej (19) i zwierzęcej (104) powoduje, że połowa

ilości atomów miedzi dializuje. Badania jądrowego rezonansu magnetycznego i ESR dowiodły, że połowa atomów miedzi w ceruloplazminie istnieje jako Cu^{2+} , a połowa jako Cu^{+} , zaś redukcji jonów miedzi towarzyszy zmiana kształtu cząsteczki ceruloplazminy (10). Obserwacje te wskazują, że z ośmiu atomów miedzi cztery są labilnie związane z białkiem, a pozostałe są umieszczone w głębi cząsteczki i usztywnione przez elementy wtórnej struktury białka. Atomy miedzi utrwalają trzeciorzędową strukturę ceruloplazminy. Znaczne osłabienie wiązania miedzi z białkiem ułatwia denaturację enzymu (25).

Osiem atomów miedzi można usunąć odwracalnie z cząsteczki ceruloplazminy za pomocą dwuetylodwutiokarbaminianu (DIECA) w obecności askorbinianu (85) lub cysteiny (84). Reakcja z DIECA przebiega powoli, można ją zahamować podwyższając pH z 5,0 do 6,0, a ilość wytworzonego kompleksu miedzi z DIECA można mierzyć spektrofotometrycznie (1). Odtworzenie ceruloplazminy w maksymalnym stopniu następuje po dodaniu $68\mu\text{g Cu}^{2+}$ i $200\mu\text{g}$ kwasu askorbinowego do 2ml 1% roztworu apoceruloplazminy w 0,2M buforze octanowym o pH 5,4. Przy użyciu mniejszych ilości miedzi intensywność odtworzonej niebieskiej barwy jest w przybliżeniu proporcjonalna do ilości dodanej miedzi. Własności odtworzonej w ten sposób ceruloplazminy odpowiadają własnościom formy rodzimej (1). Po usunięciu za pomocą DIECA około połowy atomów miedzi i poddaniu preparatu swobodnej elektroforezie, obserwuje się dwa wierzchołki odpowiadające dwu frakcjom białkowym. Dodanie rodzimej ceruloplazminy do mieszaniny zawierającej apoceruloplazminę i jony miedzi nie wpływa na jakościowy obraz elektroforetyczny. Nie zaobserwowano dotychczas trwałych form ceruloplazminy zawierających więcej niż zero, a mniej niż osiem atomów Cu w cząsteczce, ani podczas odszczepiania miedzi ani w czasie odtwarzania ceruloplazminy. Przypuszcza się (1), że pierwszy uwalniający się, albo wiążący jon miedzi wpływa na konformację cząsteczki białka co ułatwia odszczepianie lub przyłączanie następnych jonów Cu.

Frieden i Walter (41, 125) badając kinetykę reakcji oraz wpływ CN^{-} i EDTA wysunęli koncepcję dwóch centrów katalitycznych w ceruloplazminie. Jedno z nich miałoby być odpowiedzialne za utlenienie *p*-fenylenodwuaminy (PPD) i askorbinianu, a drugie — wyłącznie za utlenienie PPD. Budowa centrów aktywnych w ceruloplazminie nie jest znana. Grupy sulfhydrylowe nie biorą zapewne udziału w wiązaniu miedzi, gdyż zarówno ceruloplazmina jak i apoceruloplazmina zawierają jedną tylko grupę sulfhydrylową (57). Miareczkowanie acydymetryczne wskazuje natomiast na udział reszt histydyny, lizyny lub tyrozyny w kształtowaniu centrów (57).

Zarówno ceruloplazmina ludzka (57) jak i zwierzęca (104) zawierają 18 aminokwasów. N — końcowymi aminokwasami są: walina (0,9 reszty) i lizyna (0,3 reszty) (57). Zawartość poszczególnych aminokwasów w kry-

stalicznej ceruloplazminie ludzkiej oznaczono w analizatorze aminokwasowym (116).

Tablica 3

Skład aminokwasowy ceruloplazminy
ludzkiej (wg 57)

Aminokwasy	Ilość reszt/gramocząsteczka
Asp	135
Tre*	86
Ser*	69
Glu	130
Pro	57
Gli	85
Ala	56
CySH	1,0
Wal	67
Met	26
Ileu	56
Leu	79
Tyr*	71
Fen	54
Liz	63
His	43
Arg	46
Try	27

* Uwzględniając częściowe straty podczas 20 godzinnej hydrolizy w 6N HCL w temp. 110°C wprowadzono poprawki dla: Tre — 6%, Ser — 10%, Tyr — 5%.

Ceruloplazmina rozpuszczona w 6M lub 8M roztworze mocznika traci barwę i w elektroforezie na żelu skrobiowym daje jedną szybko i trzy wolniej wędrujące frakcje (103). Po zredukowaniu i zalkilowaniu ceruloplazminy ilość frakcji maleje do dwóch kosztem wolno wędrujących, natomiast apoceruloplazmina wykazuje w tych warunkach sześć wyraźnych frakcji. Obserwacje te dowodzą obecności kilku różnych podjednostek (57). Potraktowanie ceruloplazminy merkaptetanolem w stężeniu 0,01 — 1,0M nie powoduje powstania pasm w elektroforezie żelowej. Nie wydaje się ażeby działanie mocznikiem i następnie dializa, jak również redukcja i alkiłowanie ceruloplazminy powodowały znaczne zmniejszenie zawartości miedzi (103). Metodą sedymentacji określono masy cząsteczkowe podjednostek ceruloplazminy w przybliżeniu na 5000 (57). Rozszczepienie cząsteczki ceruloplazminy w obecności mocznika na kilka podjednostek potwierdzono drogą ultrawirowania oraz wykazując obecność przynajmniej dwu immunologicznie czynnych składników (102, 103). Również krystaliczna ceruloplazmina okazała się kompleksem antygenowym (57).

Obecność komponenty węglowodanowej w cząsteczce ceruloplazminy potwierdziło wielu autorów (55, 59, 107, 112). Na 1 mol ceruloplazminy przypada: 9 moli kwasu sialowego, 18 moli *N*-acetyloglukozoaminy, 2 mole fukozy i 36 moli heksoz, przy czym stosunek mannozy do galaktozy jest bliski 3:2. Frakcjonowanie na wypełniaczu *Sephadex* G-25 ceruloplazminy trawionej proteazą doprowadziło do wyodrębnienia frakcji glikopeptydowej złożonej w 65% z węglowodanów, kwasu asparaginowego i kwasu glutaminowego. Frakcję tę rozdzielono na DEAE-celulozie przy niskim *pH* i sile jonowej na kilka podfrakcji, w których występowały dwie lub trzy reszty aminokwasów, najczęściej kwasów asparaginowego i glutaminowego oraz treoniny, proliny i glicyny. Dla większości tych frakcji stosunek kwasu asparaginowego do sialowego był bliski jedności, a treoniny do kwasu sialowego wynosił 1:3.

Zagadnieniem występowania ceruloplazminy w wielorakich formach (izoenzymy) zainteresowano się, kiedy Broman (15) frakcjonując ten enzym na kolumnie wypełnionej hydroksyloapatytem otrzymał dwie frakcje o aktywności oksydazowej. Morell i Scheinberg (86) frakcjonując na kolumnach z hydroksyloapatytem i DEAE-celulozą ceruloplazminę (z frakcji IV-1 Cohna surowic od 9109 dawców) wykazali elektroforetycznie obecność co najmniej czterech „ceruloplazmin”. Oznaczyli oni frakcję homogeną literą C, a frakcję mikroheterogeną literą D i dla odróżnienia od transferyny wprowadzili skróty C-C (ceruloplazmina) i C-D (ceruloplazmina mikroheterogenna). Analiza elektroforetyczna innego preparatu ceruloplazminy o symbolu firmowym DWZ 71 potwierdziła istnienie pięciu wyraźnych frakcji o własnościach ceruloplazminy (2). Tą samą techniką w jednej z czterdziestu trzech surowic ciężarnych kobiet wykryto pasmo ceruloplazminy o anormalnej, zwiększonej migracji. Wyodrębnione z frakcji resztkowej B osocza ludzkiego frakcje C-C i C-D uznano za izoenzymy ceruloplazminy (107). Dalsze ciekawe badania przeprowadzono w oparciu o elektroforezę na żelu skrobiowym, immunoelektroforezę i ultrawiórowanie. Dysponując próbkami ceruloplazminy z różnych źródeł (Francja, USA) stwierdzono w każdym wypadku ich niejednorodność (103). Ostatnio za pomocą chromatografii kolumnowej na hydroksyloapatycie krystalicznej, homogennej ceruloplazminy otrzymano w eluatach frakcje różniące się ruchliwościami elektroforetycznymi, masą cząsteczkową i zawartością miedzi (32).

Badania nad białkami i enzymami surowicy wykazały, że niektóre z nich uznawane pierwotnie za homogenne są w istocie heterogenne. Heterogenność białek (enzymów) może oznaczać istnienie form spolimeryzowanych powstałych z macierzystych cząsteczek i pozostających ze sobą w równowadze (albumina surowicy i haptoglobina II), lub występowanie izoenzymów danego enzymu powstałych w wyniku kontrolowanej genetycznie biosyntezy (dehydrogenaza kwasu mlekowego, fosfataza zasadowa, esteraza cholinowa) (103). W przypadku ceruloplazminy zdania są

podzielone, jedni autorzy sądzą (10), że otrzymane przez nich frakcje są polimerami, inni (86, 107) przypuszczają, że mają do czynienia z izoenzymami, większość zaś (27, 30, 103) przyjmuje, że heterogenność ceruloplazminy wywołana jest polimeryzacją cząsteczek zachodzącą pod wpływem różnych czynników w czasie wyodrębniania, oczyszczania i przechowywania preparatów. Immunoelektroforegramy normalnej ludzkiej surowicy wykazują jedną wyraźną smugę precypitacyjną odpowiadającą ceruloplazminie (49). W niektórych przypadkach (surowice ciężarnych lub próbki przechowywane przez kilka tygodni) daje się zaobserwować dodatkowo słabo dostrzegalną smugę, której znaczenie nie jest dotychczas wyjaśnione.

Analiza przebiegu chromatografii kolumnowej białek na DEAE-celulozie, a szczególnie na hydroksyloapatycie wskazuje na możliwość powstawania artefaktów, które mogą stać się podstawą mylnych wniosków o heterogenności frakcji (12, 50). Wydaje się, że wyodrębnianie „izoenzymów” C-C i C-D za pomocą chromatografii kolumnowej na hydroksyloapatycie, jak również rozdział krystalicznej, homogennej ceruloplazminy na frakcje (32) mogą być traktowane jako artefakty. Założenie, że rozdział białek na hydroksyloapatycie jest wyjątkowo selektywny i dzięki temu udaje się wyizolować izoenzymy ceruloplazminy, trudno pogodzić z faktem, że nie są one wykrywalne w krwi zdrowego człowieka metodą immunoelektroforezy.

III. Własności enzymatyczne ceruloplazminy

Ceruloplazminę zalicza się do lakaz zwierzęcych, których specyficzność jest słabo zdefiniowana. Lakazy, podobnie jak katecholaza i oksydaza kwasu L-askorbinowego katalizują przenoszenie z *o*- lub *p*-dwufenoli czterech elektronów na jedną cząsteczkę tlenu, przy czym powstaje bezpośrednio woda. Ceruloplazmina katalizuje utlenianie dwufenoli i fenoli wielowodorotlenowych, a ponadto również niektórych hydroksyindoli, dwuamin i ich pochodnych metylowych oraz kwasu askorbinowego (9, 95). Niska specyficzność komplikuje klasyfikację ceruloplazminy i z tych względów nie umieszczono jej dotychczas w międzynarodowym wykazie enzymów.

Najlepszym substratem ceruloplazminy jest *p*-fenylenodwuamina (PPD), a optimum działania enzymu przypada na pH 5–6. Wrażliwość substratu na działanie enzymu uwarunkowana jest obecnością w związkach aromatycznych dwóch grup oddających elektrony: wodorotlenowej lub aminowej w położeniu *orto* lub *para*. Związki z tymi grupami w położeniu *meta* są o wiele mniej podatne, podobnie jak związki zawierające w pierścieniu chlor i grupy nitrowe. *N*-alkilopochodne dwuamin aromatycznych jak np. *N,N*-dwumetylo-*p*-fenylenodwuamina trudno

ulegają utlenieniu przy udziale ceruloplazminy, a jeszcze gorszymi substratami są o-alkilopochodne dwufenoli (p-metoksyfenol nie jest w ogóle utleniany).

Niska specyficzność substratowa ceruloplazminy jest powodem kontrowersyjnych poglądów na jej rolę fizjologiczną. Jedni autorzy (95, 125) uważają ceruloplazminę za oksydazę askorbinianową ustroju zwierzęcego, inni zaś (83) kwestionują ten pogląd i własności oksydazy kwasu askorbinowego przypisują jonom miedzi zanieczyszczającym preparaty. W tablicy 4 przedstawiono różnicę między utlenianiem askorbinianu katalizowanym przez ceruloplazminę i jony miedzi. Przemawiają one na korzyść poglądu, że ceruloplazmina jest oksydazą kwasu askorbinowego u zwierząt.

Tablica 4

Dane fizyko-chemiczne reakcji utleniania askorbinianu przez ceruloplazminę i jony miedzi (wg 95)

	Utlenianie askorbinianu katalizowane przez	
	ceruloplazminę	jony Cu(II)
K_m (μM)	13	7000
Stała szybkości I rzędu (minuty/ μM Cu)	0,053	0,023
Rząd reakcji przy 100 μM askorbinianu	zerowy	pierwszy
Optimum pH	6,0	7,5
Tworzenie H_2O_2	nie tworzy się	stechiometrycznie $\text{H}_2\text{O}_2 : \text{askorbinian} = 1$
Hamowanie (%) przez: 10 μM cytrynian 16 μM neokupreinę	94 0	3 100

Z pomiarów ESR wynika, że kwas askorbinowy redukuje Cu^{2+} do Cu^+ , a tlen odtwarza Cu^{2+} w ceruloplazminie (17), co wskazywałoby, że ma ona przynajmniej niską aktywność oksydazy kwasu askorbinowego.

Na aktywność ceruloplazminy działają hamująco: aniony jedno i wielowartościowe (cyjanki, azydki, cyjaniany, cytryniany, dwuetylodwuotio-karbaminian, kwas etylenodwuaminocztworooctowy (EDTA), jony metali amfoterycznych (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+}) w stężeniach powyżej 10^{-2}M oraz promieniowanie ultrafioletowe (4, 94). Jony chlorkowe oraz jony Fe^{2+} w niskich stężeniach są aktywatorami ceruloplazminy (52, 124).

Kwas cytrynowy hamuje kompetycyjnie działanie ceruloplazminy na kwas askorbinowy, p-fenylenodwuaminę i N,N-dwumetylo-p-fenyleneo-

dwuaminy (94, 104). Znaczne stężenie cytrynianu w surowicy ludzkiej (1,4—3,2mg/100 ml) utrzymuje aktywność oksydazy askorbinianowej ceruloplazminy na niskim poziomie, co umożliwia zaoszczędzenie zredukowanej formy kwasu askorbinowego (94). Metody bezpośredniego pomiaru aktywności oksydazowej ceruloplazminy w surowicy (48, 53, 105, 111) są obciążone błędem wynikającym z wpływu cytrynianu.

Hamujący wpływ azydków zależy od temperatury: 50% zahamowanie ceruloplazminy w 25° wymaga ich obecności w stężeniu $3 \cdot 10^{-6}M$, a w 7,5° — w stężeniu $4,6 \cdot 10^{-6}M$ (24).

Aktywność oksydazowa ceruloplazminy jest hamowana przez związki chelatowe (17, 21, 70). EDTA hamuje aktywność ceruloplazminy w 50% przy stężeniu $10^{-6}M$. Hamowanie przez EDTA wzrasta ze spadkiem pH, a można je cofnąć zwiększając stężenia jonów metali amfoterycznych do $10^{-5}M$ (98). Aktywność ceruloplazminy praktycznie nie zmienia się pod wpływem chlorków w stężeniu $10^{-2}M$, jednak przy stężeniu 1M następuje całkowite zahamowanie. Podobnie jak EDTA, NaCl hamuje skutecznie przy niższych pH. Wpływ KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, CsCl, LiCl jest podobny do NaCl, natomiast $AlCl_3$ już w stężeniu $3 \cdot 10^{-5}M$ hamuje w 50% aktywność ceruloplazminy (98).

Holmberg i Laurell (52) oraz Curzon (20) próbowali wyjaśnić hamujący wpływ anionów na czynność oksydazową ceruloplazminy. W 0,5M NaCl i w około 0° ceruloplazmina zmienia swoją barwę z niebieskiej na zieloną i wykazuje zmiany w widmie elektronowym (11). Jeśli do układu ceruloplazminy dodawać anionów azydkowych, rodanekowych, cyjanianowych lub cyjankowych, to znika charakterystyczny szczyt przy 610mμ. Efekt ten występuje intensywniej przy pH 5,7 niż przy pH 7. Holmberg i Laurell tłumaczyli inhibicję anionową blokowaniem centrów kationowych istniejących w cząsteczce ceruloplazminy. Curzon tłumaczył to hamowanie utworzeniem się kompleksu anionu z miedzią ceruloplazminy, a dodatkowo założył, że w procesie utleniania następuje anionowa stabilizacja miedzi enzymu na poziomie jednowartościowym. Nienasycone ligandy anionowe N_3^- i CNO^- wykazują szczególną dążność do utrwalania niższego stopnia utlenienia metali amfoterycznych (92). W świetle poglądów na mechanizm enzymatycznego działania ceruloplazminy, według których Cu^{2+} enzymu redukuje się przyjmując jeden elektron z substratu i utlenia się ponownie tlenem cząsteczkowym (17, 97), koncepcje Curzona zadowalająco tłumaczą hamujący wpływ anionów.

Jak już wspomniano, utlenienie przy współdziale ceruloplazminy jest stymulowane przez Fe^{2+} w niższych stężeniach, natomiast wyższe stężenia działają hamująco. Wpływ jonów żelaza zależy od pH; przy niższych pH wymagane jest większe stężenie Fe^{2+} dla maksymalnej stymulacji. Stwierdzono (26), że ceruloplazmina katalizuje szybkie utlenienie Fe^{2+} do Fe^{3+} . Jak należy zatem tłumaczyć aktywujące działanie

Fe^{2+} w układzie ceruloplazmina — PPD? Okazało się (97), że w obecności PPD nie dochodzi do utlenienia Fe^{2+} przez ceruloplazminę. Powinno wactwo Fe^{2+} jest znacznie większe w stosunku do PPD niż do ceruloplazminy i powstaje kompleks Fe^{2+} — PPD. Podczas utleniania PPD miedź ceruloplazminy jest w stanie zredukowanym i nie może utlenić żelaza. Po utlenieniu PPD jon metalu uwalnia się z kompleksu i natychmiast, zanim zostanie utleniony przez ceruloplazminę, wiąże się z następną cząsteczką substratu. Levine i wsp. (69) są zdania, że atomy miedzi ceruloplazminy wiążą się z π elektronami utlenianego substratu tworząc aktywny kompleks enzym — substrat. Atomy miedzi enzymu mogą również wiązać się z grupami funkcyjnymi (wodorotlenową, aminową) substratu, ale wtedy tworzy się kompleks nieaktywny. Jony metali dodane do układu tworzą kompleksy z grupami funkcyjnymi substratu i zapobiegają tworzeniu nieaktywnego kompleksu. Dzięki temu liczba cząsteczek substratu mogących utworzyć aktywne kompleksy z enzymem jest większa i wzrasta ogólna aktywność układu. Na poparcie swojej tezy autorzy przytaczają fakt, że efekt stymulacyjny Fe^{2+} maleje ze spadkiem pH i uważają, że zwiększona asocjacja PPD z protonami zmniejsza kompleksowanie Fe^{2+} z PPD. Rola związków chelatowych polega na ich współzawodnictwie z substratem o jony metali. Związek chelatowy w układzie enzymatycznym: ceruloplazmina — substrat — stymulujący jon metalu usuwa metal związany z substratem i w ten sposób umożliwia tworzenie nieaktywnych kompleksów enzym — substrat. Dodanie jonów metali może cofnąć to hamowanie. Humoller i wsp. (54) wyjaśniają hamowanie działania ceruloplazminy za pomocą EDTA bezpośrednim wiązaniem się związku chelatowego z miedzią ceruloplazminy. Ostatnio (10) wykazano jednak, że EDTA nie wiąże się bezpośrednio z miedzią ceruloplazminy.

Badania nad mechanizmem działania ceruloplazminy (18, 97) wykazały, że reakcja przebiega poprzez tworzenie wolnych, pośrednich rodników podobnie jak w przypadku lakazy. Posługując się metodą Lineweavera i Burka (71) lub innymi metodami (34) można wyznaczyć stałe Michaelisa, stałe inhibitorowe itp. Nowsze metody oznaczania szybkości reakcji w stanie równowagi (rezonans paramagnetyczny i ESR) pozwalają wyznaczyć średni czas trwania wolnych rodników lub jonów paramagnetycznych wynoszący od $1\ \mu\text{sek}$ do $1\ \text{sek}$. Miedź, jako amfoter o własnościach paramagnetycznych, jest szczególnie dogodnym obiektem badań ESR, gdyż daje bardzo ostry i silny sygnał (77). W obecności substratu sygnał pochodzący od miedzi ceruloplazminy słabnie lecz nie znika, co wskazuje na powstawanie kompleksu enzym — substrat (97). Obniżenie szybkości reakcji ceruloplazminy z aminami katecholowymi alkilowanymi na azocie przemawia za udziałem grupy aminowej w tworzeniu kompleksu enzym — substrat (122). W reakcji amin katecholowych z ceruloplazminą pierwszym produktem utlenienia jest

wolny rodnik dwuhydroksyfenyloetyloaminy (121). W układzie enzymatycznym ceruloplazminy i PPD zaobserwowano również tworzenie się i rozpad dodatniego rodnika powstającego z PPD (17, 97). Zaproponowano (97) następujący schemat reakcji:

$\text{PPD} \rightleftharpoons \text{PPD}'$; $\text{PPD}' \rightarrow 1/2 \text{PPD} + 1/2 \text{PPD}$; $\text{PPD} \rightarrow \text{produkt czerwony}$.

Po utworzeniu kompleksu enzym — substrat powstaje żółty rodnik PPD w wyniku przejścia elektronu z substratu na Cu^{+2} ceruloplazminy; z rodnika tego odłącza się następnie drugi elektron w reakcji dysmutacji i tworzy rodnik PPD: , który przekształca się w trwały, czerwony produkt o dotychczas nieznaną budowę. Mechanizm tego przekształcenia nie jest znany. Przypuszcza się, że PPD: ulega przegrupowaniu wewnętrznemu do iminy lub też reaguje z nadmiarem PPD.

LITERATURA

1. Aisen P., Morell A. G., *J. Biol. Chem.* **240**, 1974 (1965).
2. Alister M. R., Martin G. M., Benditt E. P., *Nature* **190**, 927 (1961).
3. Amaral D., Bornstein L., Morse D., Horecker B. L., *J. Biol. Chem.* **238**, 2281 (1963).
4. Aprison H. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **78**, 260 (1958).
5. Atherton N., Gipson Q. H., Greenwood C., *Biochem. J.* **86**, 554 (1962).
6. Bandrowski E., *Ber.* **27**, 480 (1894).
7. Bearn A. G., Kunkel H. G., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **85**, 44 (1954).
8. Bickel H., Schultze H. G., Grüter U. G., Göllner J., *Klin. Wochenschr.* **34**, 961 (1956).
9. Blaschko H., Levine W. G., *Brit. J. Pharmacol.* **15**, 625 (1960).
10. Blumberg W. E., Eisinger J., Aisen P., Morell A. G., Scheinberg J. P., *J. Biol. Chem.* **238**, 1675 (1963).
11. Blumberg W. E., Levine W. G., Peisach J., dane nie opublikowane
12. Boman H. G., Westlung L. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **64**, 217 (1956).
13. Bouchilloux S., Mc Mahill P., Mason H. S., *J. Biol. Chem.* **238**, 1699 (1963).
14. Bray R. C., *Biochem. J.* **81**, 189 (1961).
15. Broman L., *Nature* **182**, 1655 (1958).
16. Broman L., Kjellin K., *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 101 (1964).
17. Broman L., Malmström B. G., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 365 (1963).
18. Broman L., Malmström B. G., Aasa I., Vänngård T., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 36 (1963).
19. Curzon G., *Nature* **181**, 115 (1958).
20. Curzon G., *Biochem. J.* **77**, 66 (1960).
21. Curzon G., *Biochem. J.* **79**, 656 (1961).
22. Curzon G., *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 249 (1963).
23. Curzon G., Sixth Intern. Congress of Biochemistry II—41 N. Y. (1964).
24. Curzon G., *Biochem. J.* **96**, 14P (1965).
25. Curzon G., *Biochem. J.* **97**, 151 (1965).
26. Curzon G., O'Reilly S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2**, 284 (1960).
27. Curzon G., Vallet L., *Biochem. J.* **74**, 279 (1960).
28. Davison A. N., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 1737 (1958).

29. Dernałowicz E., Trojanowski J., III Krajowe Sympozjum P. T. Bioch. „Budowa i własności enzymów”, Kazimierz (1964).
30. Deutsch H. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 225 (1960).
31. Deutsch H. F., *Clin.Chim. Acta* **5**, 460 (1960).
32. Deutsch H. F., Fisher G. B., *J. Biol. Chem.* **239**, 3325 (1964).
33. Deutsch H. F., Kasper C. B., Walsh P. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 132 (1962).
34. Dixon N., *Biochem. J.* **55**, 170 (1953).
35. Drake B., *Arkiv. Kemi* **8**, 1 (1955).
36. Fanshier D. W., Kun E., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 659 (1958).
37. Fanshier D. W., Kun E., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 266 (1962).
38. Felsenfeld G., *Arch. Biochem. Biophys.* **87**, 247 (1960).
39. Fiess H. A., Klotz J. M., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 887 (1952).
40. Fling H., Horowitz N. H., Heinemann S. F., *J. Biol. Chem.* **238**, 2045 (1963).
41. Frieden E., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 414 (1958).
42. Friedman S., Kaufman S., *J. Biol. Chem.* **240**, PC552 (1965).
43. Goldenberg H., White D. L., *Clin. Chem.* **4**, 551 (1958).
44. Gubler C. J., Mahoney J. P., Bush J. A., Cartwright G. E., Wintrobe M. M., *Fed. Proc.* **14**, 435 (1955).
45. Hare M. L. C., *Biochem. J.* **22**, 968 (1928).
46. Heath R. G., Loach B. E., *Vox Sanguinis* **4**, 67 (1959).
47. Heath R. G., Leach B. E., Byers L. W., Martens S., Feigly C., *Amer. J. Psychiatry* **114**, 683 (1958).
48. Henry R. J., Chiamori N., Jacobs S. L., Segalove M., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **104**, 620 (1960).
49. Hirschfeld J., *Science Tools* **8**, 17 (1961).
50. Hjerten S., *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 216 (1959).
51. Holmberg C. G., Laurell C. B., *Acta Chem. Scand.* **2**, 550 (1948).
52. Holmberg C. G., Laurell C. B., *Acta Chem. Scand.* **5**, 476 (1951).
53. Houchin B. D., *Clin. Chem.* **4**, 519 (1958).
54. Humoller F. L., Mockler M. P., Holthaus J. M., Mahler J. D., *J. Lab. Clin. Med.* **56**, 222 (1960).
55. Jamieson C. A., *J. Biol. Chem.* **240**, 2019 (1965).
56. Karlson P., w *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964, str. 173.
57. Kasper C. B., Deutsch H. F., *J. Biol. Chem.* **238**, 2325 (1963).
58. Katoh S., Suga J., Shiratori J., Takamiya A., *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 136 (1961).
59. Kawierianiewa E. D., Gaszczko G. P., *Ukr. Biochim. Żurn.* **35**, 507 (1963).
60. Keilin D., Mann T., *Proc. Roy. Soc. London B* **125**, 187 (1938).
61. Kertesz D., Zito R., *Nature* **179**, 1017 (1957).
62. Kertesz D., Zito R., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 153 (1962).
63. Kimmel J. R., Markowitz H., Brown D. M., *J. Biol. Chem.* **234**, 46 (1959).
64. Klotz J. M., Klotz T. A., *Science* **121**, 477 (1955).
65. Kubowitz F., *Biochem. Z.* **299**, 32 (1938).
66. Lakshman T. K., Lieberman S., *Arch. Biochem. Biophys.* **45**, 235 (1953).
67. Lemberg R., Mansley G. E., *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 187 (1965).
68. Levin E. Y., Levenberg B., Kaufman S., *J. Biol. Chem.* **235**, 2080 (1960).

69. Levine W. G., Peisach J., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 528 (1962).
70. Levine W. G., Peisach J., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 602 (1963).
71. Lineweaver H., Burk O., *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658 (1934).
72. Lisalo E., *Acta Pharmacol. Toxicol.* **19**, suppl. 1 (1962).
73. Magee R. J., Dawson C. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 338 (1962).
74. Mahler H. R., w Trace Elements, red. Lamb C. A., Bentley O., Beattie J. M. New York 1958, str. 331.
75. Mallette M. F., Lewis S., Ames S. R., Nelson J. M., Dawson C. R., *Arch. Biochem.* **16**, 283 (1948).
76. Malmström B. G., Mosbach R., Vänngård T., *Nature* **183**, 321 (1959).
77. Malmström B. G., Neilands J. B., *Ann. Rev. Biochem.* **331**, 33 (1964).
78. Mann T., Keilin D., *Proc. Roy. Soc.* **126**, 303 (1938).
79. Mann P. J. G., *Biochem. J.* **79**, 623 (1961).
80. Markowitz H., Cartwright G. E., Wintrobe M. M., *J. Biol. Chem.* **234**, 40 (1959).
81. Marriot J., Perkins D. J., *Biochem. J.* **96**, 13P (1965).
82. Mason H. S., *Nature* **177**, 79 (1956).
83. Morell A. G., Aisen P., Scheinberg J. H., *J. Biol. Chem.* **237**, 3455 (1962).
84. Morell A. G., Aisen P., Blumberg W. E., Scheinberg J. H., *J. Biol. Chem.* **239**, 1042 (1964).
85. Morell A. G., Scheinberg J. H., *Science* **127**, 588 (1958).
86. Morell A. G., Scheinberg J. H., *Science* **131**, 930 (1960).
87. Morrison M., Horie S., Mason H. S., *J. Biol. Chem.* **238**, 2220 (1963).
88. Mosbach R., *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 204 (1963).
89. Nakamura T., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 640 (1958).
90. Nitschmann H., Kistler P., Lergier W., *Helv. Chim. Acta* **37**, 866 (1954).
91. Orgel L. E., *Symp. Biochem. Soc.* **15**, 8 (1958).
92. Orgel L. E., w An Introduction to Transition-metal Chemistry, red. J. Wiley and Sons New York 1960, str. 133.
93. Osaki S., *J. Biochem.* **48**, 190 (1960).
94. Osaki S., Dermott J. A., Frieden E., *J. Biol. Chem.* **239**, PC364 (1964).
95. Osaki S., Dermott J. A., Frieden E., *J. Biol. Chem.* **239**, 3570 (1964).
96. Pauling L., w The Nature of the Chemical Bond, Nowy York 1960.
97. Peisach J., Levine W. G., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 615 (1963).
98. Peisach J., Levine W. G., *J. Biol. Chem.* **240**, 2284 (1963).
99. Poillon W. N., Dawson R. C., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 37 (1963).
100. Porter H., Folch J., *J. Neurochem.* **1**, 260 (1957).
101. Poulik M. D., *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 390 (1960).
102. Poulik M. D., *Nature* **194**, 842 (1962).
103. Poulik M. D., Bearn A. G., *Clin. Chim. Acta* **7**, 374 (1962).
104. Prasał Z., *Annales UMCS sec D.* (w druku).
105. Ravin H. A., *Lancet* **1**, 726 (1956).
106. Rice E. W., *Anal. Biochem.* **3**, 452 (1962).
107. Richterich R., Temperli A., Aebi H., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 240 (1962).
108. Sanders B. E., Miller D. P., Richard M. N., *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 60 (1959).
109. Scheinberg J. H., Gitlin D., *Science* **116**, 484 (1952).
110. Scheinberg J. H., Morell A. G., *J. Clin. Invest.* **36**, 1193 (1957).
111. Scheinberg J. H., Morell A. G., *Science* **126**, 925 (1957).

112. Schultze H. E., Göllner J., Heide K., Schonenberger M., Schwigk G., *Z. Naturforsch.* **106**, 463 (1955).
113. Schultze H. E., Schwigk G., *Clin. Chim. Acta* **4**, 15 (1959).
114. Shichi H., Hackett D. P., *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 185 (1963).
115. Shimizu M., Maruyama Y., Kukita M., Yanagisawa Y., Sato T., Osaki S., *J. Biochem. (Tokyo)* **49**, 673 (1961).
116. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S., *Anal. Chem.* **30**, 1190 (1958).
117. Steinbuch M., Quentin M., *Nature* **183**, 323 (1959).
118. Sgouris J. T., Coryell F. C., Gallick H., Storey R. W., Call K. B., Anderson H. D., *Vox Sanguinis* **7**, 394 (1962).
119. Szent Gyorgi A., *Science* **72**, 125 (1930).
120. Tabor W., Tabor H., Rosenthal S. M., *J. Biol. Chem.* **208**, 645 (1954).
121. Walaas O., Walaas E., Henriksen T., Löfstad R., *Acta Chem. Scand.* **17**, 263 (1963).
122. Walaas E., Löfstad R., Walaas O., *Biochem. J.* **92**, 18 P (1964).
123. Wald J., Murawski K., Szajbel W., *Postępy Hig. i Med. Dośw.* **13**, 697 (1959).
124. Wald J., Szajbel W., Murawski K., *Arch. Immun. Therap. Exper.* **10**, 549 (1962).
125. Walter Ch., Friedon E., *Fed. Proc.* **21**, 246 (1962).
126. Wilson S. A. K., *Brain* **34**, 295 (1912).
127. Yamada H., Gee P., Ebata M., Yasunobu X., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 165 (1964).

ADDENDUM

Po oddaniu tego artykułu do druku ukazały się następujące publikacje uzupełniające poruszane zagadnienia:

1. Curzon G., *Biochem. J.* **100**, 295 (1966).
2. Marriott J., Perkins D. J., *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 387 (1966).
3. Marriott J., Perkins D. J., *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 395 (1966).
4. Morell A. G., Van den Hamer C. J., Scheinberg S. H., *J. Biol. Chem.* **241**, 3745 (1966).
5. Osaki S., Johnson D. A., Frieden E., *J. Biol. Chem.* **241**, 2746 (1966).
6. Starcher B., Hill C. H., *Biochim. Biophys. Acta Previews* **6**, 4—5 (1966).

O mechanizmie enzymatycznej hydrolizy ATP przez miozynę

On the Mechanism of ATP Hydrolysis by Myosin

Recent data and views concerning the mechanism of ATP-ase activity of myosin are described.

Mechanizm enzymatycznej hydrolizy ATP przez miozynę (fosfohydrolaza ATP, EC 3.6.1.3) jest jednym z kluczowych zagadnień biochemii, skurczu mięśniowego. Niemalże od chwili, gdy Engelhardt i Ljubimova stwierdzili w 1939 r., że kurczliwe białko mięśniowe — miozyna jest równocześnie ATP-azą (41).

Badania ostatnich lat potwierdziły (4, 23, 94, 95) udział ATP jako bezpośredniego źródła energii przy skurczu mięśni i pomimo pewnych wątpliwości wysuwanych w latach 1955—58 (37, 93, 117) jest on obecnie powszechnie uznawany. Należy przypuszczać, że rola miozyny, głównego obok aktyny składnika miofibrylli, nie ogranicza się do przyłączenia ATP i jego hydrolizy. Prawdopodobnie miozyna bądź sama, bądź w połączeniu z aktyną, ulega ponadto na którymś etapie reakcji enzymatycznej takim zmianom wewnątrzcząsteczkowym, które umożliwiają „przechwycenie” energii chemicznej zawartej w wiązaniu pirofosforanowym ATP i jej przekształcenie w mechaniczną energię skurczu.

I. Badania kinetyczne

Jednym z ciekawych zjawisk, wyjątkowym dla reakcji enzymatycznych, jest tzw. „wybuchowa” faza hydrolizy ATP przez miozynę. Zjawisko to, stwierdzone po raz pierwszy przez Webera i Hasselbacha (141), a następnie zbadane przez grupę Tonomury (75, 127, 128, 131) i przez Bowena (15), polega na tym, że V_{max} hydrolizy ATP jest

Wykaz stosowanych skrótów: NEM — imid kwasu N-etylmaleinowego, HEDD — dwusiarczek β -hydroksyetylo-2,4-dwunitrofenylowy, Salyrgan — amid kwasu salicylo-(γ -hydroksy- β -metoksypropylo)octowego, CED — dwusiarczek bis-karboksyetlowy, TBS — 2,4,6-trójnitrobenzenosulfonian, Oksarsan — tlenek AsIII *m*-amino-p-oksyfenylu.

* Dr, adiunkt Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa.

wielokrotnie większa w pierwszych 10—20 sekundach po zetknięciu się enzymu z substratem niż w późniejszym okresie, przy czym stała Michaelisa jest niemal identyczna (127). Uwalniająca się na początku reakcji dodatkowa ilość P_n pochodzi całkowicie z dodanego ATP, a występujący po kilkunastu sekundach spadek szybkości hydrolizy nie jest spowodowany, wbrew pewnym sugestiom (7), ani zmniejszeniem się stężenia ATP, ani hamującym działaniem produktów reakcji (15, 127). Jeżeli po wyczerpaniu substratu dodawano świeżą porcję ATP, obserwowano ponownie „wybuchową” fazę hydrolizy. Dodatkowa ilość uwalniającego się P_n zależy od warunków inkubacji. W obecności EDTA, lub w obecności GTP czy UTP jako substratów reakcji „wybuchowej” wcale nie obserwuje się (127, 128). Różnicę między „wybuchową” i późniejszą szybkością hydrolizy stwierdzono drogą pomiarów przyrostu stężenia obu produktów reakcji, mianowicie ADP i P_n . Natomiast pomiary przyrostu stężenia jonów wodorowych wskazywały na liniowy przebieg reakcji, bez początkowej fazy „wybuchowej” (75, 131).

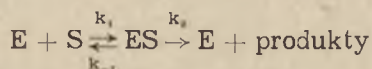
Większość badań nad hydrolizą ATP przez miozynę była przeprowadzona przy zastosowaniu dłuższych czasów inkubacji enzymu z substratem i omówione dalej wyniki badań nad kinetyką tej reakcji dotyczą wyłącznie drugiego etapu hydrolizy ATP.

ATP-aza miozynowa podlega prawu Michaelisa i Mentena (107, 140). Wartości stałych kinetycznych uzyskane przez różnych autorów różnią się jednak znacznie, nawet o dwa rzędy wielkości. Rozbieżności te należy przypisywać różnym warunkom, w których badano hydrolizę ATP (4, 108). Zarówno K_m , V_{max} jak i energia aktywacji zależą w znacznym stopniu od pH , temperatury, stężenia kationów dwuwartościowych, siły jonowej oraz zanieczyszczeń. Uwzględniając wpływ tych czynników uzyskano w pracowni Tonomury (4) wartość $K_m = 6 \times 10^{-5} M$ a w pracowni Quilleta (108) wartość $4 \times 10^{-5} M$, a więc wyniki dość zgodne.

W obecności Ca^{2+} wartości zarówno V_{max} , K_m jak i energii aktywacji ATP-azy miozynowej wykazują charakterystyczne obniżenie (pessimum) przy pH 7,5, nie obserwowane dla żadnej z innych poznanych ATP-az. Miozyna nie wykazuje pessimum pH , jeżeli jej aktywność jest oznaczana w obecności EDTA lub poniżej pewnej temperatury krytycznej: poniżej 15° w 0,5M KCl, czy poniżej 25° w 0,075M KCl (74). Siła jonowa wpływa znacznie na wartość K_m : w 0,5M KCl wzrasta ona wraz ze wzrostem temperatury (4), natomiast w 0,15M KCl spada, co wskazuje na ujemną energię aktywacji przy tym stężeniu KCl (140). Miozyna jest też jedyną ATP-azą, dla której Mg^{2+} jest inhibitorem, przy czym Mg^{2+} obniża znacznie V_{max} , niewiele zmieniając stałą Michaelisa (105). Na podstawie tych danych oraz badań nad wpływem pH na V_{max} i K_m Pelletier i Quillet (108), a także Azuma i Tonomura (4) wysunęli hipotezę o obecności w centrum aktywnym enzymu dwóch reszt amino-

kwasowych o stałej dysocjacji zbliżonej do stałej grupy sulfhydrylowej cysteiny i grupy imidazolowej histydyny. Uwzględniając hamowanie ATP-azy miozynowej przez nadmiar substratu Pelletier i Quellet (108) sugerują ponadto, że hydroliza ATP odbywa się w dwóch etapach: w pierwszym ATP przyłączałyby się do grupy imidazolowej i sulfhydrylowej, w drugim zaś, limitującym szybkość reakcji, powstające jako produkt przejściowy wiązanie -S-P ulegałoby hydrolizie.

Dzięki zastosowaniu wyjątkowo czułej metody oznaczania stężenia wolnego ATP za pomocą lucyferyny i lucyferazy, Nanninga i Mommaerts (99, 100, 101) ustalili, że 1 mol ATP wiąże się z 400 000 g miozyny, oraz oznaczyli bezpośrednio stałe k_1 i k_2 dla reakcji:



Okazało się, że $k_{-1} \ll k_2$, co pozwoliło uprościć klasyczne równanie dla K_m do postaci $K_m = \frac{k_2}{k_1}$. Wynika stąd, że stała Michaelisa miozyny oznaczana klasyczną metodą nie jest miarą powinowactwa enzymu do substratu lecz wyraża stosunek stałej szybkości rozkładu kompleksu ES do stałej szybkości łączenia się enzymu z substratem. Okazało się ponadto, że $k_1 \gg k_2$, a zatem że szybkość całej reakcji jest określana przez szybkość odłączania się produktów reakcji od enzymu. Uzyskana przez Nanningę i Mommaerts wartość K_m w pH 7,0 ($1,25 \times 10^{-6} M$) różni się znacznie od wartości obliczonych w pracowniach Quelletta (108) i Tonomury (4). Rozbieżność ta spowodowana została prawdopodobnie specyficznymi warunkami niezbędnymi dla pomiarów przy pomocy lucyferazy. Przyjęcie wyższych wartości K_m nie podważa jednak słuszności wniosku Nanningi, że o szybkości hydrolizy ATP decyduje szybkość uwalniania miozyny od produktów reakcji.

II. Hydroliza enzymatyczna analogów ATP

Modyfikacja części polifosforanowej. Miozyna może przejawiać swoje enzymatyczne właściwości tylko wówczas, gdy jej substraty (polifosforan nieorganiczny lub nukleotyd) zawierają łańcuch złożony z co najmniej trzech reszt fosforanowych. Pirofosforan i nukleozydodwufosforany nie są przez nią hydrolizowane, przyłączają się jednak do enzymu, prawdopodobnie w tym samym miejscu co trójfosforany (41). Trójpolifosforan jest hydrolizowany z niewielką szybkością (3), a K_m dla tej reakcji jest dziesięciokrotnie wyższa niż dla ATP (3, 39). Z substancji, zawierających więcej niż trzy reszty fosforanowe, zbadano jedynie adenozyntetra- i pentaosforan (58) i wykazano, że trzy reszty fosforanowe stanowią ilość minimalną, a zarazem optymalną dla procesu hydrolizy nukleotydu: im dłuższy jest łańcuch polifosforanowy substratu, tym mniejsza jest

szybkość hydrolizy. Podczas hydrolizy tych analogów następuje kolejne odłączanie grup fosforanowych i produktami reakcji są ADP i ortofosforan. Analogi ATP, w których γ P został zastąpiony grupą siarczanową (61) lub tlen łączący grupę fosforanową β z γ — grupą $-\text{CH}_2-$ (96) nie są hydrolizowane przez miozynę.

Modyfikacja części węglowodanowej. Przyłączenie rybozy do trójpolifosforanu powoduje zmniejszenie szybkości jego hydrolizy przez miozynę (3). Badania nukleozydotrójfosforanów o rozmaicie modyfikowanej części węglowodanowej pozwalają przypuszczać, że główną rolą rybozylu w reakcji tych substratów z miozyną jest utrzymanie należytej odległości między zasadą azotową i łańcuchem polifosforanowym (62). Poza tym jest możliwe, że atom tlenu przy trzecim węglu rybozylu ma pewne specyficzne znaczenie przy hydrolizie (63).

Modyfikacja zasady azotowej. Obszernie badano hydrolityczne działanie miozyny na nukleozydotrójfosforany o różnych zasadach azotowych zarówno na tzw. naturalne nukleotydy: GTP, ITP, CTP, UTP (4, 14, 57, 71, 88, 105) jak i na rozmaite analogi syntetyczne (63, 64, 65). Wszystkie zbadane związki ulegają hydrolizie przez miozynę, przy czym szybkość hydrolizy zależy od rodzaju zasady oraz od obecności jonów wapnia i magnezu. Porównując szybkość hydrolizy nukleotydów w obecności jonów wapnia można je uszeregować w następujący sposób: $\text{ITP} > \text{GTP} > \text{UTP} > \text{ATP} > \text{CTP}$ (9, 57). W tej samej kolejności maleje też K_m dla poszczególnych nukleotydów (9), przy czym K_m dla ITP jest około dziesięciokrotnie wyższa niż dla ATP (4, 71). Mniejsze powinowactwo miozyny do ITP niż do ATP udowodniono też bezpośrednio hydrolizując w tej samej próbie ekwimolarne ilości ^{32}P ATP i nieradioaktywnego ITP (88). Uwolniony przez miozynę ortofosforan pochodził wyłącznie z ATP. Charakterystyczne dla ATP-azy miozynowej V_{\max} i K_m przy pH 7,5 nie występuje w przypadku hydrolizy ITP przez miozynę (4). Uszeregowanie nukleotydów według szybkości ich hydrolizy w obecności jonów magnezu jest inne: $\text{GTP} > \text{ITP} > \text{UTP} > \text{CTP} > \text{ATP}$ (57); jony Mg^{2+} hamują hydrolizę ATP, aktywują zaś hydrolizę GTP i ITP. Wprowadzenie EDTA całkowicie odwraca przytoczoną kolejność (57, 105); hydroliza ATP i CTP jest w tych warunkach silnie aktywowana, a hydroliza ITP i GTP — hamowana. Działanie EDTA polega zapewne na usuwaniu związanych z białkiem kationów dwuwartościowych (98, 106). Wpływ stężenia KCl na hydrolizę również zależy od budowy zasady w nukleotydzie. Optymalne stężenie KCl przy hydrolizie ATP przez miozynę wynosi 0,1M, a przy hydrolizie ITP — 0,5M (114).

Pomiary energii aktywacji hydrolizy ATP przez miozynę w niskiej sile jonowej wykazały, że krzywa Arrheniusa (wyrażająca zależność logarytmu szybkości hydrolizy wobec $\frac{1}{T}$) jest w badanym zakresie 0° — 37°

linią prostą, a zatem energia aktywacji jest stała (ok. 12 Kcal/mol). Natomiast, odpowiedni wykres dla ITP i innych 6-OH nukleotydów składa się z dwóch prostych, o różnym nachyleniu: w zakresie od 0° do 15° energia aktywacji jest bliska wartości dla ATP; w zakresie od 15° do 37° jest ona dwukrotnie wyższa (4, 88).

Wydaje się, że przebieg hydrolizy nukleotydów zależy od rodzaju podstawników w pozycji 6 zasady azotowej (70). Związki, w których grupy 6-OH lub 6-NH₂ są zablokowane (na przykład morfoliną lub metylomerkaptidem), hydrolizowane są z szybkością zbliżoną do szybkości hydrolizy trójpolifosforanu (61, 62, 63). Przypuszcza się, że nukleotyd purynowy łączy się z enzymem w dwóch miejscach: w jednym — swoją skrajną grupą fosforanową, w drugim zaś — zasadą, najprawdopodobniej poprzez grupę znajdującą się w pozycji 6. Obecność podstawnika (NH₂ lub OH) w pozycji 6 ma zasadnicze znaczenie dla przyspieszenia hydrolizy γ P nukleozydotrójfosforanu, zaś rodzaj wiążącej się z enzymem grupy wpływa na charakter enzymatycznego procesu.

III. Wpływ modyfikacji miozyny na jej własności enzymatyczne

Już w r. 1944 Singer i Barron (116) i następnie Bailey i Perry (5) uzyskali zahamowanie ATP-azy miozynowej pod wpływem bardziej lub mniej specyficznych odczynników na grupy sulfhydrylowe. Okazało się, że związki te działają w dwu fazach. Jeśli z 7,5 równoważników SH/10⁵g miozyny* (77, 125) zablokować lub utlenić nie więcej niż 1,5 do 2 równoważników następuje dwu—trzykrotna aktywacja ATP-azy miozynowej oznaczanej w obecności Ca²⁺. Zablokowanie większej ilości grup SH powoduje stopniowy spadek aktywności enzymatycznej, a po przereagowaniu około 6 równoważników, czyli wszystkich grup SH w rodzimej miozynie, dostępnych dla większości odczynników sulfhydrylowych, enzym praktycznie traci aktywność. Dwufazową reakcję z miozyną dają następujące związki: PCMB, NEM (70), fenylortęciooctan (46), ekwimolarna mieszanina arsenianu i 2,3-dwumerkaptopropanolu (38), Zn²⁺ (43), Cu²⁺, Cd²⁺ (10), bromek S- β -aminoetyloizotiurowy (97), hydrazon karbonylocjanido-*p*-chlorofenyłu (12), *p*-arsenofenylo-*n*-maślan (13), N-4-dwumetyloamino-3,5-dwunitrofeny-

*Ciężar cząsteczkowy miozyny nie został dotąd jednoznacznie określony. Obecnie przeważa pogląd, że cząsteczka miozyny ma ciężar molekularny około 600 000 i składa się z 3 jednakowych podjednostek. Każda z tych jednostek zawiera fragment enzymatycznie czynnej H-meromiozyny i nieczynnej L-meromiozyny (71). W dalszym ciągu pracy wszystkie przeliczenia będą umownie odnoszone do 100 000 g miozyny.

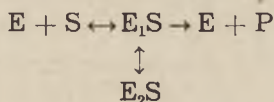
lomaleimid (143), HEDD (8, 67, 68), kwas dwutioglikolowy i jego ester metylowy (40). Podobny wpływ wywiera fotooksydacja miozyny (115, 120) i promienie rentgenowskie (124). Działanie niektórych z wymienionych odczynników sumuje się zarówno w fazie aktywacji, jak i hamowania ATP-azy (11).

Aktywacja miozyny w wyniku zablokowania niewielkiej liczby grup SH występuje jedynie przy hydrolizie CTP i ATP, tj. nukleotydów posiadających grupę aminową w pozycji 6, natomiast hydroliza ITP lub GTP jest w tych warunkach hamowana. Faza aktywacji miozyny pojawia się tylko w ściśle określonych warunkach i to w takich samych, w których występuje pessimum pH (przy pH 7,5) i niezależność energii aktywacji od temperatury (10, 11, 44, 47). Poniżej pewnej krytycznej temperatury, zależnej od siły jonowej nie obserwuje się fazy aktywacji (12, 114, 129). Również w obecności EDTA faza ta nie występuje. W tych warunkach nawet zablokowanie tylko 1 równoważnika SH w miozynie znosi całkowicie jej aktywność wobec ATP (112, 114, 67).

Hydroliza ATP lub CTP przez enzym o małej ilości zablokowanych grup -SH upodabnia się do hydrolizy ITP lub GTP przez rodzimą miozynę. Szybkość hydrolizy ATP przewyższa nawet, a wartość K_m dla ATP zbliża się do wartości dla ITP (10, 114), energia aktywacji zależy od temperatury, podobnie jak dla ITP (88); optymalne stężenie KCl przesuwają się z 0,1M do 0,5M, to znaczy do optimum dla hydrolizy 6-OH nukleotydów (114); znika charakterystyczne dla 6-NH₂ nukleotydów pessimum przy pH 7,5 (11, 69, 114); Mg^{2+} przestaje być inhibitorem i staje się nawet aktywatorem (69, 112), EDTA zaś, jak już wspomniano, staje się inhibitorem funkcji ATP-azowej zmodyfikowanego białka.

Wszystkie te obserwacje nasunęły myśl o bezpośrednim udziale w hydrolizie ATP dwóch różnych rodzajów grup SH miozyny (10, 44, 70). Grupy SH jednego rodzaju, mniej reaktywne w stosunku do odczynników sulfhydrylowych wiązałyby się z łańcuchem polifosforanowym substratu. Zablokowanie tych grup w miozynie musi powodować pełną utratę jej aktywności enzymatycznej w stosunku do wszystkich substratów. Drugi rodzaj grup SH, bardziej reaktywnych wobec odczynników sulfhydrylowych wytwarzałby prawdopodobnie przy udziale Mg^{2+} (jak wskazuje aktywujący wpływ EDTA na ATP-azę miozynową) wiązanie z grupą aminową w pozycji 6 zasady nukleotydu. Wiązanie takie „usztynia” zapewne strukturę cząsteczki miozyny i chroni jej centrum aktywne przed odwracalnymi zmianami, występującymi po przekroczeniu pewnej krytycznej temperatury (88). Wiązanie się 6-OH nukleotydów z miozyną nie wywołuje tego efektu ochronnego. Zablokowanie grupy SH reagującej z grupą 6-NH₂ substratu powoduje, że 6-NH₂ nukleotydy łączą się z enzymem i są hydrolizowane w taki sam sposób jak 6-OH nukleotydy.

Tonomura i wsp. (4, 105) zaproponowali schemat, według którego mogą powstawać dwa różne kompleksy miozyna-substrat.



Tylko jeden z kompleksów (E_1S), wytwarzany zarówno przez 6-NH₂ jak i 6-OH nukleotydy może ulegać hydrolizie. Drugi kompleks (E_2S) wytwarzający się tylko z 6-NH₂ nukleotydami nie ulega hydrolizie, co sprawia, że szybkość hydrolizy ATP i CTP jest mniejsza niż 6-OH nukleotydów. Hamujący wpływ takich czynników, jak jony magnezu, pH 7,5, wyższa siła jonowa, tłumaczyłby się tym, że przesuwają one równowagę reakcji w kierunku tworzenia E_2S . Aktywację ATP-azy pod wpływem niewielkich stężeń odczynników sulfhydrylowych należałoby przypisać zablokowaniu grupy SH odpowiedzialnej za tworzenie kompleksu E_2S .

Sekine i wsp. (112) oraz Gröschel-Stewart i wsp. (48, 49) zastosowali blokowanie grup SH miozyny przy pomocy [¹⁴C] NEM. Okazało się, że w warunkach, w których ATP-aza jest aktywowana w obecności Ca²⁺, a hamowana w obecności EDTA, NEM wiąże się wybiórczo z jedną tylko resztą cysteinową miozyny, umieszczoną w jednym z peptydowych produktów enzymatycznej proteolizy tego białka. Trójpeptyd zawierający tę bardziej reaktywną grupę SH (S_1) wyodrębniono i ustalono w nim sekwencję Ileu-Cys-Arg (143). Zdołano także zablokować wybiórczo drugi rodzaj grup SH (S_2), odpowiedzialnych za hamowanie ATP-azy w obecności Ca²⁺ (50, 144). Grupy te występują w innym trójpeptydzie o składzie: Cys-Asp-Gly (144).

Fakty te przemawiają wprawdzie za bezpośrednim udziałem w hydrolizie ATP dwóch rodzajów grup SH jako grup kontaktowych, nie są jednak bezpośrednim dowodem. Nie można bowiem wykluczyć, że spełniają one pomocniczą rolę w procesie katalizy, bądź też biorą udział jedynie w utrzymaniu odpowiedniej struktury centrum aktywnego (79). W myśl teoretycznej analizy hamowania enzymów (2) jednym z zasadniczych warunków uznania danej grupy SH miozyny jako grupy kontaktowej byłoby wykazanie, że ATP lub jego analogi chronią ją przed zablokowaniem odczynnikami sulfhydrylowymi. Uzyskane dane są jednak sprzeczne: według Gilmoura i wsp. (44) oraz Bluma (11) obecność ATP w czasie blokowania grup SH przy pomocy PCMB opóźnia i zmniejsza zarówno fazę aktywacji jak i fazę hamowania ATP-azy, natomiast Sekine i wsp. (113) twierdzą, że obecność ATP znacznie przyspiesza drugą hamującą fazę oddziaływania NEM na miozynę.

Stracher (119, 121) stwierdził, że zablokowanie symetrycznym dwusiarczkiem β -karboksyetylowym (CED) około 6 równoważników SH/10⁵ g miozyny powoduje całkowitą utratę aktywności ATP-azy oznaczanej w obecności Ca²⁺, a merkaptotetanol przywraca utraconą aktywność. Jeżeli jednak na zmodyfikowaną przy pomocy CED miozynę podziałać dużym stężeniem jodoacetamidu, merkaptotetanol nie reaktywuje enzymu. Stracher wykazał, że [¹⁴C]jodoacetamid reaguje z jedną grupą cysteinową i jedną grupą histydynową w przeliczeniu na 2×10⁵ g miozyny. Obecność ATP nie wpływa na reakcję z jodoacetamidem grupy imidazolowej histydyny w zmodyfikowanej CED miozynie, chroni natomiast grupę cysteinową przed taką reakcją i umożliwia reaktywację enzymu merkaptotetanołem. Wyniki te świadczą, że grupy SH miozyny trudno poddające się zablokowaniu odgrywają istotną rolę w procesie hydrolizy ATP. Ostatnio wykazano (69), że wbrew przyjętemu pogładowi, zablokowanie wszystkich grup SH miozyny dostępnych dla HEDD lub jodoacetamidu (tj. około 6 równoważników SH/10⁵ g miozyny) nie hamuje całkowicie aktywności ATP-azy oznaczanej w obecności jonów wapnia lub magnezu. Miozyna, w której przy pomocy dwusiarczku zablokowano sześć grup SH („6 S-S miozyna”), zachowuje 2—3% swojej aktywności ATPazowej w obecności Ca²⁺ i ponad 50% w obecności Mg²⁺. W świetle badań Strachera można przypuszczać, że obecność 1,5 równoważnika grup SH/10⁵ g miozyny, trudno poddających się zablokowaniu, nie tylko umożliwia reaktywację enzymu merkaptotetanołem, lecz także pozwala katalizować hydrolizę ATP, aczkolwiek ze zmniejszoną szybkością.

Zablokowanie innych grup w miozynie również zmienia jej aktywność enzymatyczną. Tonomura i wsp. (63, 82, 135) wykazali, że 2,4,6-trójnitrobenzenosulfonian (TBS), odczynnik reagujący dość wybiórczo z wolnymi grupami aminowymi białek (81) wywołuje w niskich stężeniach aktywację ATP-azy miozynowej i zanik pessimum przy pH 7,5, w wyższych zaś — stopniowy spadek aktywności. Dodatek ATP lub PP zmniejsza powinowactwo TBS do miozyny. W przeciwieństwie do rodzimej miozyny ATP-aza enzymu zmodyfikowanego niskimi stężeniami TBS nie jest aktywowana przez PCMB. Japońscy autorzy uważają, że dowodzi to bezpośredniego zaangażowania grupy ϵ -NH₂ lizyny w procesie hydrolizy ATP, co sugerował też wcześniej Bárány (6).

Szereg danych świadczy również o bezpośrednim udziale grupy imidazolowej histydyny w centrum aktywnym miozyny (60, 65). Stracher doniósł ostatnio (122), że wbrew wynikom jego poprzednich prac (119, 121), grupa imidazolowa może odgrywać zasadniczą rolę w zachowaniu podatności zmodyfikowanej przy pomocy CED miozyny na reaktywację merkaptotetanołem. Miozynę zmodyfikowaną przy pomocy CED poddał on fotooksydacji z udziałem błękitu metylenowego i stwierdził wybiórcze utlenienie grup imidazolowych, podczas gdy w rodzimej mio-

zynie w tych warunkach równocześnie utleniają się też grupy -SH (115, 120). Zmodyfikowana CED i poddana fotooksydacji miozyna nie odzyskiwała aktywności ATP-azowej pod wpływem merkaptoetanolu. Obecność ATP w czasie fotooksydacji chroniła grupę imidazolową od utleniania i pozwalała zachować zdolność enzymu do reaktywacji merkaptoetanolem.

Interpretację wyników uzyskanych z miozyną o zmodyfikowanych resztach aminokwasowych utrudnia fakt, że szereg odczynników, nie reagujących z tymi resztami, wywiera na ATP-azę miozynową podobny wpływ jak odczynniki na grupy sulfhydrylowe i aminowe.

EDTA, który nie reaguje z żadną resztą aminokwasową białka (33), działa na miozynę podobnie do odczynników na grupy sulfhydrylowe. W zbliżony sposób działają też: mocznik, guanidyna, formamid, dioksan, chloroetanol (19) oraz alkohole alifatyczne (34). Odczynniki te nie reagują z resztami aminokwasowymi, wywołują natomiast zmiany w drugorzędowej strukturze białek: na przykład, maksymalnej aktywacji ATP-azy przez glikol etylenowy towarzyszy zmiana dyspersji skręcalności optycznej świadcząca o ubytku zawartości struktur α -heliksowych (66), a podczas aktywacji enzymu dioksanem obserwuje się wzrost zawartości tych struktur (132, 134).

Dwunitrofenol (DNP), którego mechanizm działania na białko nie jest wyjaśniony, użyty w odpowiednim stężeniu aktywuje również ATP-azę miozynową (24, 43, 46, 109). Aktywacja ta zachodzi w tych samych warunkach temperatury, siły jonowej, stężenia Mg^{2+} lub Ca^{2+} , w jakich działa aktywująco zablokowanie niewielkiej ilości grup -SH. Przy badaniu wpływu temperatury w obecności DNP otrzymuje się dwufazową krzywą Arrheniusa (84, 88), a zmiany V_{max} i K_m dla ATP, CTP, UTP, GTP i ITP wywołane przez DNP są również analogiczne do wywoływanych odczynnikami na grupy sulfhydrylowe (9). W wyniku zmiany K_m wywołanej dwunitrofenolem, nieorganiczny pirofosforan i ADP stają się potężnymi inhibitorami kompetytywnymi ATP-azy, pomimo wielokrotnie zwiększonej V_{max} (90). Aktywujące działania DNP i niewielkich stężeń PCMB nie są jednak addytywne, co nasunęło przypuszczenie o obecności w natywnej miozynie dwóch niezależnych od siebie grup hamujących hydrolizę 6-NH₂ nukleotydów (87). Levy i wsp. (90) badając wpływ DNP na ATP-azę miozynową po preinkubacji miozyny z DNP, zaobserwowali szybką, nieodwracalną utratę aktywności enzymatycznej dochodzącą nawet do 90%. Autorzy ci wykazali, że DNP reaguje co najmniej w trzech miejscach cząsteczki białka i że związanie jednego mola ATP, ADP, TP lub pirofosforanu na podjednostkę enzymatyczną miozyny całkowicie chroni enzym przed inaktywacją, natomiast AMP lub ortofosforan nie wykazują efektu ochronnego.

Aktyna również może być uważana za modyfikator miozyny. ATP-aza rodzimej lub rekonstruowanej aktomiozyny, badana w niskiej sile jonowej (tj. w warunkach, w których nie zachodzi dysocjacja aktomiozyny na miozynę i aktynę) wieloma własnościami przypomina ATP-azę miozyny zmodyfikowaną zablokowaniem niewielkiej ilości grup SH. Po dodaniu aktyny do miozyny hydroliza 6-NH₂ nukleotydów ulega aktywacji, a 6-OH nukleotydów — zahamowaniu; Mg²⁺ staje się aktywatorem; EDTA zaś inhibitorem enzymu; zanika pessimum przy pH 7,5 a V_{max} hydrolizy poszczególnych nukleotydów można uszeregować w kolejności: ATP > CTP > UTP > ITP > GTP (57). Działanie substancji, które w małych stężeniach aktywują ATP-azę miozynową imituje zatem w pewnej mierze, jak to zauważył K i e l l e y (73), wpływ aktyny na ten enzym. Wiadomo, że aktyna nie wiąże się z miozyną ani poprzez te grupy -SH, których zablokowanie wywołuje aktywację ATP-azy, ani przez grupy -SH, których zablokowanie powoduje hamowanie enzymu, lecz być może, przez jakieś jeszcze inne grupy sulfhydrylowe miozyny (6). Przyłączenie się do miozyny tak dużej cząsteczki białkowej, jak F-aktyna powoduje zapewne głębokie zmiany w strukturze drugorzędowej białka i to mogłoby tłumaczyć różnicę między ATP-azą miozynową i aktomiozynową.

Podobny wpływ wywierany przez substancje o tak różnych właściwościach sugeruje, że przy aktywacji ATP-azy miozynowej może grać rolę niekoniecznie blokowanie reaktywnych grup -SH, lecz niewielkie nawet zmiany w strukturze przestrzennej centrum aktywnego enzymu lub orientacji substratu w tej strukturze (88). Ciekawe w związku z tym wydaje się spostrzeżenie T o n o m u r y i w s p. (132), że przy maksymalnie aktywujących ATP-azę stężeniach PCMB, podobnie jak po dioksanie wzrasta zawartość struktur α -heliksowych białka, a przy wyższych stężeniach PCMB hamujących ATP-azę zawartość tych struktur staje się mniejsza niż w rodzimej miozynie. O zmianach drugo- lub trzeciorzędowej struktury miozyny pod wpływem blokowania grup -SH świadczy pośrednio fakt, że *bis*-(dwunitrofenylo)lizyna, która nie wiąże się z miozyną rodzimą, reaguje jednak z miozyną zmodyfikowaną znacznie przez PCMB lub NEM (21). K o m i n z zaobserwował (77a) pewną korelację między stopniem inaktywacji ATP-azy miozynowej za pomocą PCMB, a towarzyszącą jej stopniową agregacją cząsteczek białka i wysunął hipotezę, że inaktywujące enzym blokowanie grup -SH, dotyczy grup, które mogą się znajdować nawet w dość dużej odległości od centrum aktywnego miozyny. Sądzi on, że nawet zaobserwowany ochronny wpływ ATP lub pirofosforanu nie świadczy bynajmniej o obecności chronionych grup -SH w centrum aktywnym, gdyż wpływ tych substancji może mieć charakter niespecyficzny.

Analogia między wpływem EDTA i odczynników na grupy sulfhydrylowe oraz spostrzeżenie, że PCMB usuwa magnez i wapń związane

z miozyną (74, 130, 135) nasuwają przypuszczenie, że hamowanie ATP-azowej aktywności miozyny odczynnikami na grupy sulfhydrylowe może być spowodowane nie zablokowaniem grup -SH, lecz usunięciem kationów dwuwartościowych.

IV. Zmiany w strukturze miozyny w czasie hydrolizy ATP

Hipoteza Davies'a zakłada, że w czasie defosforylacji ATP przez miozynę w mięśniu zmienia się struktura drugorzędowa H-meromiozynowej części miozyny (27). Dotychczasowe dane doświadczalne są jednak sprzeczne. Tonomura i wsp. (133, 134) mierząc dyspersję skręcalności optycznej stwierdzili, że pod wpływem ATP zwiększa się nieco zawartość α -heliksowych struktur miozyny i H-meromiozyny. Zjawisko to jest dość specyficzne, gdyż z jednej strony nie wywołują go ani pirofosforan ani ADP, z drugiej zaś strony α -heliksowa struktura L-meromiozyny nie ulega zmianom pod wpływem ATP. Natomiast Davies i wsp. (64) oznaczając widmo absorpcji w dalekim ultrafiolecie stwierdzili spadek zawartości α -heliksowych struktur H-meromiozyny pod specyficznym wpływem ATP. Te zaledwie dwie i to sprzeczne ze sobą prace, stanowią dopiero początek badań nad zmianami konfiguracji enzymu w czasie jego działania.

V. Produkty przejściowe enzymatycznej hydrolizy ATP

Ulbrecht i wsp. (137, 138) wychodząc z założenia, że enzymatyczna hydroliza ATP jest w pewnym stopniu odwracalna, inkubowali naturalną aktomiozynę w obecności substratu z $^{32}\text{P}_n$, bądź $[^{32}\text{P}]$ ADP aby ustalić który z produktów tworzy przejściowy kompleks z enzymem. Stwierdzili oni pojawienie się radioaktywnego ATP jedynie w przypadku wprowadzenia $[^{32}\text{P}]$ ADP i wysnuli stąd wniosek, że produktem przejściowym reakcji jest ufosforylowana aktomiozyna. Na tej podstawie Weber w swym schemacie skurczu mięśniowego przypisał powstawaniu ufosforylowanej miozyny zasadniczą rolę (142). Jednakże później Ulbrecht (139) doniósł, że wynik doświadczeń z naturalną aktomiozyną można tłumaczyć obecnością mikrosomów w preparacie. Tak więc podobnie jak miozyna, lub rekonstruowana aktomiozyna (137, 138), również i naturalna aktomiozyna wolna od mikrosomów nie daje odwrócenia reakcji hydrolizy ATP. Nie świadczy to jednak, że produkt przejściowy enzymatycznej hydrolizy ATP nie powstaje, a jest tylko potwierdzeniem wyników Mommaerts'a i Nanningi (99, 100, 101), zgodnie z którymi wartość stałej szybkości odłączenia się substratu od enzymu (k_{-1}) jest bardzo niska.

Tonomura i wsp. (75, 131) wysunęli również hipotezę o fosforylacji miozyny, nie wiążą jednak tej reakcji z powstawaniem produktu przejściowego hydrolizy ATP. Jak już wspomniano, autorzy ci zauważyli, że w „wybuchowej” fazie hydrolizy ATP przez miozynę podczas pierwszych kilkunastu sekund ilość powstałego ortofosforanu przewyższa kilkakrotnie ilość pojawiających się protonów. Założyli oni, że w początkowym etapie hydrolizy ATP następuje przyłączenie ortofosforanu do białka, przy czym proton nie uwalnia się do środowiska. Środki odbiałczające stosowane przy oznaczaniu ortofosforanu rozbijają to wiązanie fosfobiałkowe i uwalniający się ortofosforan stanowi właśnie „dodatkową” ilość fosforu (około 1 mol $P_n/10^5$ g miozyny) charakterystyczną dla „wybuchowej” fazy reakcji (75, 131). Tonomura i wsp. nie wyodrębnili wprawdzie ufosforylowanego białka, stwierdzili jednak, że nukleofilny odczynnik, *p*-nitrotiofenol (NTP), łączy się z miozyną jedynie w obecności ATP i Mg^{2+} . Ilość związanego z białkiem NTP odpowiada ok. 80% ilości „ekstra” ortofosforanu (75, 131). Przyłączenie NTP w obecności ATP zmienia własności enzymatyczne miozyny w taki sam sposób jak przyłączenie niewielkich ilości PCMB. NTP łączy się prawdopodobnie z miozyną wiązaniem tioestrowym z grupą karboksylową asparaginy lub glutaminy (76). Cysteina lub siarkowodor uwalniają miozynę od NTP. Początkowo Tonomura i wsp. (75) przypuszczali, że NTP atakuje to miejsce w cząsteczce miozyny, do którego przyłącza się ortofosforan w fazie „wybuchowej”. Ponieważ jednak okazało się, że NTP-miozyna zachowuje w pełni zdolność do „wybuchowej” reakcji po ponownym dodaniu ATP (131), przyjęli oni, że w cząsteczce miozyny następuje wtórna wędrówka bądź reszty NTP, bądź też co uważają za bardziej prawdopodobne, reszty fosforanowej (76).

Tonomura i wsp. są zdania, że przyłączenie ortofosforanu do miozyny w fazie wybuchowej jest jak gdyby bocznym torem hydrolizy ATP, przypisują jednak tej reakcji olbrzymie znaczenie: proces ten jest według nich warunkiem koniecznym skurczu aktomiozyny. Pogląd swój opierają na dużym podobieństwie warunków, w których obserwuje się maksymalny przyrost „ekstra” P_n do warunków, w których następuje maksymalny skurcz miofibrilli (76, 136). Autorzy ci nie wykluczają jednak możliwości tłumaczenia reakcji „wybuchowej” zmianami konfiguracji miozyny pod wpływem ATP, w wyniku których spada szybkość hydrolizy ATP i odsłaniają się grupy zdolne do reagowania z NTP. Liniowy charakter wyzwalania protonów mógłby być spowodowany wiązaniem się z miozyną pewnej ilości powstających jonów wodorowych. Za taką koncepcją przemawiają wyniki Bowena (15), który obserwował wybuchową reakcję powstawania ADP i P_n mimo stosowania tak łagodnego środka odbiałczającego jakim jest siarczan miedzi w środowisku obojętnym.

Koshland i wsp. natomiast, badając przebieg hydrolizy ATP w wodzie wzbogaconej H_2^{18}O doszli do wniosku, że fosfomiozyna jest prawdopodobnie produktem pośrednim reakcji. Przy kwaśnej hydrolizie ATP każda cząsteczka uwalniającego się ortofosforanu zawiera w tych warunkach jeden atom ciężkiego tlenu (78), podobnie jak przy enzymatycznej hydrolizie ATP pod wpływem apyrazy z kartofli (26). Przy hydrolizie ATP pod wpływem miozyny (83, 85, 86, 89) w obecności jonów wapnia uwolniona z ATP cząsteczka ortofosforanu zawiera również tylko jeden atom ^{18}O , w obecności jonów magnezu natomiast zawartość ^{18}O dochodzi do trzech atomów na cząsteczkę ortofosforanu. Ponieważ miozyna nie katalizuje ani wymiany tlenu między H_2O i P_n — końcowym produktem reakcji, ani między H_2O i niezhydrolizowanym ATP — substratem reakcji, przyjęto zatem, że istnieje przejściowy produkt, ufosforylowany (najprawdopodobniej fosfomiozyna), którego ortofosforan jest zdolny do wymiany dwóch dodatkowych atomów tlenu z tlenem wody. Aktyna dodana do miozyny zmniejsza tę wymianę o jeden atom. Warunki, w których występuje maksymalna wymiana tlenu są podobne do warunków optymalnych dla skurczu miofibrylli, natomiast nie zawsze odpowiadają warunkom maksymalnej szybkości hydrolizy substratu.

Dempsey i Boyer (29, 30) doszli jednak do wniosku, że dodatkową wymianę tlenu między ortofosforanem, a wodą można równie dobrze wytłumaczyć, przyjmując, że miozyna katalizuje wymianę między wolnym nieorganicznym ortofosforanem, a wodą wyłącznie w obecności ATP. Inkubacja miozyny z ATP w obecności ortofosforanu nieorganicznego wzbogaconego ^{18}O wykazała, że istotnie w tych warunkach zachodzi wymiana tlenu między P_n i H_2O (29, 30). W pracowni Koshlanda skontrolowano (89, 145) te obserwacje i po konfrontacji wyników uzgodniono, że podczas hydrolizy ATP przez miozynę zachodzą jednocześnie, aczkolwiek z różną szybkością oba zjawiska: wymiana z produktem przejściowym i wymiana z ortofosforanem środowiska (16, 80). Wymiana tlenu między wodą i produktem przejściowym jest szybsza niż wymiana z ortofosforanem dodanym do środowiska, co pozwoliło opracować warunki, w których ta ostatnia nie odgrywa praktycznie żadnej roli (80, 89, 145, 123). Fakt, że wymiana tlenu między ortofosforanem i wodą zachodzi jedynie w obecności ATP i enzymu może również przemawiać za powstawaniem fosfomiozyny, jeśliby przyjąć, że reszta fosforanowa związana z miozyną ulega powolnej wymianie z nieorganicznym ortofosforanem.

Próby bezpośredniego udowodnienia powstawania fosfomiozyny w reakcji hydrolizy ATP przeprowadzili jeszcze w 1946 r. Szörenyi i Chepinoga metodą dializy wyrównawczej (126), lecz, jak wykazano później (45), znaleziony przez nich ortofosforan towarzyszący miozynie przypisać należy zanieczyszczającej preparat miokinazie. O uży-

skaniu ufosforylowanej miozyny po jej inkubacji z ATP donieśli również Buchtal i wsp. (20), Brahm s i wsp. (17, 18) potwierdzili te obserwacje. Stwierdzili oni, że po krótkiej inkubacji miozyny lub H-meromiozyny z ATP można stosując łagodne środki odbiałczające uzyskać białko zawierające ortofosforan rozpuszczalny w kwasie trójchlorooctowym lub nadchlorowym. Zgodnie z opracowaną metodyką (102) uznano, że ortofosforan ten jest związany z białkiem. W miarę trwania hydrolizy enzymatycznej ATP ilość związanego ortofosforanu stopniowo malała, a po inkubacji nieorganicznego ortofosforanu z miozyną w nieobecności ATP ilość związanego ortofosforanu była znacznie mniejsza niż po krótkiej inkubacji enzymu z ATP. Obserwacje te nie dowodzą jednak wystarczająco, że fosfomiozyna jest produktem przejściowym w reakcji hydrolizy. Sam fakt wiązania ortofosforanu przez miozynę nie jest zjawiskiem specyficznym, gdyż inne nieczynne enzymatycznie białka jak kazeina czy albumina surowicy również w większym lub mniejszym stopniu mają tę zdolność (31, 32). Natomiast specyficzny wpływ ATP na ten proces można przypisać wywoływaniu zmian w konfiguracji miozyny, w wyniku których rośnie powinowactwo tego białka do nieorganicznego ortofosforanu (42).

Zastosowanie [^{32}P]ATP lub [^{32}P]ortofosforanu dla wyjaśnienia pochodzenia ortofosforanu wiążącego się z miozyną w czasie hydrolizy ATP dało sprzeczne wyniki. Z doświadczeń Gergely i Maruyamy (42) wynikało, że radioaktywność właściwa ortofosforanu związanego z miozyną jest taka sama jak ortofosforanu wolnego, co przemawia przeciwko koncepcji produktu przejściowego. Natomiast inni autorzy stwierdzili, że w pierwszych minutach po rozpoczęciu reakcji około 80%—90% związanego ortofosforanu pochodzi bezpośrednio z ATP (51, 52, 53, 54) oraz, że miozyna wiąże oprócz ortofosforanu również pewną ilość ADP (53). Wiązanie się ADP z H-meromiozyną w czasie hydrolizy ATP wykazali uprzednio Burton i wsp. (22). Negatywny wynik Gergely i Maruyamy (42) mógł być spowodowany warunkami, w których prowadzili oni doświadczenia (zbyt długi okres inkubacji oraz niewystarczające odmycie ortofosforanu zaadsorbowanego na osadzie białkowym).

Zjawisko powstawania ufosforylowanego enzymu jako przejściowego produktu hydrolizy ATP stwierdzono również dla ATP-azy aktywowanej jonami sodu i potasu (25, 36, 59, 111) i wykazano, że jednym z produktów kwaśnej hydrolizy tej ATP-azy jest fosfoseryna (1). Wyczerpujące blokowanie grup -SH miozyny przy pomocy PCMB lub CuSO_4 nie wpływa na ilość wiążącego się z białkiem ortofosforanu pochodzącego bezpośrednio z ATP (53). Również „6 S-S miozyna” (sześć grup -SH miozyny zablokowane przez HEDD) pomimo całkowitej utraty aktywności ATP-azy w nieobecności kationów dwuwartościowych zachowuje w pełni zdolność do wiązania zarówno ortofosforanu jak i ADP, pochodzących bezpośrednio z ATP (55). Niedawno stwierdzono też, że pełne zahamo-

wanie odczynnikami na grupy -SH enzymatycznej aktywności ATP-azy aktywowanej jonami Na i K nie wpływa na ilość powstającego fosfoenzymu (110).

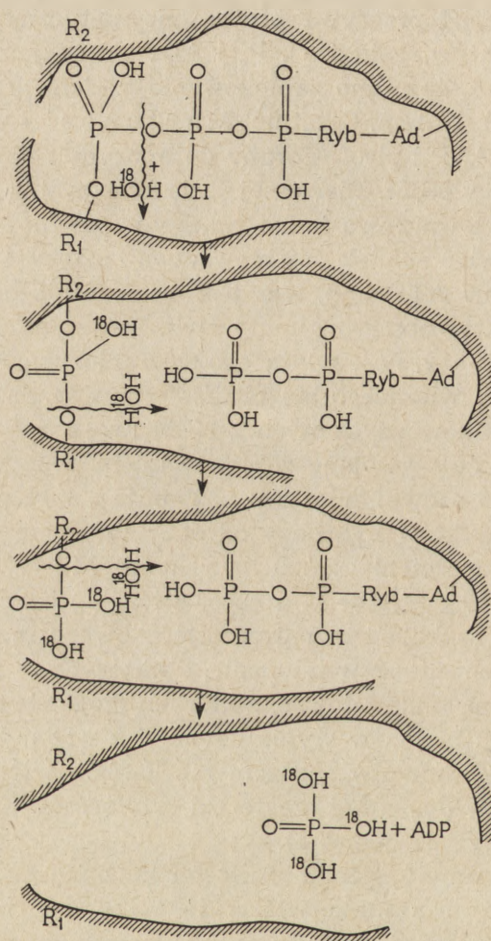
Na pozór paradoksalne zjawisko wiązania przez miozynę produktów hydrolizy ATP przy pełnym zahamowaniu jej zdolności do tejże hydrolizy możnaby tłumaczyć przyjmując, że „6 S-S-miozyna” zdolna jest do spowodowania jakby jednorazowej hydrolizy substratu oraz, że zablokowanie sześciu grup SH przerywa proces enzymatyczny przed odłączeniem się obu produktów reakcji, tj. P_n i ADP od enzymu. Interpretacja taka zakłada również, że mimo zablokowania sześciu grup SH miozyna może łączyć się z substratem. Ostatnio Martonosi i wsp. (91, 92) badali powinowactwo ATP i pirofosforanu do miozyny rodzimej i zmodyfikowanej przy pomocy NEM. Pierwszej fazie blokowania grup-SH (aktywacja ATP-azy) nie towarzyszą żadne zmiany w powinowactwie miozyny do ATP lub PP; pewien spadek powinowactwa następuje dopiero w drugiej fazie (hamowanie ATP-azy), lecz jest on znacznie opóźniony w stosunku do spadku aktywności enzymatycznej. Nawet po praktycznie pełnej inaktywacji ATP-azy, ilość wiążącego się z miozyną ATP spada tylko o 30—40%, ilość zaś wiążącego się pirofosforanu spada o niecałe 20%.

Przeniesienie wyników uzyskanych z NEM na „6 S-S miozynę” przemawia za hipotezą, że wywołane zablokowaniem grup -SH zahamowanie aktywności ATP-azowej miozyny następuje na etapie poprzedzającym odłączenie produktów hydrolizy od enzymu. Przyjęcie tej hipotezy pociąga za sobą uzupełnienie łańcucha reakcji: $M + ATP \rightarrow M-ATP \rightarrow M_P^{ADP} \rightarrow M + ADP + P_n$ (gdzie M oznacza miozynę) jeszcze jednym ogniwem, a mianowicie reakcją wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia ADP i ortofosforanu z tych miejsc w miozynie, do których te grupy początkowo się przyłączyły, na takie miejsca, z których mogą się one samorzutnie i szybko odłączyć od białka w wyniku reakcji z wodą. Założenie istnienia tego ogniwka wyjaśniałoby zarazem mechanizm włączania aż trzech atomów tlenu z wody do jednej cząsteczki ortofosforanu, odszczepianego przez miozynę od ATP (schemat 1).

Jak widać ze schematu, istnienie ufosforylowanej miozyny jako produktu przejściowego uzasadnia włączenie tylko dwóch atomów tlenu z wody do ortofosforanu, przeniesienie ortofosforanu w cząsteczce miozyny z R_1 na R_2 wyjaśnia włączenie trzeciego atomu. Nie jest wykluczone, że grupa ortofosforanowa (lub cała cząsteczka ATP) może reagować jednocześnie z grupami R_1 i R_2 , a powstawaniu mostka między dwiema strefami w cząsteczce miozyny mogłyby towarzyszyć zmiany w jej konfiguracji, leżące być może u podstaw skurczu mięśniowego.

Wiązanie się ADP z miozyną wyjaśniałoby też, dlaczego nieznaczna modyfikacja miozyny pod wpływem różnorodnych odczynników aktywuje, dalsza modyfikacja natomiast hamuje hydrolizę ATP. Konfiguracja rodzimej miozyny umożliwia wiązanie nukleotydu poprzez jego gru-

pę 6-NH₂, przy czym po odszczepieniu P, ADP byłoby trwale związane z miozyną niż ortofosforan. Czynnikiem ograniczającym szybkość hydrolizy ATP przez rodzimą miozynę byłyby zatem reakcja uwolnienia enzymu od ADP. Hamowanie ATP-azy miozyny jonami magnezu, oraz pessimum przy pH 7,5 tłumaczyłoby się spadkiem szybkości odłączania ADP w tych warunkach.



Schemat 1. Mechanizm działania ATP-azy miozynowej

Niewielka natomiast modyfikacja struktury miozyny uniemożliwiłaby powstanie wiązania poprzez 6-NH₂, tak że ADP byłoby połączone z miozyną bardziej labilnym wiązaniem charakterystycznym dla 6-OH nukleotydów. Czynnikiem ograniczającym szybkość reakcji byłoby wówczas uwolnienie miozyny od stosunkowo słabo związanego ortofosforanu; stąd zmiana charakterystyki enzymatycznej aktywności.

Stopniowa zmiana konfiguracji miozyny w miarę dalszej modyfikacji, uniemożliwiałaby reagowanie ortofosforanu z hipotetyczną grupą R_2 (schemat 1), katalizującą jego odłączanie od enzymu. W wyniku tego miałyby stopniowo aktywność enzymatyczna miozyny. Po zablokowaniu sześciu grup -SH reakcja przebiegałaby po skróconym torze; reszta ortofosforanowa odłączałaby się z miejsca R_1 , nie przechodząc przez etap przyłączenia do miejsca R_2 . Własności ATP-azowe „6 S-S miozyny” polegałyby właśnie na reakcji hydrolizy wiązania R_1 —P. Charakterystyczna dla tej hydrolizy jest nieodzowność jonów wapnia lub magnezu, oraz jednakowy aktywujący efekt obu jonów i znaczny wzrost K_m (69).

LITERATURA

1. Ahmed K., Judah J. D., *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 112 (1965).
2. Asai H., Morales M. F., *Biochem.* **4**, 830 (1965).
3. Azuma N., Ikehara M., Ohtsuka E., Tonomura Y., *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 104 (1962).
4. Azuma N., Tonomura Y., *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 499 (1963).
5. Bailey K., Perry S. V., *Biochim. Biophys. Acta* **1**, 506 (1947).
6. Bárány M., Bárány K., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 293 (1959).
7. Bendall J. R., *Biochem. J.* **81**, 520 (1961).
8. Bitny-Szlachto S., Gruda J., Kąkol I., Materiały I Krajowego Kongresu Biochemii, str. 16, Łódź (1963).
9. Blum J. J., Felauer E., *Arch. Biochem. Biophys.* **81**, 285 (1959).
10. Blum J. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **87**, 104 (1960).
11. Blum J. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 309 (1962).
12. Blum J. J., Sanadi D. R., *J. Biol. Chem.* **239**, 452 (1964).
13. Blum J. J., Sanadi D. R., *J. Biol. Chem.* **239**, 455 (1964).
14. Bowen W. J., Kerwin T. D., *J. Biol. Chem.* **211**, 237 (1954).
15. Bowen W. J., Stewart L. C., Martin H. L., *J. Biol. Chem.* **238**, 2926 (1963).
16. Boyer P. D., w *Biochemistry of Muscle Contraction*, wyd. J. Gergely, str. 94, Little, Brown and Co, Boston (1964).
17. Brahms J., Kąkol I., *Acta Biol. Exper.* **18**, 195 (1958).
18. Brahms J., Rżysko Cz., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 287 (1959).
19. Brahms J., Kay C., *J. Biol. Chem.* **237**, 3449 (1962).
20. Buchtal F., Deutsch A., Knappeis G. G., Munchen-Petersen A., *Acta Physiol. Scand.* **16**, 324 (1949).
21. Burley R. W., Jackson W. J. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **110**, 438 (1965).
22. Burton P., Lowenstein J. M., *Biochem. J.* **90**, 7c (1964).
23. Cain D. F., Davies R. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 361 (1962).
24. Chappell J. B., Perry S. V., *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 171 (1955).
25. Charnock J. S., Rosenthal R. L., *Fed. Proc.* **22**, 212 (1963).
26. Cohn M., Meek G. A., *Biochem. J.*, **66**, 128 (1957).
27. Davies R. E., *Nature* **199**, 1068 (1963).
28. Davies R. E., Cain D. F., Infante A. A., Klaupiks D., Eaton W. A., w *Biochemistry of Muscle Contraction*, wyd. J. Gergely, str. 463, Little, Brown and Co, Boston (1964).
29. Dempsey M. E., Boyer P. D., *J. Biol. Chem.* **236**, PC 6 (1961).

30. Dempsey M. E., Boyer P. D., Benson E. S., *J. Biol. Chem.* **238**, 2708 (1963).
31. Drabikowski W., *Acta Biol. Exper.* **18**, 223 (1958).
32. Drabikowski W., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 127 (1960).
33. Ebashi F., *J. Biochem. (Tokyo)* **50**, 77 (1961).
34. Ebashi S., Ebashi F., *J. Biochem. (Tokyo)* **46**, 1255 (1959).
35. Engelhardt W. A., Ljubimova M. N., *Nature* **144**, 668 (1939).
36. Fahn S., Albers R. W., Koval G. J., *Fed. Proc.* **22**, 213 (1963).
37. Fleckenstein A., Janke J., Davies R. E., Krebs H. A., *Nature* **174**, 1081 (1954).
38. Fluharty A., Sanadi D. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 164 (1962).
39. Friess E. F., Morales M. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **56**, 326 (1955).
40. Gaetjens E., Therattil-Antony T., Bárány M., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 554 (1964).
41. Gergely J., Martonosi A., Gouvea M. A., w Sulfur in proteins, wyd. R. Benesch, R. Benesch, P. D. Boyer, J. M. Klotz, W. R. Middlebrock, A. G. Szent-Györgyi, str. 297, Acad. Press New York (1959).
42. Gergely J., Maruyama K., *J. Biol. Chem.* **235**, 3174 (1960).
43. Gilmour D., Griffiths M., *Arch. Biochem. Biophys.* **72**, 302 (1957).
44. Gilmour D., Gellert M., *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 605 (1961).
45. Gołowin B. P., *Biokhimija* **16**, 156 (1951).
46. Greville G. D., Needham D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 284 (1955).
47. Greville G. D., Reich E., *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 653 (1956).
48. Gröschel-Stewart U., Turbe F., *Biochem. Z.* **337**, 104 (1963).
49. Gröschel-Stewart U., Turbe F., *Biochem. Z.* **337**, 109 (1963).
50. Gröschel-Stewart U., Rüdiger H., Turbe F., *Biochem. Z.* **339**, 539 (1964).
51. Gruda J., Kąkol I., Rżysko Cz., *Bull. Acad. Polon. Sci. Biol.* **8**, 129 (1960).
52. Gruda J., Kąkol I., Rżysko Cz., Niemierko W., *V Intern. Congr. Biochem.* **10**, 19 1417 (1961).
53. Gruda J., Kąkol I., Niemierko W., *Acta Biochim. Polon.* **9**, 215 (1962).
54. Gruda J., Kąkol I., Niemierko W., w Streszczeniu doniesień II Krajowego Sympozjum naukowego z zakresu stosowania izotopów promieniotwórczych w biologii i med., str. 26, Gdańsk 1962.
55. Gruda J., Kąkol I., w przygotowaniu do druku.
56. Hasselbach W., Weber A., *Pharmacol. Rev.* **7**, 97 (1955).
57. Hasselbach W., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 365 (1957).
58. Hasselbach W., *Acta Biol. Med. German.* **2**, 18 (1959).
59. Heinz E., Hoffman J. F., *Fed. Proc.* **22**, 212 (1963).
60. Hotta K., Kojima S., *J. Biochem. (Tokyo)* **55**, 486 (1964).
61. Ikehara M., Ohtsuka E., Kitagawa S., Yagi K., Tonomura Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2679 (1961).
62. Ikehara M., Ohtsuka E., Kitagawa S., Tonomura Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 74 (1964).
63. Ikehara M., Ohtsuka E., Uno H., Imamura K., *Biochim. Biophys. Acta* **100**, 471 (1965).
64. Iyengar M. R., Glauser S. C., Davies R. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 379 (1964).
65. Kasuya M., Takashina H., *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 452 (1965).
66. Kay C. M., Brahms J., *J. Biol. Chem.* **238**, 2945 (1963).

67. Kąkol I., Gruda J., Bitny-Szlachto S., *Acta Biochim. Polon.* **11**, 411 (1964).
68. Kąkol I., Bitny-Szlachto S., Gruda J., *Materiały I Krajowego Kongresu Biochemii*, str. 15, Łódź 1963.
69. Kąkol I., Gruda J., w *przygotowaniu do druku*.
70. Kielley W. W., Brandley L. B., *J. Biol. Chem.* **218**, 653 (1956).
71. Kielley W. W., Kalckar H. M., Bradley L. B., *J. Biol. Chem.* **219**, 95 (1956).
72. Kielley W. W., Harrington W. F., *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 401 (1960).
73. Kielley W. W., *Ann. Rev. Biochem.* **33**, 403 (1964).
74. Kitagawa S., Yoshimura J., Tonomura Y., *J. Biol. Chem.* **236**, 902 (1961).
75. Kitagawa S., Tonomura Y., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 416 (1962).
76. Kitagawa S., Chiang K. K., Tonomura Y., *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 83 (1964).
77. Kominz D. R., Hough A., Symonds P., Laki K., *Arch. Biochem. Biophys.* **50**, 148 (1954).
- 77a. Kominz D. R., *Science* **149**, 1374 (1965).
78. Koshland D. E., Budenstein Z., Kowalsky A., *J. Biol. Chem.* **205**, 917 (1953).
79. Koshland D. E., *Adv. Enzym.* **22**, 45 (1960).
80. Koshland D. E., Levy H. M., w *Biochemistry of Muscle Contraction*, wyd. J. Gergely, str. 87, Little, Brown and Co. Boston 1964.
81. Kotahi A., Harada M., Yagi K., *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 553 (1964).
82. Kubo S., Tokura S., Tonomura Y., *J. Biol. Chem.* **235**, 2835 (1960).
83. Levy H. M., Koshland D. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3164 (1958).
84. Levy H. M., Sharon N., Koshland D. E., *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 288 (1959).
85. Levy H. M., Koshland D. E., *J. Biol. Chem.* **234**, 1102 (1959).
86. Levy H. M., Sharon N., Lindeman E., Koshland D. E., *J. Biol. Chem.* **235**, 2628 (1960).
87. Levy H. M., Ryan E. M., *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 193 (1961).
88. Levy H. M., Sharon N., Ryan E. M., Koshland D. E., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 118 (1962).
89. Levy H. M., Ryan E. M., Springhorn S. S., Koshland D. E., *J. Biol. Chem.* **237**, PC 1730 (1962).
90. Levy H. M., Leber P. D., Ryan E. M., *J. Biol. Chem.* **238**, 3654 (1963).
91. Martonosi A., Meyer H., *J. Biol. Chem.* **239**, 640 (1964).
92. Martonosi A., Meyer H., w *Biochemistry of Muscle Contraction*, wyd. J. Gergely, str. 59, Little, Brown and Co. Boston 1964.
93. Mommaerts W. F. H. M., *Nature* **174**, 1083 (1954).
94. Mommaerts W. F. H. M., Seraydarian K., Wallner A., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 75 (1962).
95. Mommaerts W. F. H. M., w *Biochemistry of Muscle Contraction*, wyd. J. Gergely, str. 456, Little, Brown and Co. Boston 1964.
96. Moos C., Alpert N. R., Mayers T. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 183 (1960).
97. Morales M. F., Hotta K., *J. Biol. Chem.* **235**, 1979 (1960).
98. Mühlrad A., *Biochim. Biophys. Acta*, w druku.
99. Nanninga L. B., Mommaerts W. F. H. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **46**, 1155 (1960).

100. Nanninga L. B., Mommaerts W. F. H. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **46**, 1166 (1960).
101. Nanninga L. B., *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 112 (1962).
102. Niemierko W., Drabikowski W., Dydyńska M., Kąkol I., Zaluska H., *Acta Biol. Exper.* **17**, 374 (1957).
103. Niemierko W., Dydyńska M., Gruda J., Kąkol I., Rżysko Cz., Strzelecka-Golaszewska H., II Celostatni Biochemicki Zjazd, Praha 1960.
104. Niemierko W., Gruda J., Kąkol I., Symposium on the effect of use and disuse on neuromuscular function, str. 30, Libice 1962.
105. Nihei T., Tonomura Y., *J. Biochem. (Tokyo)* **46**, 305 (1959).
106. Offer G. W., *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 566 (1964).
107. Quellet L., Laidler K. J., Morales M. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **39**, 37 (1952).
108. Pelletier G. E., Quellet L., *Can. J. Chem.* **39**, 1444 (1961).
109. Perry S. V., Chappell J. B., *Biochem. J.* **65**, 469 (1957).
110. Rendi R., *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 564 (1965).
111. Rose S. P. R., *Nature* **199**, 375 (1963).
112. Sekine T., Barnett L. M., Kielley W. W., *J. Biol. Chem.* **237**, 2769 (1962).
113. Sekine T., Yamaguchi M., *J. Biochem. (Tokyo)* **54**, 196 (1963).
114. Sekine T., Kielley W. W., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 336 (1964).
115. Sekiya K., Mii S., Tonomura Y., *J. Biochem. (Tokyo)* **57**, 192 (1965).
116. Singer T. P., Barron E. S., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **56**, 129 (1944).
117. Singh I., Sarma T. J., *Proc. Indian Ac. Sci. B.* **52**, 43 (1960).
118. Stracher A., Chan P. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 435 (1961).
119. Stracher A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **13**, 279 (1963).
120. Stracher A., Chan P. C., w *Biochemistry of Muscle Contraction*, wyd. J. Gergely, str. 106, Little, Brown and Co. Boston 1964.
121. Stracher A., *J. Biol. Chem.*, **239**, 1118 (1964).
122. Stracher A., *J. Biol. Chem.* **240**, PC 298 (1965).
123. Swanson J. R., Yount R. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 765 (1965).
124. Szabolcs M., Zsindely A., Damjanovick S., *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 447 (1964).
125. Szent-Györgyi A. G., Benesh R. E., Benesh R., w *Sulfur in Proteins*, wyd. R. Benesh, R. E. Benesh, P. D. Boyer, J. M. Klotz, W. R. Middlebrook, A. G. Szent-Györgyi str. 291, Acad Press New York 1959.
126. Szörenyi E. T., Chepinoga O. P., *Ukr. Biochim. J.* **18**, 159 (1946).
127. Tonomura Y., Kitagawa S., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 15 (1957).
128. Tonomura Y., Kitagawa S., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 135 (1960).
129. Tonomura Y., Furuya K., *J. Biochem. (Tokyo)* **48**, 899 (1960).
130. Tonomura Y., Yoshimura J., Kitagawa S., *J. Biol. Chem.* **236**, 1968 (1961).
131. Tonomura Y., Kitagawa S., Yoshimura J., *J. Biol. Chem.* **237**, 3660 (1962).
132. Tonomura Y., Sekiya K., Imamura K., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 296 (1963).
133. Tonomura Y., Sekiya K., Imamura K., Tokiwa T., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 305 (1963).
134. Tonomura Y., Sekiya K., Imamura K., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 690 (1963).

135. Tonomura Y., Yoshimura J., Ohnishi T., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 698 (1963).
136. Tonomura Y., Kanazawa T., Sekiya K., *An. Rep. Sci. Works Fac. Sci. Osaka Univ.* **12**, 1 (1964).
137. Ulbrecht G., Ulbrecht M., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 100 (1957).
138. Ulbrecht G., Ulbrecht M., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 110 (1957).
139. Ulbrecht M., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 438 (1962).
140. Watanabe S., Tonomura Y., Shiokawa H., *J. Biochem. (Tokyo)* **40**, 387 (1953).
141. Weber H. H., Hasselbach W., *Biochim. Biophys. Acta* **15**, 237 (1954).
142. Weber H. H., *The motility of muscle and cells*, Harvard. Univ. Press, Cambridge Massachusetts, 1958.
143. Yamashita T., Soma Y., Kobayashi S., Sekine T., Titani K., Narita K., *J. Biochem. (Tokyo)* **55**, 576 (1964).
144. Yamashita T., Soma Y., Kobayashi S., Sekine T., *J. Biochem. (Tokyo)* **57**, 460 (1965).
145. Yount R. G., Koshland D. E., *J. Biol. Chem.* **238**, 1708 (1963).

Obrady Komitetu Wykonawczego Comité International de Photobiologie (C.I.P.)

W dniu 26 czerwca 1966 roku odbyło się w *Cortinie D'Ampezzo* przy okazji III Międzynarodowego Kongresu Badań Radiacyjnych kolejne posiedzenie Komitetu Wykonawczego C.I.P. z udziałem delegatów narodowych komitetów fotobiologicznych. W obradach uczestniczyli ze strony polskiej prof. dr *D. Shugar*, v-przewodniczący C.I.P. oraz doc. dr *K. L. Wierzchowski* jako delegat sekcji fotobiologicznej P.T. Bioch. Na posiedzeniu tym sekcja fotobiologiczna PTBioch została oficjalnie afiliowana przy C.I.P. Dokonano również wyboru kilku nowych członków Komitetu Wykonawczego na lata 1966—1970. Wybrani zostali prof. *G. O. Schenck* (NRF), prof. *L. R. Caldas* (Brazylia) dr *Maria Draculić* (Jugosławia), prof. *G. Porter* (Anglia) oraz dr *K. C. Smith* (USA). Głównym tematem obrad Komitetu była dyskusja programu naukowego piątego Międzynarodowego Kongresu Fotobiologicznego, który odbędzie się w sierpniu 1968 roku w Dartmouth College, Stan New Hampshire, USA.

ALINA JOANNA HŁYŃCZAK *, JÓZEF SYSA **

Związki fosforanowe krwinek czerwonych człowieka i zwierząt

Phosphate Compounds of Human and Animal Erythrocytes

The phosphate compounds contained in human and animal red blood cells are reviewed and the data obtained by different authors and by different methods, are compared.

Krwinka czerwona stanowi stosunkowo dogodny model do niektórych badań, toteż zestawienie danych o jakościowym oraz ilościowym składzie związków fosforowych w krwinkach różnych zwierząt wydaje się przydatne. Krwinki różnych zwierząt mimo podobieństwa budowy i pełnionych funkcji różnią się jednak stężeniem i przemianą związków fosforowych. Uwzględnienie tych osobliwości jest konieczne w pewnych pracach doświadczalnych na zwierzętach. Ponadto badania nad fosforanami, a zwłaszcza nukleotydami krwinek czerwonych rzucają pewne światło nie tylko na przemianę tych związków w samej krwince, ale i na ich metabolizm w innych komórkach ustroju.

Już w roku 1914 Bass (8) stwierdził, że nukleotydy występują tylko wewnątrz krwinek, brak ich natomiast w osoczu. Dane te potwierdził Bishop (9), który szukając nukleotydów w osoczu stwierdził chromatograficznie obecność dwóch substancji: kwasu moczowego oraz związku, który nie był pochodną puryny ani pirymidyny.

Początkowo oznaczano tylko sumę adeniny, co mogło dać jedynie ogólny pogląd na intensywność przemian w krwince czerwonej (8, 11, 46). Dopiero bardziej dokładna i selektywna analiza enzymatyczna (15, 40, 41, 42, 43, 62), a szczególnie zastosowanie chromatografii kolumnowej (3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 38, 51, 53, 55, 63) pozwoliły dokładniej badać niektóre procesy metaboliczne krwinki czerwonej.

Z procesami glikolizy i cyklu pentozowego przebiegającymi w krwinkach czerwonych wiąże się nagromadzenie w tych komórkach niektórych nukleotydów, jak np. ATP, NAD, NADP.

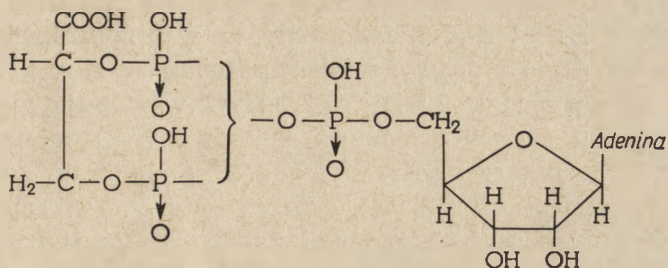
Wiadomo, że ATP i ADP wywierają wpływ regulujący na glikolizę. ATP bierze udział także w aktywacji aminokwasów (12, 57), w syntezie peptydów i białek oraz w syntezie wielocukrów (18) i mocznika (14)

* Dr, adiunkt Katedry Fizjologii WAM, Łódź.

** Doc. dr med., szef Katedry Fizjologii WAM, Łódź.

Uczeni japońscy przeprowadzili dokładną analizę i dokonali syntezy AXP (28, 29, 30, 31, 32). Według nich związek ten występuje u tych zwierząt, których krwinki czerwone zawierają dużą ilość DPG.

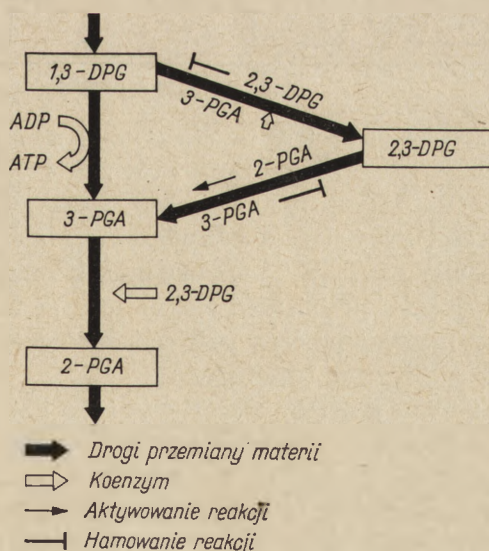
Oprócz pochodnych adeniny w krwinkach czerwonych znaleziono także nukleotydy guaniny, cytozyny i uracylu.



Schemat 2. Budowa kwasu adenylo-2,3-dwufosfoglicerolowego (wg 26)
Klamra we wzorze oznacza dwie możliwe pozycje przyłączenia.

Dzięki zastosowaniu chromatografii jonowymiennej, we frakcji kwasorozpuszczalnej z krwinek czerwonych wykryto mono- i dwufosforany heksoz, monofosforany pentoz, oraz mono- i dwufosforany trioz, a także 1,3- i 2,3-DPG. Cykl przemian pochodnych fosforowych kwasu glicerolowego przedstawiony na schemacie 3 (57) ma duże znaczenie w metabolizmie krwinki.

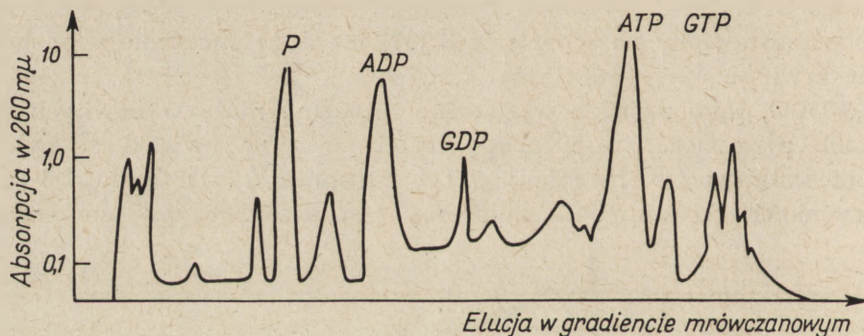
1,3-DPG, jako związek wysokoenergetyczny, może w pewnych warunkach przerzucać swoją grupę fosforanową na związki adenyłowe współuczestnicząc w tworzeniu ATP. Stosunek 1,3-DPG do 2,3-DPG w krwinkach czerwonych regulowany jest przez obecny tam enzym,



Schemat 3. Cykl kwasu glicerolowego (wg 57)

dwufosfogliceromutazę, toteż zużywanie 1,3-DPG w reakcji, w której jest on dawcą reszty fosforanowej, spowoduje obniżenie poziomu 2,3-DPG. O możliwości tego rodzaju przemian świadczą obserwacje R o h d e w a l d i W e b e r (59, 60), że krwinki czerwone dzieci zawierają więcej ATP i odpowiednio mniej 2,3-DPG niż krwinki dorosłych; zwiększenie zawartości ATP zachodzi przypuszczalnie kosztem 2,3-DPG. Podobnie H ł y ń c z a k i L e y k o (34) stwierdziły, że w przypadkach methemoglobinemii równolegle z podwyższeniem poziomu ATP w krwince czerwonej, występuje spadek 2,3-DPG. 2,3-DPG występuje w krwinkach czerwonych wielu ssaków i stanowi około połowy wszystkich estrów fosforanowych rozpuszczalnych w kwasach (58); brak go natomiast w krwinkach czerwonych (32, 61), a także innych tkankach (68) była i owiec oraz w erytrocytach gadów i ptaków, gdzie jego odpowiednikiem jest kwas fitynowy (68).

Wyżej omówione związki fosforowe znaleziono także w otoczce krwinki czerwonej. Po rozdzieleniu na kolumnie jonowymiennej frakcji kwasorozpuszczalnej z otoczki krwinki otrzymujemy chromatogram zbliżony do chromatogramu związków fosforanowych krwinek czerwonych (rysunek 1 i 2) (61).



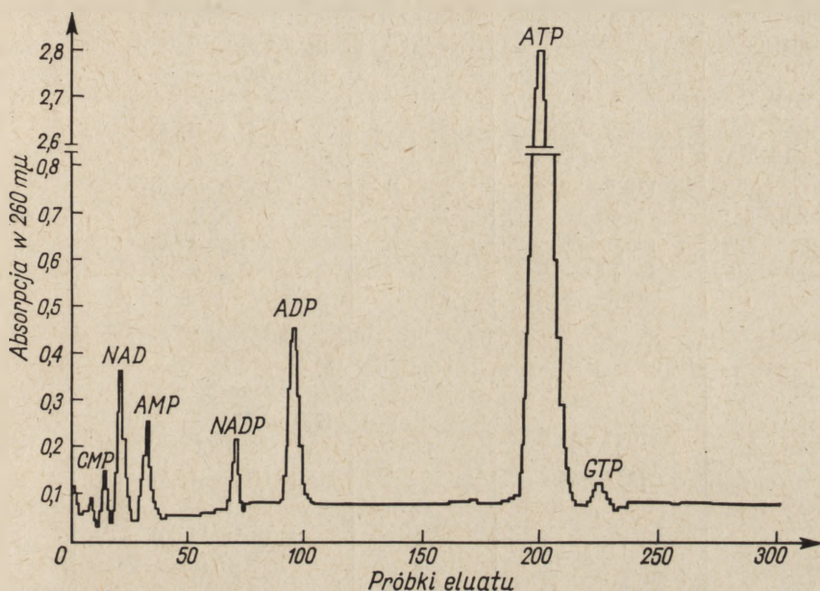
Rys. 1. Kwasorozpuszczalne nukleotydy z inkubowanej mieszaniny [^{32}P] lipoproteidów ekstrahowanych z cieni 600 ml krwinek czerwonych człowieka (wg 61)

Porównanie jakościowe i ilościowe związków fosforanowych, zwłaszcza nukleotydów, występujących w krwinkach czerwonych różnych zwierząt laboratoryjnych, przedstawiono w formie tablic (tablica 1, 2 i 3). Zebrano dane uzyskane przez różnych autorów, którzy niejednokrotnie posługiwali się różnymi metodami.

I tak np. D e n n e m a n n (15) oraz R o t t i n o i w s p. (62) (tablica 2) stosowali w swoich badaniach metodę enzymatyczną, inni natomiast — metodę chromatografii kolumnowej. Zaczepnięte z piśmiennictwa wartości były podawane w różnych jednostkach, to też dla ujednolicenia w niektórych wypadkach, przeliczono je umieszczając znak ~, o ile nie była znana liczba hematokrytowa (2). Niewielkie różnice w stężeniach

poszczególnych związków u tego samego zwierzęcia występują prawdopodobnie wskutek stosowania przez autorów różnych metod.

Analiza tych danych nasuwa myśl, że pod względem zawartości związków fosforowych krwinka czerwona człowieka jest najbardziej zbliżona do krwinki królika. Krwinka królika jest niejako modelem ludzkiej krwinki czerwonej (7).



Rys. 2. Kwasorozpuszczalne nukleotydy z krwinek czerwonych człowieka (wg 61)

Ilości ATP w krwince są różne w zależności od gatunku zwierzęcia, a nawet różnią się nieco w ramach tego samego gatunku (15, 54). Wydaje się, że w zależności od stężenia ATP w krwinkach czerwonych, badane zwierzęta można podzielić na dwie grupy. W jednej grupie poziom ATP w erytrocytach wynosi ok $1\mu\text{M}/1\text{ ml}$ krwinek czerwonych, u drugiej zaś — ok. $0,5\mu\text{M}/1\text{ ml}$ krwinek czerwonych. Do pierwszej grupy zaliczyć można królika i człowieka, do drugiej — kota, psa i świnkę morską. Należy jednak zaznaczyć, że K a r o ń (44) podaje dla ATP krwinek królika wartość ok. $0,5\mu\text{M}/1\text{ ml}$ krwinek czerwonych. Wartości dla ATP w krwinkach czerwonych psa podane przez K a r o ń (44) są natomiast dużo wyższe, aniżeli u innych autorów. Można by to tłumaczyć stosowaniem metod lub użyciem do doświadczeń różnych ras zwierząt.

Zwraca uwagę fakt, że w krwinkach czerwonych psa i kota należących do grupy o niższym stężeniu ATP w stosunkowo dużych ilościach występuje Na^+ . Niższy poziom ATP może być związany z aktywnym transportem jonów. W krwinkach czerwonych psa stosunek $\text{K}^+/\text{Na}^+ = 0,08$, podczas gdy u człowieka stosunek ten wynosi 9,1 (13). F r a s i e r

Tablica 1

Zawartość adeniny we krwi różnych zwierząt wg Buella i Perkinsa
(11) (w mg/100 ml)

	♂		♀	
	średnia (wartości skrajne)	ilość oznaczeń	średnia (wartości skrajne)	ilość oznaczeń
Szczur			8,4 (śr. z 4 ozn.) (6,5—9,0)	
Kurczę	15,0	1	10 (7,5—12,5)	2
Kaczka	32,3 (32,5—32,0)	2	33,5 (32,0—35,0)	2
Gołąb	60,5 (55,0—85,0)	4	70,8 (64,0—84,0)	4
Żółw wodny	28,5 (25,0—32,0)	2	36,0	1
Świnia			30,3 (śr. z 11 ozn.) (24,5—36,0)	
Wół			2,8 (śr. z 4 ozn.) (2,0—3,5)	
Człowiek	19,7 (15,5—30)	11	14,3 (10,5—19,5)	6
Kot	7,5	1	10,8 (8,5—13,00)	2
Pies	9,9 (7—16)	5	8,0	1
Królik	8,5	1	8,5	1
Świnka morska			10,5 (1 ozn.)	

i wsp. (19a) wykazali, że transport K^+ do wnętrza krwinki u człowieka jest niezależny od stężenia K^+ w środowisku zewnętrznym i odbywa się z natężeniem w przybliżeniu siedemnaście razy większym, aniżeli w krwinkach psa. Natężenie aktywnego transportu Na^+ w krwinkach psa jest również odpowiednio mniejsze niż w krwinkach czerwonych człowieka, ponieważ na miejsce jednego jonu K^+ może wchodzić jeden jon Na^+ (26). Zmniejszenie natężenia aktywnego transportu jonów K^+ i Na^+ w krwinkach czerwonych psa w porównaniu z krwinkami ludzkimi wymaga mniejszych wydatków energetycznych. Być może znajduje to swój wyraz w odpowiednio mniejszym gromadzeniu zapasów energii w postaci ATP.

Poziom ATP w krwinkach czerwonych zależy również od wieku. Według Rohdewald i Weber (59, 60) u dzieci występuje około 31% więcej ATP w krwinkach czerwonych niż u ludzi dorosłych. Natomiast Zachara, Kędziora i Leyko (67) wykazali u dzieci niższy poziom ATP w krwinkach czerwonych, wynoszący tylko 22%

Tablica 2

Zawartość związków fosforanowych w 1 ml krwinek czerwonych człowieka i królika
(zestawione wg 3, 9, 15, 17, 34, 36, 44, 49, 62 i 67)

	człowiek					królik		
	$\sigma^+ + \varphi$ $\mu\text{M P}$	μM	σ^+ μM	φ μM	dziecko (6—14 lat) μM	$\sigma^+ + \varphi$ μM	σ^+ μM	φ μM
AMP	0,01—0,02 (3)	0,01—0,02 (3) 0—0,018 (62)	0,013 (9)	0,012 (9)	0,063 (67)	0,044 ± 0,080 (44)		
ADP	0,38—0,49 (5)	0,052 (27) 0,19—0,25 (3) 0,21—0,0447 (49) 0—0,045 (62) 0,190 (27)	0,102 (9)	0,111 (9)	0,385 (67)	0,19 (34) 0,193 ± 0,041 (44)	0,187 (36)	0,187 (36)
ATP	2,7—3,7 (3)	0,90—1,23 (3) 0,92—0,203 (3) 0,036—1,140 (62) 1,09 (27)	0,922 (9)	1,011 (9)	1,33 (67)	1,28 (15) 1,00 (34) 0,499 ± 0,118 (44)	1,07 (36)	0,92 (36)
AXP		0,22 (49)				0,55 (34)	0,52 (36)	0,42 (36)
NAD		0,0645 (27)	0,064 (9)	0,077 (9)	0,0827 (67)			
NADP		0,0373 (27)	0,025 (9)	0,027 (9)	0,0832 (67)			
GMP	0,04—0,05 (3)					0,008 ± 0,003 (44) 0,029 ± 0,011 (44) 0,091 ± 0,026 (44) 0,024 ± 0,011 (44)		
GDP								
GTP		0,0404 (27)	0,052 (9)	0,063 (9)	0,0645 (67)			
UDP-Co								
Monofosfora- ny heksoz								
Glu-6-P	0,08—0,10 (3)					0,82 (34)		
Fru-6-P	0,01—0,02 (3)							

c.d. tablicy 2

	człowiek					królik		
	$\sigma' + \varnothing$ $\mu\text{M P}$	μM	σ' μM	\varnothing μM	dziecko (6—14 lat) μM	$\sigma' + \varnothing$ μM	σ' μM	\varnothing μM
Dwufosforany heksosy								
Glu-1,6-DP	0,38—0,47 (3)							
Fru-1,6-DP	0,12—0,24 (3)							
Rybózo-5-P	0,03 (3)					0,80 (34)		
Fosfor nieorganiczny	0,28—0,48 (3)					0,37 (34)		
kwasy mono- fosfoglicero- lowe	0,05—0,08 (3)							
2,3-DPG	7,2—10,2 (3)	6,66 (27)				11,8 (34)		

Ilość badanych osobników wynosiła: a) ludzie: dzieci — 6(67), kobiety — 8(9), mężczyźni — 10(9), dorośli obojga płci — 14(3), 4(27), 6(49) i 2(62)
b) króliki: samice — 12(36), samce — 12(36), obojga płci — 14(34), 18(44).

Tablica 3

Zawartość związków fosforanowych w 1 ml krwinek czerwonych
psa, kota, świnki morskiej (zestawione wg 13, 35, 37 i 44)

	Pies	Pies	Kot	Świnka morska
	$\mu\text{M P}$	μM	μM	μM
AMP	0,03—0,07 (13)	0,03—0,07 (13) 0,059 \pm 0,012 (44)		0,054 \pm 0,019 (44)
ADP	0,25—0,31 (13)	0,13—0,16 (13) 0,16 (35) 0,198 \pm 0,030 (44)	0,132 (37)	0,154 \pm 0,030 (44)
ATP	0,37—0,97 (13)	0,12—0,32 (13) 0,22 (35) 0,0524 \pm 0,064 (44)	0,434 (37)	0,487 \pm 0,087 (44)
AXP		0,17 (35)	0,271 (37)	
NAD	0,01 (13)			
NADP	0,07—0,11 (13)			
GMP		0,019 \pm 0,010 (44)		0,020 \pm 0,007 (44)
GDP		0,051 \pm 0,015 (44)		0,039 \pm 0,011 (44)
GTP	0,10—0,20 (13)	0,204 \pm 0,037 (44)		0,204 \pm 0,067 (44)
UDP-Co		0,022 \pm 0,007 (44)		0,042 \pm 0,013 (44)
UDPG	0,04 (13)			
Adenozynodwufosforan rybozy	0,04—0,01 (13)			
Mono fosforany heksoz	0,01—0,02 (13)	0,36 (35)		
Dwufosforany heksoz				
Glu-1,6-DP	0,08—0,22 (13)			
Fru-1,6-DP	0,11—0,18 (13)	0,30 (35)		
Fosfor nieorganiczny	0,20—0,35 (13)	0,19 (35)		
Trizofosforany	0,01 (13)			
Kwas fosfoenolopirogronowy	0,01 (13)			
Kwas monofosfoglicerolowy	0,07 (13)			
2,3-DPG	9,67—10,1 (13)	9,4 (35)		

U w a g a: Ilość badanych osobników wynosiła: psy — 3(13) i 6(44); koty — 8(37); świnki morskie — 37(44)

wartości znalezionych przez Gregera dla ludzi dorosłych (27). Dyskutowana jest także sprawa zawartości nukleotydów adeninowych u tego samego gatunku zwierzęcia w zależności od płci. Dane z piśmiennictwa są rozbieżne, niemniej jednak niektórzy autorzy sugerują, że w krwinkach czerwonych u samców poziom ATP jest wyższy (15, 36, 54). Związki fosforowe są niezmiernie labilne i ilość ich zmienia się w różnych stanach czynnościowych (17, 64, 50, 33). Poziom tych związków oscyluje jednak wokół pewnej średniej wartości i znaczniejsze jej przekroczenie *in plus*, jak i *in minus* świadczy o stanie chorobowym (19, 48, 53).

LITERATURA

1. Allik T. A., *Bull. Eksp. Biol. Med.* **4**, 39 (1965).
2. Barański S., Czerski P., Krzemińska-Ławkowicz I., Krzymowski T., Ławkowicz W., Układ krwiotwórczy zwierząt laboratoryjnych, PWN Warszawa 1962.
3. Bartlett G. R., *J. Biol. Chem.* **234**, 449 (1959).
4. Bartlett G. R., *J. Biol. Chem.* **234**, 459 (1959).
5. Bartlett G. R., *J. Biol. Chem.* **234**, 469 (1959).
6. Bartlett G. R., Barnett H. N., *J. Clin. Invest.* **39**, 56 (1960).
7. Bartlett G. R., Shafer A. W., *J. Clin. Invest.* **39**, 62 (1960).
8. Bass R., *Arch. Exper. Path. Pharmacol.* **76**, 40 (1914).
9. Bishop Ch., Rankine D. M., Talbott J. H., *J. Biol. Chem.* **234**, 1233 (1959).
10. Bock R. M., Ling N. S., Morel S. A., Lipton S. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 253 (1956).
11. Buell M. V., Perkins M. E., *J. Biol. Chem.* **76**, 95 (1928).
12. Cammarata P. S., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **187**, 439 (1950).
13. Chmiel J., PTPN XXII (1962).
14. Cohen P. P., Hayano M. J., *J. Biol. Chem.* **166**, 251 (1946).
15. Dennemann H., *Z. Ges. Exp. Med.* **134**, 335 (1961).
16. Donohue D. M., Finch C. A., Gabrio B. W., *J. Clin. Invest.* **35**, 562 (1956).
17. Eckert T., Mobus W., Hoppe-Seyler S., *Z. Physiol. Chem.* **38**, 3 (1964).
18. Florkin M., Mason H. S., *Comparative Biochemistry*, Academic Press New York, Londyn 1960.
19. Fox A. C., Wikler N. S., Reed G. E., *J. Clin. Invest.* **44**, 202 (1965).
- 19a. Frazier H. S., Sicular A., Solomon A. K., *J. Gen. Physiol.* **37**, 631 (1954).
20. Gabrio B. W., Donohue D. M., Finch C. A., *J. Clin. Invest.* **34**, 1509 (1955).
21. Gabrio B. W., Finch C. A., *J. Clin. Invest.* **33**, 242 (1954).
22. Gabrio B. W., Finch C. A., Huennekens F. M., *Blood* **11**, 10 (1956).
23. Gabrio B. W., Hennessey M., Thomasson J., Finch C. A., *J. Biol. Chem.* **215**, 357 (1955).
24. Gabrio B. W., Stevens A. R., Finch C. A., *J. Clin. Invest.* **33**, 247 (1954).
25. Gabrio B. W., Stevens A. R., Finch C. A., *J. Clin. Invest.* **33**, 252 (1954).
26. Glynn J. N., *J. Physiol.* **134**, 278 (1956).
27. Greger J., praca w przygotowaniu do druku.
28. Hashimoto T., *J. Biochem. (Tokyo)* **50**, 337 (1961).
29. Hashimoto T., Ishii Y., Tatibana M., Yoshikawa H., *J. Biochem. (Tokyo)* **50**, 471 (1961).

30. Hashimoto T., Tatibana M., Ishii Y., Yoshikawa H., *J. Biochem. (Tokyo)* **50**, 548 (1961).
31. Hashimoto T., Yoshikawa H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 71 (1961).
32. Hashimoto T., Yoshikawa H., *J. Biochem. (Tokyo)* **53**, 219 (1963).
33. Hillman H., Hyden H., *Histochemia* **4**, 446 (1965).
34. Hłyńczak A. J., Leyko W., *Biuletyn WAM* **8**, 109 (1965).
35. Hłyńczak A. J., Leyko W., *Biuletyn WAM* **8**, 215 (1965).
36. Hłyńczak A., Lipeccki L., Majewski W., Majewska A., *Biuletyn WAM* **7**, 97 (1964).
37. Hłyńczak A. J., Lipeccki L., Majewska A., Majewski W., Walecki J., *Biuletyn WAM* **7**, 537 (1964).
38. Hłyńczak A. J., Majewski W. A., *Biuletyn WAM* **6**, 171 (1963).
39. Hoffman J. F., *Fed. Proc.* **19**, 127 (1960).
40. Kalckar H. M., *J. Biol. Chem.* **167**, 429 (1947).
41. Kalckar H. M., *J. Biol. Chem.* **167**, 445 (1947).
42. Kalckar H. M., *J. Biol. Chem.* **167**, 461 (1947).
43. Kalckar H. M., *J. Biol. Chem.* **167**, 477 (1947).
44. Karoń H., *Bull. de la Soc. des Amis des Sciences et des Lettres de Poznań* **12**, 11 (1963).
45. Krawczyński J., *Post. Biochem.* **8**, 523 (1962).
46. Leyko W., Związki adeninowe krwi ludzkiej, *ŁTN* 1959.
47. Leyko W., *Post. Biochem.* **7**, 357 (1961).
48. Leyko W., *Post. Biochem.* **2**, 225 (1966).
49. Lorenc J., Leyko W., *Clin. Chim. Acta* **9**, 585 (1964).
50. Maréchal G., Le métabolisme de la phosphorylcréatine et de l'adénosine diphosphate durant la contraction musculaire. Edit. Arscia Paris Libraire Moloine 1964.
51. Mills G. C., Burger D. O., Schneider M., Levin W. C., *J. Lab. Clin. Med.* **58**, 725 (1961).
52. Mills G. C., Summers L. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 7 (1959).
53. Navón S., Agrest A., *Am. J. Physiol.* **205**, 957 (1963).
54. Overgård-Hansen K., Jorgensen S., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **12**, 10 (1960).
55. Öckerman P. A., *Biochim. Biophys. Acta* **74**, 588 (1963).
56. Post R. I., Merrit C. R., Kinsolving C. R., Albright C. D., *J. Biol. Chem.* **235**, 1796 (1960).
57. Rapoport S., *Folia Haematol.* **83**, 300 (1965).
58. Rapoport S., Guert G. M., *J. Biol. Chem.* **138**, 269 (1941).
59. Rohdewald M., Weber M., *Z. Physiol. Chem.* **311**, 239 (1958).
60. Rohdewald M., Weber M., *Z. Physiol. Chem.* **317**, 217 (1959).
61. Ronquist M., Ågren G., *Nature* **205**, 1021 (1965).
62. Rottino A., Hoffman G. T., Albaum H., *Blood* **7**, 836 (1952).
63. Sjöberg C. I., Ågren G., *Anal. Chem.* **36**, 1017 (1964).
64. Urivetzky M., Seifter S., Meilman E., *Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.)* **115**, 305 (1964).
65. Wada T., Takaku F., Nakao K., Nakao M., Nakao T., Yoshikawa H., *Proc. Jap. Acad.* **36**, 618 (1960).
66. Yoshikawa H., Nakao N., *Folia Haematol.* **78**, 248 (1961).
67. Zachara B., Kędziora J., Leyko W., praca przyjęta do druku w *Pediatrici Polskiej*.
68. Żelewski L., *Post. Biochem.* **6**, 409 (1960).

TADEUSZ MIKULSKI*

Widma absorpcyjne fotoreceptorów siatkówki oka ludzkiego

Absorption Spectrum of Retinal Photoreceptors in the Human Eye

The photoreception of the retina with reference to the absorption spectrum of the single retinal cones of human eye is discussed.

Fala światła, odbita od przedmiotu i pochłonięta przez elementy światłoczułe siatkówki, wywołuje impuls przekazywany poprzez włókna nerwowe do centrów mózgu. Siatkówka oka ludzkiego posiada dwa rodzaje światłoczułych komórek: pręciki i czopki. Pręciki reagują przy oświetleniach mniejszych od 0,1 luksa i nie dają wrażeń barwnych (widzenie skotopcyjne). Czopki są czynne przy oświetleniach większych od 0,1 luksa i umożliwiają odczucie różnorodnych barw (widzenie fotopcyjne). Czułość pręcików na oświetlenie osiąga maksimum przy długości fali równej około 510 m μ , zaś czopków — przy 570 m μ .

I. Biochemiczne czynne substancje siatkówki

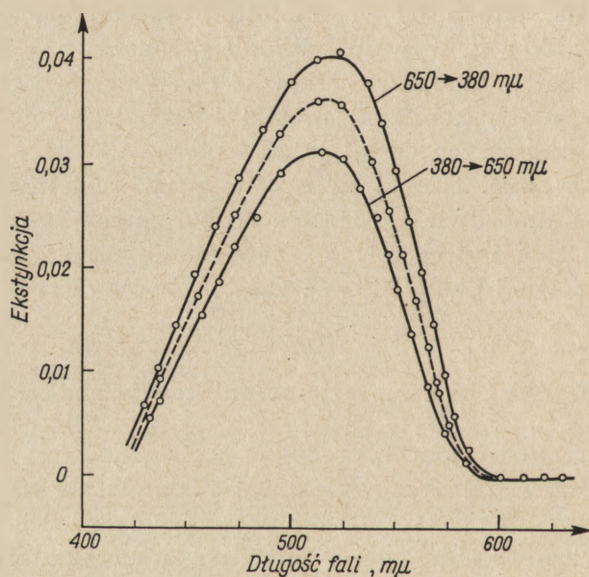
W zewnętrznych członach pręcików pod wpływem absorpcji kwantu światła rodopsyna (purpura wzrokowa) rozkłada się na neoretyninę b i białko — opsynę. Powstaje wtedy potencjał czynnościowy, a neoretynina b/11 *cis* izomer aldehydowy witaminy A₁ przekształca się w transretyninę (izomer *trans*). Regeneracja rodopsyny może nastąpić tylko wtedy, gdy forma *trans* retyniny przejdzie z powrotem w formę *cis*. Proces wiązania się neoretyniny b z opsyną i jej odbarwianie się pod wpływem światła szczegółowo badał Wald (7) podając na podstawie zmian absorpcji światła przy 380 m μ (maximum absorpcji dla neoretyniny b) i 498 m μ (maximum absorpcji dla rodopsyny) kinetykę tego zjawiska. Poza tym wykazał, że w czasie rekombinacji tworzy się w czopkach jodopsyna zbudowana z neoretyniny b, oraz z białka podobnego do opsyny. Reakcja tworzenia się jodopsyny przebiega kilkakrotnie szybciej niż reakcja tworzenia się rodopsyny. Ostatnio Wald i Brown (1, 2) wykazali, że istnieją inne chromoproteidy siatkówki zbudowane

* Dr med., mgr fil., adiunkt Katedry Fizyki Lekarskiej Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin.

z neoretyny *b* i białek typu opsyny, posiadające maksimum absorpcji w części zielonej i czerwonej widma.

Ciężar cząsteczkowy opsyn wynosi około 40.000. Przy oświetleniu rodopsyny w opsynie powstają swobodne grupy SH. Blokowanie tych grup hamuje przebieg reakcji. Powstanie potencjału czynnościowego tłumaczy się wiązaniem jonów metali ciężkich przez swobodne grupy SH wolnych opsyn; nadmiar jonów ujemnych zmieniając ładunek na błonie fotoreceptora prowadzi do powstania impulsu elektrycznego.

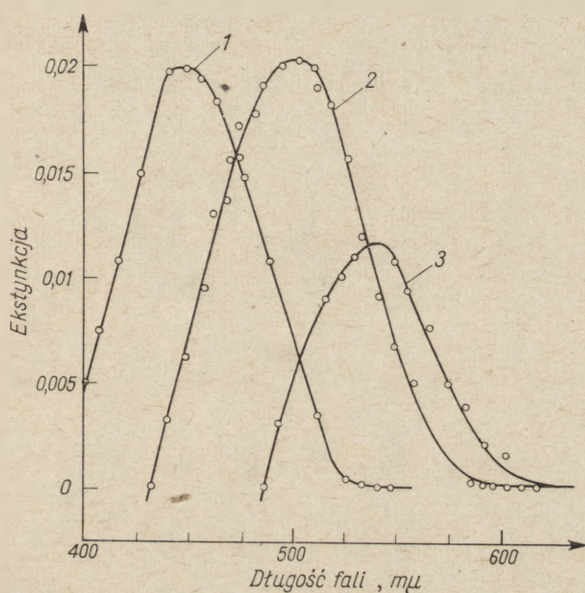
Trójkromatyczna teoria Helmholtza powstawania wrażeń barwnych zakłada istnienie trzech pigmentów o maksimum absorpcji światła w części niebieskiej, zielonej i czerwonej widma. Nie wiadomo było do niedawna czy chromoproteidy te znajdują się osobno w różnych czopkach, czy też występują razem w jednym czopku.



Rys. 1. Widmo absorpcyjne pojedynczego pręcika siatkówki oka ludzkiego (wg 3)

Talbot (5) twierdził, że układ, w którym powstaje wrażenie barwne składa się z dwóch rodzajów czopków i z pręcików. Natomiast badania Granita (4) sugerowały istnienie trzech rodzajów czopków. Również Starkiewicz (16) w swej kinetycznej teorii widzenia w celu wytłumaczenia powstawania barw, kontrastu obocznego powidoków i elektretinogramu przyjął istnienie trzech czopków: czerwonego, zielonego i niebieskiego. Słuszności tego założenia dowiedli doświadczalnie Brown i Wald (3). Przeprowadzając badania na siatkówce uzyskali oni widmo absorpcyjne poszczególnych pręcików (rys. 1) o maksimum przy 505 mμ, identyczne z widmem rodopsyny.

Badając czopki w części siatkówki odległej o 1 do 2 mm od *fovea*, autorzy mogli traktować je jako izolowane komórki. Porównując widmo absorpcyjne komórki zaadaptowanej do ciemności z widmem po oświetleniu danego fotoreceptora otrzymali oni różnicowe widmo absorpcyjne (rysunek 2).



Rys. 2. Różnicowe widmo absorpcyjne poszczególnych pojedynczych czopków parafovealnej części siatkówki oka ludzkiego (wg 3)

Uzyskane trzy krzywe absorpcyjne o maksimum przy długości fali świetlnej równej odpowiednio 450, 525, 555 mμ potwierdziły postulowane przez Starkiewicza istnienie 3 rodzajów czopków: czerwonych, zielonych i niebieskich.

LITERATURA

1. Brown R. K., *J. Optical Soc. Am.* **51**, 1000 (1961).
2. Brown R. K., Wald G., *Nature* **200**, 37 (1963).
3. Brown R. K., Wald G., *Science* **144**, 3614, 45 (1964).
4. Granit R., *Sensory mechanismus of retine*, London 1947.
5. Talbot S. A., *J. Optical Soc. Am.* **41**, 895 (1951).
6. Starkiewicz W., *Psychologia wzroku*, Warszawa 1960.
7. Wald G., Brown R. K., *Nature* **177**, 174 (1956).

Powstawanie i wydalenie produktów azotowych u ryb

Production and Excretion of Waste Nitrogen Compounds in Fishes

The production and excretion of waste nitrogen compounds in fishes is reviewed. The hypothesis of evolution of ureotelism in vertebrates is discussed.

Przyjęta powszechnie klasyfikacja zwierząt na amonio-, ureo- i urykoteliczne (2) zależnie od rodzaju głównego końcowego produktu przemiany białek jest dosyć względna. W rzeczywistości większość zwierząt wydala równocześnie amoniak, mocznik i kwas moczowy, a wzajemny stosunek ilościowy tych związków zależy w znacznej mierze od wpływów środowiska i stadium rozwoju osobniczego zwierzęcia.

Przemiany azotowe u ryb i sposoby wydalenia końcowych produktów tych przemian są doskonałym przykładem przystosowania na drodze ewolucji do warunków środowiska. Wydalenie produktów przemian u ryb odbywa się nie tylko przez nerki, ale również przez skrzel. Ryby jako zwierzęta wodne są w przeważającej większości amonioteliczne, jakkolwiek u pewnych gatunków wymogi środowiska spowodowały rozwój ureotelizmu; jeszcze inne gatunki zachowały zdolność przedstawiania się z amoniotelizmu na ureotelizm i odwrotnie w zależności od zaopatrzenia w wodę.

Od czasu pionierskich badań prowadzonych w latach 30-tych przez fizjologa i biochemika H o m e r a S m i t h a dopiero ostatnie lata przyniosły istotny postęp w zrozumieniu mechanizmów powstawania i wydalenia związków azotowych. Szereg danych dotyczących tego zagadnienia zawierają wydawnictwa monograficzne (6, 10, 11, 31). Celem tego artykułu jest przedstawienie przemian azotowych u ryb z punktu widzenia biochemii ewolucyjnej.

Przy omawianiu ewolucji ureotelizmu przedstawiono schemat rozwoju kręgowców według B r o w n a i C o h e n a (8). Jest to jeden z licznych różniących się dość znacznie od siebie schematów podawanych w literaturze; bliższe zajęcie się spornymi poglądami na temat filogenezy kręgowców wykraczałoby jednak poza ramy tego artykułu. Mimo tych sporów powszechnie przyjmuje się, że ryby stały na drodze ewolucji wyższych kręgowców. Nie wiadomo czy ryby rozwinęły się w wodzie

* Dr med., adiunkt Zakładu Chemii Fizjologicznej AM w Gdańsku.

słodkiej i wtórnie opanowały morza, czy też było odwrotnie (6, 25, 31). Przeważa jednak pogląd, że kolebką pierwotnych ryb były zbiorniki słodkowodne.

Współcześnie żyje około 20 000 gatunków ryb tworząc najliczniejszą i najbardziej różnorodną gromadę kręgowców. Ogromna większość (około 95%) należy do rzędu kostnoszkieletowych (*Teleostei*). Do ryb kości- stych zalicza się też ryby dwudyszne (*Dipnoi*) reprezentowane współ- cześnie jedynie przez trzy rodzaje (7). Ryby chrzęstnoszkieletowe (*Chon- drichthyes*), z których większość należy do spodoustych (*Elasmobranchii*) są grupą wymierającą; obecnie żyje, przeważnie w morzach, zaledwie 86 rodzajów i 150 gatunków tych ryb (40). Tablica 1 przedstawia pozycję omawianych grup ryb w systematyce zwierząt.

Tablica 1

Systematyka strunowców ze szczególnym uwzględnieniem systematyki ryb według Bobrinskiego i Matwiejewa (7)

Typ	Podtyp	Gromada	Gro- ma- da	Grupa	Podgromada	Rząd
Strunowce (<i>Chordata</i>)	Półstrunowce (<i>Hemichordata</i>)		R y b y (<i>Pisces</i>)	Ryby chrzę- stnoszkieleto- we (<i>Chondri- chthyes</i>)	Spodouste (<i>Elasmobranchii</i>)	
	Oslonice (<i>Tunicata</i>)				Zrosłogłowe (<i>Holocephali</i>)	
	Bezczaszkowce (<i>Acrania</i>)				Chrzęstnokostne (<i>Chonarostei</i>)	
	Kręgowce (<i>Vertebrata</i>)	Smoczkouste (<i>Cyclostomata</i>)			Promieniopłetwe (<i>Actinopterygii</i>)	Ganoidy kos- tne (<i>Holostei</i>)
		Ryby (<i>Pisces</i>)			Wielopłetwe (<i>Polypteri</i>)	Kostnoszkie- letowe (<i>Tele- ostei</i>)
		Plazy (<i>Amphibia</i>)			Trzonopłetwe (<i>Crossopterygii</i>)	
		Gady (<i>Reptilia</i>)		Ryby kościste (<i>Osteichthyes</i>)	Dwudyszne (<i>Dipnoi</i>)	
		Ptaki (<i>Aves</i>)				
		Ssaki (<i>Mammalia</i>)				

I. Ryby kostnoszkieletowe

Ryby kostnoszkieletowe, zarówno morskie jak i słodkowodne, są ty- powymi zwierzętami amoniotelicznymi. Homer Smith w 1929 ro- ku (36) zastosował pomysłowy sposób badania wydalania związków azo- towych przez ryby. Umieszczał on rybę w podłużnym naczyniu w ten sposób, że gumowa przegroda oddzielała wodę kontaktującą się z głową, od wody w której była zanurzona reszta ciała. Pozwoliło mu to stwier-

dzić, że znaczna większość związków azotowych wydalana jest przez skrzelą — głównie jako amoniak. Skóra i przewód pokarmowy ryb nie uczestniczą w wydalaniu amoniaku. Późniejsze badania potwierdziły w całej rozciągłości obserwacje Smitha. W tablicach 2 i 3 zestawiono niektóre dane dotyczące udziału amoniaku w ogólnej ilości wydalanych związków azotowych oraz ilość azotu wydalaną przez nerki i drogą pozanerkową.

Tablica 2

Udział procentowy azotu amoniaku i mocznika w azocie całkowitym wydalany przez ryby kostnoszkieletowe

Gatunek	N—NH ₃	N—mocznika	Literatura
<i>Salmo gairdneri</i>	55—60		(14)
<i>Carassius auratus</i>	73		(41)
<i>Myoxocephalus scorpius</i>	90		(17)
<i>Leptocottus armatus</i>	63	21	(43)
<i>Cyprinus carpio</i>	50—60	6	(36)
<i>Platichthys stellatus</i>	84	12	(43)
<i>Taeniotocha lateralis</i>	48	38	(43)

Tablica 3

Procent azotu całkowitego wydalany przez skrzelą i przez nerki u ryb kostnoszkieletowych

Gatunek	Przez skrzelą	Przez nerki	Literatura
<i>Salmo gairdneri</i>	97	3	(14)
<i>Cyprinus carpio</i>	90	10	(30, 36)
<i>Leptocottus armatus</i>	77	23	(43)

Wśród produktów azotowych wydalanych przez morskie ryby kostnoszkieletowe jako ważny składnik wymieniany jest też tlenek trójmetyloaminy. Baldwin podaje (2), iż związek ten stanowi trzecią część azotu całkowitego wydalanego przez te ryby. Wood (43) stwierdził jednak, że u głowacza jako tlenek trójmetyloaminy wydala się znikoma część azotu całkowitego. Podawane w podręcznikach wartości (2, 31) są jego zdaniem nieporozumieniem wynikłym z odnoszenia zawartości tego związku do substancji azotowych wydalanych w moczu, a nie do całkowitej ilości związków azotowych, wydalanych głównie przez skrzelą. Zawarty w tkankach ryb tlenek trójmetyloaminy jest substancją egzogenną pochodzącą z pokarmu. Tkanki wszystkich kręgowców mają zdolność utleniania trójmetyloaminy do N-tlenku (1), nie jest jednak jasne

czy związek ten może powstawać endogennie z azotu białkowego i jaki jest jego ewentualny udział w całkowitej puli metabolizowanego azotu.

Interesujący jest mechanizm wydalania amoniaku przez skrzela i jego pochodzenie. Wydaje się najbardziej prawdopodobne, że wydalanie amoniaku ze skrzel do wody odbywa się na drodze prostej dyfuzji wskutek znacznej różnicy stężeń i swobodnej przepuszczalności nabłonka skrzel dla tego związku (15, 17). Stężenie amoniaku we krwi dopływającej do skrzel wynosi około 0,4 mg⁰/o jest więc stosunkowo wysokie w porównaniu z stężeniem we krwi u innych kręgowców (15, 17, 26, 29). Smith (36) pierwotnie przypuszczał, że amoniak powstaje obwodowo, a skrzela są jedynie miejscem jego wydalania na drodze dyfuzji do otaczającej wody. Później zmienił swój pogląd i sądził, że amoniak powstaje w samych skrzelach z odpowiednich prekursorów. Goldstein i Forster w 1961 roku podjęli systematyczne badania (15) i na podstawie nieznacznej różnicy stężeń amoniaku we krwi dopływającej i odpływającej ze skrzel doszli do wniosku, że około 10% wydalanego amoniaku pochodzi z krwi, a pozostałe 90% powstaje w skrzelach. Ponieważ obserwowano spadek stężenia glutaminy we krwi przepływającej przez skrzela, a skrzela zawierają glutaminazę i dehydrogenazę kwasu glutaminowego, przypuszczano, że około 50% wydalanego amoniaku powstaje w skrzelach z glutaminy i kwasu glutaminowego. Obok glutaminazy i dehydrogenazy kwasu glutaminowego skrzela zawierają również AMP-aminohydrolazę, dezaminującą kwas adenylowy do kwasu inozynowego. Aktywność AMP-aminohydrolazy w skrzelach ryb kostnoszkieletowych przewyższa wielokrotnie aktywność glutaminazy. Na tej podstawie Makarewicz i Żydowo (20, 21), wysuwali przypuszczenie, że u ryb istotnym źródłem wydalanego amoniaku może być grupa 6-aminowa nukleotydów adeninowych.

Ostatnie badania wskazują jednakże, że znaczna większość amoniaku wydalanego przez skrzela pochodzi wprost z krwi — a więc amoniak nie tworzy się „*de novo*” w tkance skrzelowej. Pequin (26) stwierdził, że u karpia krew przechodząc przez skrzela oczyszcza się prawie całkowicie z zawartego w niej amoniaku. Goldstein i wsp. (17) w opublikowanych w 1964 roku doświadczeniach zrewidowali także swój pogląd na rolę skrzel w wytwarzaniu amoniaku. Autorzy ci badając rybę morską *Myoxocephalus scorpius* stwierdzili, że około 60% wydalanego amoniaku pochodzi z amoniaku zawartego we krwi przepływającej przez skrzela. Pozostałe 40% powstaje w skrzelach z azotu α -aminowego osocza. Dezaminacja glutaminy osocza w skrzelach nie ma znaczenia w powstawaniu amoniaku, gdyż nie obserwowano zmniejszenia stężenia glutaminy we krwi po przejściu przez skrzela. Wyniki wcześniejszych doświadczeń tych autorów (15) były błędne wskutek mylnego traktowania krwi pobieranej z ogona ryby jako krwi tętniczej, podczas gdy tak pobrana krew jest mieszaniną krwi tętniczej i żylną.

Narządem wytwarzającym największe ilości amoniaku jest wątroba. W doświadczeniach na perfundowanej wątrobie karpia zaobserwowano, że najwięcej amoniaku powstaje z glutaminy i asparaginy jak również z dezaminacji nukleotydów i nukleozydów purynowych (27, 29). Wątroba ryb zawiera bardzo aktywne układy enzymatyczne uwalniające amoniak z tych substratów (35). U ryb słodkowodnych wydalanie jonu amonowego związane jest z wchłanianiem przez skrzel jonu sodowego (33).

Warto też zwrócić uwagę na konieczność odpowiedniego przygotowania ryb do badań i ostrożnego interpretowania wyników w badaniach poziomu amoniaku we krwi i wydalania związków azotowych. Czynnikiem bardzo istotnie wpływającym na ilość wydalanego amoniaku i jego stężenie we krwi jest temperatura środowiska (29). W wynaczynionej krwi ryb obserwuje się szybki wzrost stężenia amoniaku (29). Pobieranie krwi u ryb powinno odbywać się w wodzie, gdyż nawet krótkotrwałe niedotlenienie zwierzęcia znacznie zmienia stężenie amoniaku we krwi (28). Ilość wydalanych związków azotowych szybko spada podczas pierwszych sześciu dni głodzenia, potem zaś utrzymuje się na względnie stałym poziomie (14).

II. Ryby chrzęstnoszkieletowe

Ryby chrzęstnoszkieletowe stanowią grupę dość wyjątkową, gdyż bez wyjątku są zwierzętami ureotelicznymi. Mocznik będąc głównym końcowym produktem przemian azotowych spełnia u nich istotną rolę w utrzymaniu równowagi osmotycznej. Krew i tkanki ryb chrzęstnoszkieletowych zawierają mocznik w stężeniu około 1‰ u ryb słodkowodnych i 2—2,5‰ u ryb żyjących w morzach. Są to stężenia bardzo wysokie w porównaniu z innymi zwierzętami ureotelicznymi jak płazy, niektóre gady i ssaki. Utrzymanie tak wysokiego stężenia mocznika możliwe jest dzięki wchłanianiu zwrotnemu tej substancji w kanalikach nerkowych i złej przepuszczalności nabłonka skrzel dla mocznika. Tak wysokie stężenie mocznika we krwi chroni ryby przed ciągłą utratą wody na drodze osmotycznej.

U gatunku *Torpedo* 85‰ azotu wydalane jest w postaci mocznika, a zaledwie 1,7‰ jako amoniak (31). H o m e r S m i t h (38, 39) jako jeden z pierwszych podjął badania nad wydalaniem związków azotowych przez ryby chrzęstnoszkieletowe i stwierdził, iż wydalanie mocznika i amoniaku u tych ryb odbywa się głównie przez skrzel na drodze dyfuzji. U gatunku *Pristis microdon* przez skrzel wydala się 77‰ mocznika i 89‰ amoniaku, a w moczu także głównym składnikiem azotowym jest mocznik.

Ustalenie drogi biosyntezy mocznika u ryb chrzęstnoszkieletowych miało doniosłe znaczenie dla zrozumienia ewolucji ureotelizmu u zwie-

rząt. Przypuszczano, że mocznik powstaje na drodze cyklu ornitynowego Krebsa—Henseleita; w wątrobie tych ryb wykazano ponad wszelką wątpliwość aktywność transkarbamylazy ornityny, układu syntetyzującego argininę i arginazy. Przez dłuższy czas nie udawało się wykazać aktywności syntetazy karbamylfosforanu (3, 8). Sprzeczne doniesienia na ten temat rozstrzygnęli ostatnio W a t t s i wsp. (42) z pracowni Baldwina, wykazując aktywność tego enzymu w homogenatach wątroby *Scylliorhinus canicula* i *Raia circularis*. Źródłem azotu dla syntezy karbamylfosforanu może być amoniak, glutamina, a także inne aminokwasy. Aktywność tego enzymu jest znacznie niższa w porównaniu z płazami i ssakami, ale należy pamiętać, że bardzo wysokie stężenie mocznika w tkankach ryb chrzęstnoszkieletowych może być uwarunkowane głównie słabą przepuszczalnością skrzel i sprawnym wchłanianiem w kanalikach nerkowych. Tak więc biosynteza mocznika u ryb chrzęstnoszkieletowych odbywa się na tej samej drodze, co u innych zwierząt ureotelicznych. Ryby te są również zdolne wytwarzać mocznik na drodze enzymatycznej degradacji kwasu moczowego (9, 13).

Rola fizjologiczna mocznika u chrzęstnoszkieletowych nie polega jak się wydaje na wydalaniu azotu pochodzącego z przemian aminokwasów. W a t t s i wsp. (42) sugerują, że również rola mocznika w utrzymywaniu równowagi osmotycznej nie jest tak istotna jak dotąd powszechnie uważano. Stały, wysoki poziom mocznika w tkankach ryb chrzęstnoszkieletowych, kontrolowany hormonalnie, jest zdaniem tych autorów bardzo istotnym czynnikiem regulacji wewnątrzustrojowej.

Pomimo tak dużych różnic w sposobie wydalania azotu, tkanki ryb chrzęstnoszkieletowych i kostnoszkieletowych mają bardzo podobną zdolność dezaminowania L-aminokwasów (34). Ogólne przemiany azotu aminokwasów przebiegają więc zapewne bardzo podobnie; środowisko zaś wywarło wpływ na końcowe produkty tych przemian i ich różnorodne wykorzystanie.

III. Ryby dwudyszne

Przemiany związków azotowych u tych ryb są szczególnie interesujące, gdyż zwierzęta te mogą być przez dłuższy czas pozbawione wody, korzystając w tym czasie z tlenu atmosferycznego. Pozostają one wówczas w zupełnym spoczynku, otoczone szczelnie warstwą wyschniętego mułu co zabezpiecza je przed nadmierną utratą wody. W tym stanie nie pobierają pokarmu, a wydalanie moczu zupełnie ustaje. Taki stan „życia utajonego” musi niewątpliwie łączyć się z przestawieniem metabolizmu tych ryb na specjalne tory.

Smith (37) badał wszechstronnie metabolizm afrykańskiej ryby dwudysznej *Protopterus aethiopicus*. W środowisku wodnym jest to

zwierzę amonioteliczne, 30—70% azotu wydalone jest wówczas w formie amoniaku. Gdy ryba zostaje pozbawiona wody, wydalenie całkowicie ustaje, nie obserwuje się w tkankach nagromadzenia amoniaku, natomiast stężenie mocznika wzrasta 100-krotnie. Po umieszczeniu zwierzęcia w wodzie następuje szybkie wydalenie mocznika i po upływie 8—12 dni stanowi on już tylko około 30% całkowitego azotu wydalanego. W zależności więc od zaopatrzenia w wodę ryba ta jest amonioteliczna lub ureoteliczna, przy czym wydalenie związków azotowych możliwe jest tylko w wodzie i następuje prawdopodobnie przez skrzela. Zwierzę to gdy jest pozbawione wody czerpie energię niemal wyłącznie z rozkładu białka (18, 37). Organizm *Protopterus aethiopicus* przystosowuje się do ograniczonej ilości wody w środowisku przekształcając azot aminokwasów w mocznik. Podobne możliwości przystosowawcze obserwuje się również wśród płazów, a mianowicie u żaby afrykańskiej *Xenopus laevis* (4).

Brak jest danych dotyczących występowania enzymów cyklu ornitynowego u ryb dwudysznych. Brown i Cohen (8) w swojej hipotezie o ewolucji ureotelizmu u kręgowców przyjmują, że mocznik u ryb dwudysznych powstaje w cyklu Krebsa—Henseleita. Jednakże Janssens (18) badając u *Protopterus aethiopicus* powstawanie mocznika z amoniaku w skrawkach wątroby stwierdził, że ilość mocznika jest stosunkowo niewielka i że dodanie ornityny nie przyspiesza tej syntezy. Na podstawie faktu, że wątroba tej ryby zawiera enzymy przekształcające kwas moczowy w mocznik (13), Goldstein i Forster (16) wysunęli przypuszczenie, że źródłem mocznika nagromadzanego przy ograniczonej ilości wody w środowisku jest kwas moczowy. W środowisku wodnym amoniak powstający z dezaminacji aminokwasów bez przeszkód wydala się do wody. W okresie braku wody azot α -aminowy aminokwasów służy do syntezy kwasu moczowego, który pod działaniem urykazy, allantoinazy i allantoinazy może następnie przekształcać się w mocznik.

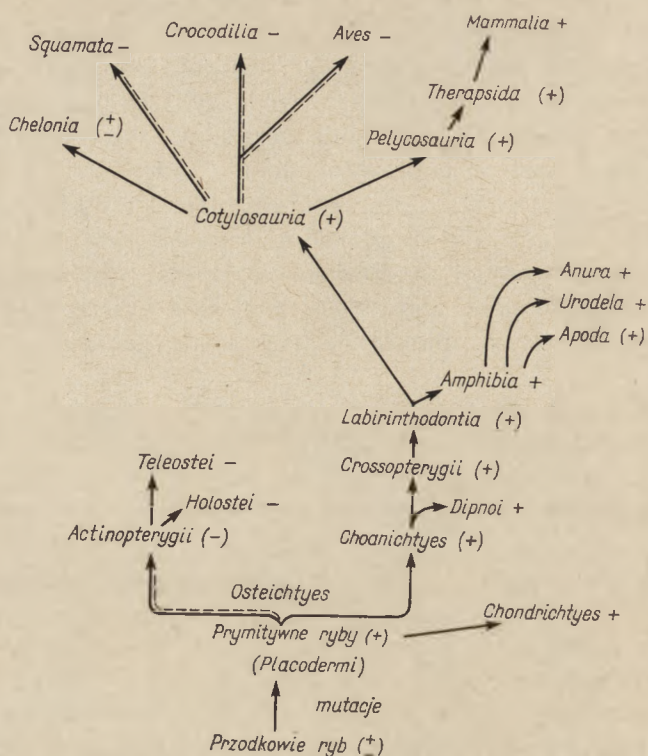
Być może jednak, że ryby dwudyszne podobnie jak *Xenopus laevis* posiadają potencjał genetyczny umożliwiający biosyntezę mocznika na drodze cyklu ornitynowego (42). Droga ta w środowisku wodnym nie jest wykorzystywana ale może zostać uruchomiona przez działanie środowiska.

IV. Ewolucja ureotelizmu u kręgowców

Wśród współczesnych kręgowców zwierzętami ureotelicznymi są ryby chrzęstnoszkieletowe, ryby dwudyszne, płazy, niektóre gady i ssaki. Ryby kostnoszkieletowe są amonio-, a ptaki i większość gadów — urykoteliczne.

W 1960 roku niezależnie od siebie Brown i Cohen (8) oraz Baldwin (3) wysunęli hipotezę, że w przeszłości wszystkie prymityw-

ne ryby były ureoteliczne, a w trakcie ewolucji wyższych kręgowców na pewnych szczeblach rozwoju nastąpiła utrata zdolności syntezy mocznika. Hipotezę tę ilustruje rysunek 1.



Rys. 1. Hipoteza o ewolucji ureotelizmu u kręgowców (wg 8)

Znaki + i - oznaczają stwierdzoną, a wzięte w nawias — postulowaną obecność lub nieobecność kompletnego cyklu ornitynowego. Linie przerywane oznaczają miejsce utraty jednego lub więcej enzymów tego cyklu.

Hipoteza ta przyjmuje, że u prymitywnych ryb (*Placodermi*) funkcjonował cykl ornitynowy wykształcony na drodze mutacji. Przodkowie prymitywnych ryb mogli posiadać już niektóre enzymy cyklu ornitynowego wykorzystywane w innych przemianach. Dalsza ewolucja przebiegała w dwóch kierunkach. Z jednej strony rozwinęły się ryby promieniopłetwe (*Actinopterygii*), z których wyodrębniła się współczesna grupa ryb kostnoszkieletowych (*Teleostei*). U promieniopłetwych nastąpiła utrata zdolności syntezy mocznika i rozwinął się amoniotelizm. W drugim kierunku wykształciły się ryby chrzęstnoszkieletowe (*Chondrichthyes*) i trzonopłetwe (*Crossopterygii*), które zachowały zdolność syntezy mocznika. Z tej gałęzi rozwinęły się płazy, a następnie gady, ptaki i ssaki. W rozwoju gadów i ptaków nastąpiła utrata cyklu ornitynowego i rozwinął się urykotelizm.

Hipoteza ta zakłada, że u form przejściowych funkcjonował cykl ornitynowy biosyntezy mocznika. Według Watta i wsp. (42) natomiast wystarczy przyjąć, że istnieje jedynie potencjał genetyczny dla takiego procesu, który może być lub nie być wykorzystywany. Wiele obserwacji przemawia za takim ujęciem. Reakcje ujmowane jako cykl mocznikowy są ściśle związane z wieloma kierunkami przemian żywych organizmów jak np. biosynteza pirymidyn, argininy, fosfagenów. Enzymy katalizujące te reakcje występują u wielu zwierząt, a także u roślin i bakterii (8, 32). Gdyby zdolność syntezy mocznika wykształciła się u pewnych grup zwierząt niezależnie od siebie, to należałoby spodziewać się znacznych różnic w mechanizmie syntezy i własnościach enzymów katalizujących ten proces. Tymczasem wiadomo, że taki sam jest mechanizm syntezy mocznika u ssaków i u płazów. Ponadto transkarbamylaza ornityny u ryby chrzęstnoszkieletowej i u żaby wykazują daleko idące podobieństwo własności (19). Wykazano również znaczne podobieństwo immunochemiczne syntetazy karbamylfosforanu z tkanek różnych zwierząt ureotelicznych (22). Aktywność enzymów katalizujących trzy pierwsze etapy cyklu ornitynowego, to jest syntetazy karbamylfosforanu, transkarbamylazy ornityny i układu syntetyzującego argininę, zmienia się równolegle na różnych szczeblach rozwoju filogenetycznego. Sugeruje to jeden i ten sam mechanizm regulacji u odległych od siebie gatunków (23). Koncepcję tę potwierdza obserwacja, iż arginaza wątroby zwierząt ureotelicznych różni się własnościami od arginazy z tkanek zwierząt urykotelicznych (24).

Wszystko wskazuje, że cykl ornitynowy wykształcił się stosunkowo dawno w rozwoju filogenetycznym zwierząt. Interesujący jest fakt, że u bezkręgowca dżdżownicy (*Lumbricus terrestris*) stwierdzono ostatnio funkcjonowanie kompletnego cyklu ornitynowego powstawania mocznika (5).

Metabolizm i wydalanie azotu u zwierząt są procesami bardzo plastycznymi. Wydalanie amoniaku jako końcowego produktu przemian azotowych jest najbardziej ekonomiczne, przekształcanie go w mocznik czy też kwas moczowy wymaga zużytkowania na ten cel znacznych ilości energii. Jednakże swobodne wydalanie amoniaku możliwe jest tylko w środowisku wodnym — ryby dwudyszne narażone okresowo na brak wody mają możliwość syntezy mocznika. Wydaje się, że zdolność syntezy mocznika i aktywnego jego wydalania przez nerkę, były nieodzownymi warunkami dla rozwoju zwierząt lądowych.

Zwraca uwagę doniosłość funkcji jakie u ryb spełniają skrzela. Narząd ten zapewnia wymianę oddechową gazów, uczestniczy w utrzymaniu równowagi osmotycznej i dzięki stałemu kontaktowi z wodą wykorzystywany jest jako narząd wydalniczy. U larwy płaza *Necturus maculosus*, który utracił zdolność metamorfozy i całe życie spędza w wodzie, skrzela są narządem szczątkowym, a funkcję narządu wydalniczego speł-

nia skóra (12). Jest to potwierdzenie tezy, iż w procesie ewolucji utrata funkcji wyprzedza modyfikacje struktury.

U ryb chrzęstnoszkieletowych końcowy produkt przemian azotowych — mocznik, spełnia dodatkowo istotną dla tych zwierząt funkcję czynnika utrzymującego równowagę osmotyczną i jest elementem chemicznej homeostazy ustroju. Amoniak ze względu na swoją łatwość przenikania przez błony nie mógłby spełniać tego zadania. Zrozumiały jest więc ureotelizm tych zwierząt, jakkolwiek warunki środowiska pozwalają również na swobodne wydalenie amoniaku.

LITERATURA

1. Baker J. R., Struempler A., Chaykin S., *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 58 (1963).
2. Baldwin E., *Biochemia dynamiczna*. Warszawa, 1959, str. 334, 368.
3. Baldwin E., *Comp. Biochem. Physiol.* **1**, 24 (1960).
4. Balinsky J. B., Cragg M. M., Baldwin E., *Comp. Biochem. Physiol.* **3**, 236 (1961).
5. Bishop S. H., Campbell J. W., *Comp. Biochem. Physiol.* **15**, 51 (1965).
6. Black S. V. w *The Physiology of Fishes*. t. I, red. M. E. Brown, New York, 1957, str. 163.
7. Bobrinski N., Matwiejew B., *Zoologia*, t. II, Warszawa, 1952.
8. Brown G. W. Jr., Cohen P. P., *Biochem. J.* **75**, 82 (1960).
9. Brunel A., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **19**, 805 (1937).
10. Cohen P. P., Brown G. W. Jr., *Comparative Biochemistry* t. II, red. M. Florkin, H. S. Mason, New York, London, 1960, str. 161.
11. Cohen P. P., Brown G. W. Jr., *Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry*, Moscow 1963, t. III, str. 129.
12. Fanelli G. M., Goldstein L., *Comp. Biochem. Physiol.* **13**, 193 (1964).
13. Florkin M., Duchateau G., *Arch. Inter. Physiol.* **53**, 267 (1943).
14. Fromm P. O., *Comp. Biochem. Physiol.* **10**, 121 (1963).
15. Goldstein L., Forster R. P., *Am. J. Physiol.* **200**, 1116 (1961).
16. Goldstein L., Forster R. P., *Comp. Biochem. Physiol.* **14**, 567 (1965).
17. Goldstein L., Forster R. P., Fanelli G. M. Jr., *Comp. Biochem. Physiol.* **12**, 489 (1964).
18. Janssens P. A., *Comp. Biochem. Physiol.* **11**, 105 (1964).
19. Joseph R. L., Watts D. C., Baldwin E., *Comp. Biochem. Physiol.* **11**, 119 (1964).
20. Makarewicz W., *Acta Biochim. Polon.* **10**, 363 (1963).
21. Makarewicz W., Żydowo M., *Comp. Biochem. Physiol.* **6**, 269 (1962).
22. Marshall M., Cohen P. P., *J. Biol. Chem.* **236**, 718 (1961).
23. Mora J., Martuscelli J., Ortiz-Pineda J., Soberon G., *Biochem. J.* **96**, 28 (1965).
24. Mora J., Tarrab R., Martuscelli J., Soberon G. *Biochem. J.* **96**, 588 (1965).
25. Muntz F. N., McFarland W. N., *Comp. Biochem. Physiol.* **13**, 381 (1964).
26. Pequin L., *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **255**, 1795 (1962).
27. Pequin L., *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **257**, 2734 (1963).
28. Pequin L., Serfaty A., *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **156**, 1167 (1962).

29. Pequin L., Serfaty A., *Comp. Biochem. Physiol.* **10**, 315 (1963).
30. Pora A. E., Prekup O., *Woprosy Ichtiol.* **14**, 119 (1960), cyt. za *Biol. Abstr.* **37**, 13390 (1962).
31. Prosser Ladd C., w *Comparative Animal Physiology*, red. C. Ladd Prosser, Frank A. Brown Jr., Wyd. drugie, Philadelphia, London 1962, str. 135.
32. Ratner S., *Adv. Enzymol.* **15**, 319 (1954).
33. Romen F. G., Maetz J., *J. Gen. Physiol.* **47**, 1209 (1964).
34. Salvatore F., Zappia V., Costa C., *Comp. Biochem. Physiol.* **16**, 303 (1965).
35. Schmidt G., *Zool. Jb. Abt. Phys.* **67**, 151 (1957).
36. Smith H. W., *J. Biol. Chem.* **81**, 727 (1929).
37. Smith H. W., *J. Biol. Chem.* **88**, 97 (1930).
38. Smith H. W., *Am. J. Physiol.* **98**, 279 (1931).
39. Smith H. W., Smith C. G., *Am. J. Physiol.* **98**, 296 (1931).
40. Suworow E., *Podstawy Ichtiologii*, Warszawa 1954.
41. Thornburn C. C., Matty A. J., *Comp. Biochem. Physiol.* **8**, 1 (1963).
42. Watts D. C., Watts R. L., *Comp. Biochem. Physiol.* **17**, 785 (1966).
43. Wood J. D., *Canad. J. Biochem. Physiol.* **36**, 1237 (1958).

NAGRODY PRYZNANE W 1966 ROKU

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

NAGRODA IMIENIA BOLESŁAWA SKARŻYŃSKIEGO

w wysokości 3000 zł. została przyznana dr Irenie Szumiel za artykuł pt. „Mechanizm działania enzymów” opublikowany w *Postęпах Biochemii*, **11**, 1965

NAGRODA IMIENIA JAKUBA KAROLA PARNASA

w wysokości 4000 zł. została przyznana dr Celinie Janion i Prof. dr Davidowi Shugarowi za pracę eksperymentalną pt. „Mutagenicity of hydroxylamine: reaction with analogues of cytosine, 5/6-substituted cytosines and some 2-keto-4-ethoxypyrimidines” opublikowaną w *Acta Biochimica Polonica*, **12**, 333 (1965).

RECENZJE

Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids, tom VIII, część 1, Phospholipids and Biomembranes, L. L. M. Van Deenen pod red. R. T. Holmana, Pergamon Press. Oxford, London, Edinburgh, New York, Frankfurt 1965, str. 127.

Omawiana książka stanowi kolejny tom z zapoczątkowanej w 1952 r. serii wydawniczej pod tytułem: *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*, mającej na celu dostarczenie czytelnikowi monograficznych opracowań z dziedziny badania lipidów. Część pierwsza tomu VIII poświęcona jest fosfolipidom i roli tych związków jako składników błon biologicznych. Celem tej monografii jest przedstawienie i przeanalizowanie danych na temat budowy i metabolizmu fosfolipidów w powiązaniu z funkcją biologiczną błon. Książka składa się z trzech rozdziałów.

W rozdziale pierwszym przedstawiono stan badań nad składem lipidowym błon, gdyż dokładne zanalizowanie poszczególnych składników jest niezbędnym wstępem dla zrozumienia budowy molekularnej błony. Omówiono skład lipidowy błon komórkowych oraz wewnątrzkomórkowych struktur. Następnie przedstawiono chemiczną budowę fosfolipidów oraz ich występowanie w błonach komórkowych. Zagadnieniem udziału części polarnej fosfolipidów w wiązaniu się z innymi składnikami błon poświęcono osobną część. Wydaje się jednak, że tworzenie się lipidowo-białkowych agregatów jest wynikiem działania nie tylko sił jonowych. Wiele uwagi autor poświęcił części apolarnej fosfolipidów, omawiając szczegółowo rodzaje kwasów tłuszczowych. Uważa on bowiem, że rodzaj parafinowego łańcucha fosfolipidu błony komórkowej może być jednym z ważniejszych czynników regulujących przenikanie przez lipidową barierę błon. Układ tego rozdziału jest jasny i przejrzysty. Szczegółowy spis rzeczy ułatwia czytelnikowi zorientowanie się w materiale. Warte podkreślenia są uwagi autora na temat krytycznego oceniania wyników oraz konieczności daleko idącej ostrożności w wyciąganiu wniosków na temat zależności między funkcją biologiczną błony, a składem lipidowym. Ostrożność ta jest konieczna przede wszystkim ze względu na niedoskonałość istniejących metod izolacji błon w stanie nienaruszonym. Szkoda, że uwadze autora i korektorów uszedł błąd we wzorze strukturalnym fosfolipidów (strona 18).

W rozdziale drugim autor omawia zagadnienie molekularnego układu lipidów w błonie. Rozdział ten jest bogato ilustrowany zarówno pięknymi zdjęciami uzyskanymi w mikroskopie elektronowym jak i schematami ułatwiającymi czytelnikowi zrozumienie omawianych teorii. Szczególnie interesująca wydaje się teoria zaproponowana przez Kavanau, której najistotniejszym elementem jest jej dynamiczny charakter. Wg tej teorii kompleks białko-lipoproteidy-lipidy istnieje w paru stanach, łatwo nawzajem przechodzących w siebie. Stan „otwartej konfiguracji” przypomina model oparty na teorii mozaikowej, a stan „zamkniętej konfiguracji” — model dwumolekularnej warstwy lipidowej. Niezbędność fosfolipidów dla funkcjonowania wielu enzymów omówiono krótko ze względu na obfitość prac na ten temat.

Rozdział trzeci i ostatni dotyczy biosyntezy i metabolizmu fosfolipidów. Zagadnienia te przedstawiono zwięźle i jasno. Przejrzyste schematy ułatwiają zorientowanie się w temacie. W rozdziale tym omówiono rolę fosfolipidów w procesie aktywnego transportu.

Cytowana literatura, obejmująca przeszło 500 pozycji zawiera prace publikowane do roku 1963 włącznie.

Na zakończenie warto zwrócić uwagę na fakt, że rozdziały pierwszy i trzeci mogą być zrozumiałe nawet dla czytelnika nie wprowadzonego w omawiane zagadnienia. Natomiast rozdział drugi wymaga pewnego przygotowania.

D. Hulanicka

**R. M. Evans. The Chemistry of the Antibiotics used in Medicine
Oxford, 1965, Pergamon Press, str. x + 226**

Autorem książki jest Dr Evans, członek Królewskiego Instytutu Chemii, pracownik naukowy firmy Glaxo w Anglii. Omawiana praca odnosi się tylko do chemii tych rodzajów antybiotyków (łącznie około trzydziestu), które znalazły zastosowanie w lecznictwie. Jest to zwięzły, jasno podany wykład przede wszystkim o budowie chemicznej i dowodach struktury antybiotyków. Ponieważ szczegółowe sprawozdanie z treści poszczególnych rozdziałów ukazało się w *Acta Biochimica Polonica* (13, R7, 1966) recenzja obecna obejmuje tylko kilka uwag specjalnych.

Dr Evans przyjął typowo biochemiczną klasyfikację antybiotyków zaproponowaną przez Abrahama i Newtona przed kilku laty. Została ona oparta na klasyfikacji głównych prekursorów w biosyntezie antybiotyków. Prekursoramii tymi mogą być aminokwasy (jeden, dwa lub więcej), cukry, jednostki dwu i trójwęglowe (kwas octowy, lub propionowy). Klasyfikację tę można z powodzeniem stosować tylko do tych substancji — których tak struktura jak i drogi biosyntezy zostały poznane.

Znaczna część książki została poświęcona antybiotekom pochodzącym od aminokwasów. Antybiotyki te składają się z kilku do kilkunastu reszt aminokwasowych, które różnią się nie tylko jakościowo od reszt spotykanych w białku, ale często i ich wzajemne wiązania odbiegają od zwykłego wiązania peptydowego. Na sprawę tę autor zwrócił specjalną uwagę. Interesującą i szczegółowo omówił niezwykle wiązania spotykane w częstej bacytracyny A. W sekwencji Ileu-Cys powstaje pierścień tiazolinowy przez związanie siarki cysteiny z węglem karbonylowym izoleucyny; wiązanie powstałe z acylowania obydwu grup aminowych lizyny powoduje rozgałęzienie łańcucha, ponadto na końcu karboksylowym peptydu znajduje się α -amid kwasu asparaginowego, a nie β -amid (asparagina) jak to spotyka się z reguły w białkach. Sprawa wiązań między aminokwasami w polimiksynie została przez Autora obszernie przedstawiona z podkreśleniem dowodów na istnienie wiązania peptydowego między karboksylową grupą jednego aminokwasu i γ -aminową grupą innego (α, γ -dwuaminomasłowego), przez co zamyka się pierścień peptydowy; natomiast druga (α) aminowa grupa tego kwasu jest zacylowana końcową grupą karboksylową bocznego łańcucha peptydowego. W innych grupach antybiotyków zasługuje na uwagę jasny sposób przedstawienia podobieństw struktury między pokrewnymi neomycynami (A, B, C), paromomycynami (I, II) i kanamycynami (A, B, C). W rozdziale omawiającym peptydy znajduje się uproszczony i bardzo przejrzysty sposób przedstawienia syntezy gramicyny S.

Książkę zaopatrzone w kilka schematów ciągów reakcji ilustrujących drogi degradacji lub biosyntezy poszczególnych grup antybiotyków. Przejrzysty sposób przedstawienia materiału stanowić może znaczne ułatwienie dla czytelnika pragnącego zapoznać się z budową omawianych związków. Wartościowa jest tablica zawierająca główne dane o fizycznych własnościach antybiotyków.

Mimo, że książka została wydana w 1965 roku, to literatura przedmiotu tylko w pojedynczych przypadkach obejmuje rok 1964. Ujemną stroną jest także brak skorowidza autorów cytowanego piśmiennictwa.

Prosty i jasny sposób przedstawienia zagadnień strukturalnych sprawia, że książkę Evansa można polecić jako pożyteczne źródło podstawowych wiadomości z chemii antybiotyków stosowanych w lecznictwie.

Tadeusz Korzybski

**The Isoquinoline Alkaloids. K. W. Bentley Oxford: Pergamon Press.
1965, str. vii + 224.**

„A course in Organic Chemistry” wydawany pod redakcją Sir Roberta Robinsona dzieli się na sekcję ogólną (General Section) i zaawansowaną (Advanced Section). Recenzowana książka stanowi XXVI tom Advanced Section i podobnie jak poprzednie jest krótką, zwartą monografią z określonej dziedziny chemii organicznej, napisaną przez doskonałego znawcę przedmiotu. K. W. Bentley pracuje w dziedzinie alkaloidów izochinolinowych przez blisko 20 lat, a jego osiągnięcia w tej dziedzinie są imponujące.

Książka jest przeznaczona dla studentów chemii specjalizujących się w chemii organicznej.

Alkaloidy izochinolinowe dzieli się zwyczajowo na kilkanaście podgrup w oparciu o ściśle podobieństwo strukturalne i ich sposób tworzenia w roślinie.

W recenzowanej książce autor stara się dokonać prezentacji każdej podgrupy na podstawie pokrewieństwa do tych wpierw opisanych. Praca nie miała ambicji zamieszczenia wyczerpującego przeglądu wszystkich związków tej klasy, natomiast dążyła do uwypuklenia metod stosowanych do ustalenia struktury nowych związków pochodzenia naturalnego. Tak więc w każdej podgrupie został wytypowany odpowiedni reprezentant dla przeprowadzenia dedukcji strukturalnej, a z nim z kolei powiązано pozostałych przedstawicieli podgrupy.

Chemiczna budowa alkaloidów jest dedukowana w oparciu o klasyczne metody chemii organicznej, a więc z degradacji związku do prostych fragmentów, których budowę łatwo ustalić, z danych analizy elementarnej i ze znajomości przebiegu stosowanych reakcji chemicznych.

Autor wspomina we wstępie do swej pracy, że dobrze jest, a nawet konieczne uwypuklić w dniu dzisiejszym olbrzymią skuteczność i historyczną wagę metod chemicznych, gdyż nie można dopuścić żeby były one zapomniane w dobie masowej ingerencji metod fizycznych do badań strukturalnych. Zdaniem autora — nowe metody fizyczne stosowane w badaniach strukturalnych napewno ułatwiają i skracają czas tychże, a nawet doprowadzają do rozwiązań precyzyjniejszych — jednakowoż są to metody uzupełniające, a więc nie powinny eliminować metod chemicznych, gdyż ostatecznym dowodem poprawności struktury wydedukowanej z комплекtu danych eksperymentalnych — pozostaje do dnia dzisiejszego — jednoznaczna synteza chemiczna.

Przed przystąpieniem do omówienia poszczególnych podgrup — autor zapoznaje nas z głównymi zabiegami chemicznymi używanymi do degradacji alkaloidów

izochinolinowych i prowadzącymi do prostych rozpoznawalnych związków. Procesy te, to: utlenianie, wyczerpujące metylowanie, piroliza aminotlenków oraz degradacje: Emde i Braun'a. Końcowy rozdział książki poświęcony jest dotychczasowym poglądom na temat biogenezy alkaloidów izochinolinowych.

Książka jest napisana jasno i ilustrowana dużą ilością wzorów strukturalnych (do niektórych zakradły się niestety błędy, np. do wzoru morfiny i kodeiny na str. 91).

Książka jest bardzo cenna dla każdego chemika mającego zamiar pracować w chemii produktów naturalnych.

Pewnym mankamentem jest zupełny brak odnośników literaturowych. Co prawda w większości wypadków dedukcje strukturalne wywodzą się z precyzyjnych danych eksperymentalnych i prowadzą do wniosków bezbłędnych, ale nawet w takich wypadkach słuszniej byłoby ułatwić czytającemu dotarcie do prac źródłowych. Dezyderat ten jest szczególnie aktualny przy rozważaniach strukturalnych opartych na pracach o wątpliwej wartości i prowadzących do wyników dyskusyjnych lub nawet błędnych (taki przypadek ma miejsce w podgrupie: reacyklicyzacja).

Mimo tych usterek książka jest doskonałym podręcznikiem uniwersyteckim dla studentów (doktorantów) specjalizujących się w chemii produktów naturalnych.

Maciej Wiewiórowski

AUTOREFERATY PRAC DOKTORSKICH

Układy enzymatyczne z tkanek owadów czynne w aktywacji fragmentów jednowęglowych

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego, PAN, w Warszawie.

Promotor: Prof. dr ZOFIA ZIELIŃSKA

Uchwała Rady Naukowej Instytutu im. M. Nenckiego nadająca stopień naukowy
doktora nauk przyrodniczych z dnia 4.VI.1966 r.

Fragmenty jednowęglowe aktywowane i przenoszone przez tetrahydrofolan, biotyłę oraz S-adenozylometioninę uczestniczą odpowiednio w biosyntezie składników purynowych i pirymidynowych kwasów nukleinowych, w biosyntezie i interkonwersji wielu aminokwasów oraz reakcjach transmetylacji. Jako „aktywne fragmenty jednowęglowe” określa się na ogół połączenia z tetrahydrofolanem. W organizmach fragmenty jednowęglowe pojawiają się w wyniku interkonwersji oraz przemian szeregu aminokwasów (głównie seryny i glicyny oraz histydyny), podczas degradacji rdzenia purynowego, jak również w wyniku przemian puryn w pterydyny.

W pracy wykazano, że w supernatancie postmitochondrialnym z tkanek owadów (z rzędów *Lepidoptera*, *Orthoptera* i *Hymenoptera*) występują niektóre układy enzymatyczne czynne w syntezie „aktywnych fragmentów jednowęglowych”, a mianowicie: układ oksydoreduktaz folanowych (E.C. 1.5.1.4. i E.C. 1.5.1.3.) katalizujący redukcję folanu do tetrahydrofolanu oraz układy enzymatyczne uczestniczące w syntezie formylotetrahydrofolanu, przy wykorzystaniu mrówczanu względnie grupy hydroksymetylowej seryny, jako źródeł fragmentów jednowęglowych (E.C. 6.3.4.3. oraz E.C. 2.1.2.1. i E.C. 1.5.1.5). Nie udało się natomiast wykryć aktywności układu enzymatycznego przenoszącego na tetrahydrofolan grupę $\text{CH} = \text{NH}$ z formiminoglutaminianu (E.C. 2.1.2.5. i E.C. 4.3.1.4.).

Scharakteryzowano dokładniej własności ligazy mrówczan: tetrahydrofolan (ADP) (E.C. 6.3.4.3.), która przejawiała najwyższą aktywność spośród enzymów biorących udział w syntezie „aktywnego mrówczanu”. Enzym z tkanek *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*), wykazujący najwyższą aktywność przy pH 8,0–8,1 i w temperaturze 37°C , charakteryzują następujące wartości stałych Michaelisa dla substratów $K_m(\text{FH}_4) = 0,57 \times 10^{-3}\text{M}$; $K_m(\text{HCOONa}) = 17,0 \times 10^{-3}\text{M}$; $K_m(\text{ATP}) = 0,13 \times 10^{-3}\text{M}$, oraz synergistycznie działających kationów — $K_m(\text{Mg}^{2+}) = 0,18 \times 10^{-3}\text{M}$;

$K_m(\text{NH}_4^+) = 14,0 \times 10^{-3} \text{M}$. Zbliżone wartości stałych Michaelisa dla ATP i jonów Mg^{2+} oraz dla mrówczanu i jonów Mg^{2+} nasuwają przypuszczenie, że mechanizm syntezy formylotetrahydrofolanu w reakcji katalizowanej przez enzym z tkanek owadów, zbliżony jest do mechanizmu postulowanego dla ligazy mrówczan: tetrahydrofolan z *Clostridium cylindrosporum*. O odmiennych w pewnym stopniu właściwościach badanej ligazy z tkanek owadów świadczy natomiast znaczna termolabilność, pewna wybiórczość w stosunku do czynników redukujących oraz hamowanie przez 4-aminoanalog folanu — aminopterynę. Aminopteryna hamuje działanie ligazy mrówczan: tetrahydrofolan (ADP) z tkanek larw szeregu owadów, nie wywiera zaś wpływu na działanie tego enzymu z poczwerek i form imaginalnych owadów. Rozpatrzono ewentualne możliwości wyjaśnienia tego zjawiska.

Fragmenty pracy referowano na III i IV Sympozjum Towarzystwa Biochemicznego (1964 i 1965) oraz na III Zjeździe FEBS (1966).

Wpływ *Myotriphos Polfa Amp.* na niektóre katalityczne własności krwi ludzkiej

KONSTANTY CHMIELEWSKI

Pracę wykonano w Katedrze Chemii Ogólnej Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie.

Promotor: Prof. dr STEFAN KOTKOWSKI

Uchwała Rady Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Poznaniu nadająca stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych z dnia 10.VI.1966 r.

Celem pracy było stwierdzenie, w jakim stopniu *Myotriphos Polfa* uzupełnia lub zmienia niektóre enzymatyczne własności krwi i czy możliwa jest na tej podstawie charakterystyka leku. Własności *Myotriphos Polfa* różnych serii, oraz preparatu ATP-Homburg badano *in vitro* zarówno bez dodatku jak też i w obecności rozcieńczonej zhemolizowanej krwi ludzkiej, lub surowicy.

Oba leki, także w obecności krwi, zależnie od pochodzenia i serii, w różnym stopniu wpływają na szybkość katalitycznego rozkładu nadtlenu wodoru nie naruszają jednak doświadczalnie sprawdzonego mechanizmu reakcji opisanego

równaniem $\frac{dx}{dt} = k_1 x(1 - x)$

Wyliczone wartości pozorne energii aktywacji wskazują na znaczne ciepło adsorpcji H_2O_2 na koloidalnych cząstkach krwi.

Myotriphos Polfa i ATP-Homburg badane w reakcjach: benzydynowej, gwa-jakolowej, purpurogalinowej i indygokarminowej różnią się znacznie od siebie aktywnością peroksydacyjną. Najwyraźniej różnice te zaznaczają się w reakcji gwajakolowej, w której *Myotriphos Polfa* działa bardzo silnie w przeciwieństwie do ATP-Homburg.

Oba leki wpływają na utlenianie kwasu L-askorbinowego tlenem powietrza (badane w aparacie opisanym w *Rocznikach Chemii* 38, 1397 (1964)), przy czym *Myotriphos Polfa* zwiększa szybkość utleniania, ATP-Homburg zaś początkowo

znacznie przyspiesza reakcję, po pewnym czasie jednak efekt ten zanika. W układzie z krwią *Myotriphos Polfa* nieco aktywuje, ATP-Homburg natomiast wybitnie hamuje utlenianie kwasu L-askorbinowego. Zauważono także różnice w działaniu preparatu *Myotriphos Polfa* z różnych okresów produkcji.

Ceruloplazmina surowicy krwi ludzkiej jak i surowicy z dodatkiem *Myotriphos Polfa* i ATP-Homburg zachowuje mechanizm działania opisany równaniem $\frac{dx}{dt} = k_1 x (1 - x)$. Leki te wpływają jednak na zmianę współczynnika k_1 szybkości reakcji. W przypadku utleniania parafenylenodwuaminy dostrzeżono poważne różnice w oddziaływaniu *Myotriphos Polfa* różnych serii i ATP-Homburg.

Oba leki nie wywierały prawie żadnego wpływu na aktywność aminotransferazy asparaginianowej, a słabo hamowały fosfohydrolazę monoestrów ortofosforanowych.

Myotriphos Polfa aktywuje enzymatyczną hydrolizę skrobi, natomiast hydroliza glikogenu jest aktywowana przez ATP-Homburg.

Zaobserwowane różnice w działaniu identycznych pod względem wskazań leczniczych i deklarowanego składu preparatów różnej produkcji pozwalają na uchwycenie nieraz bardzo subtelnych odchyłań od założonej normy i mogą być pomocne w badaniach nad jakością leków i ich własnościami farmakologicznymi.

Od Redakcji

Z uwagi na szczupłą objętość czasopisma Redakcja zmuszona jest zrezygnować z publikacji autoreferatów prac doktorskich i habilitacyjnych. Uprzejmie prosimy jednak o nadsyłanie nadal informacji zawierających: imię i nazwisko, tytuł pracy, ośrodek, w którym praca została wykonana, nazwisko promotora, uzyskany tytuł w pełnym brzmieniu oraz datę prawomocnej uchwały Rady Wydziału lub Rady Naukowej. Informacje prosimy przekazywać doc. dr J. Trojanowskiemu (Katedra Biochemii UMCS, Lublin, ul. Akademicka 12). Będą one ogłaszane w *Postęпах Biochemii* w odpowiednim dziale Kroniki PTBioch.

SPRAWOZDANIA I KOMUNIKATY

Sprawozdanie z pokazu aparatury spektrofotometrycznej UNICAM

Pokaz zorganizowany przez Podkomisję Analizy Spektralnej Komisji Analitycznej PAN wspólnie z firmą *Unicam Instruments Ltd.* Cambridge, Anglia, odbył się w Instytucie Włókien Sztucznych i Syntetycznych w Łodzi w dniach 15—16.XI.1965 roku i obejmował wykłady oraz demonstrację działania przyrządów. Podczas wykładów omówiono zasady budowy spektrofotometrów firmy *Unicam* do badań w podczerwieni, świetle widzialnym i nadfioletowym oraz do badań atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej. Dokonano oceny możliwości przyrządów, podano nowości techniczne i udoskonalenia wprowadzone w ostatnim czasie. Omówiono także najczęściej popełniane błędy przy obsłudze spektrofotometrów, podano techniczne szczegóły przygotowania próbek do badań i na końcu przedyskutowano zastosowanie poszczególnych typów aparatów. W ostatnim czasie wyprodukowano nowe modele SP 200G i SP 800, a zaniechano produkcji próżniowego, rejestrującego spektrofotometru do badań w podczerwieni, modelu SP 100G.

Na podstawie pokazu wydaje się, że wysiłki zmierzające do rozwoju tego typu aparatury idą w kierunku:

- uproszczenia obsługi przez częściowe zaprogramowanie pracy przez producenta (przyrządy, które może obsługiwać każdy chemik czy biochemik, a nie tylko specjalista);
- obniżenia ceny, przez zastosowanie prostszych rozwiązań technicznych, co obniża jednak klasę dokładności (przyrząd podręczny do rutynowych analiz);
- budowania przyrządów, w których oprócz podstawowego aparatu istnieje szereg przystawek do specjalnych celów, zmieniających go w wszechstronny lub zautomatyzowany przyrząd. Obserwuje się nacisk odbiorców by dostarczane przystawki umożliwiały pracę z możliwie jak najmniejszymi ilościami substancji.

Ta nowa klasa przyrządów znajduje zastosowanie do badań seryjnych, do oznaczeń, gdzie nie jest wymagana wysoka dokładność i precyzja, zastępując tutaj, nadal zresztą produkowane przyrządy klasy badawczej. Wydaje się, że perspektywy dalszego rozwoju sprowadzają się nie tyle do polepszenia optyki przyrządu, ile do dalszego rozwoju urządzeń elektronicznych, co nie przeszkadza oczywiście wprowadzaniu przystawek wykorzystujących nowe metody spektrofotometriowania, np. metody ATR. Rozwój urządzeń elektrotechnicznych zmierza do pełnej automatyzacji pomiaru z podaniem wyników włącznie. Obecnie przygotowuje się nowe modele, w których wyniki podawane będą w postaci wyników cyfrowych lub karty perforowanej, co umożliwi analizę ich w maszynie cyfrowej.

W dziedzinie spektrofotometrów do badań w podczerwieni nastąpił dalszy postęp w pracy z mikropóbkami oraz z próbkami rozpuszczonymi w wodzie. Obecnie można już widmo w podczerwieni uzyskać z 1 μg substancji, a także korzystać z kiuwet o wydrążonej ultradźwiękami komorze wielkości 1 μl . Do badań frakcji uzyskiwanych z chromatografu gazowego zastosowano polietylenowy kolektor mikropórek, przy czym widmo 2 μl frakcji, zdejmuje się bezpośrednio w kapilarze polietylenowej bez przenoszenia próbki. Do standardowych przyrządów wprowadzono przystawkę SP 240, pozwalającą badać „osłabione całkowite odbicie” (at-

tenuated total reflectance—ATR). W opracowanej przez Fahrenforta w 1958 roku metodzie ATR, bada się widmo promieni odbitych od powierzchni badanego ośrodka w zjawisku całkowitego wewnętrznego odbicia. Metoda ta znalazła zastosowanie do identyfikacji substancji, a czyni się próby wykorzystania jej dla celów ilościowych. Ponieważ widmo ATR pochodzi od powierzchniowych warstw substancji, można badać substancje nieprzezroczyste albo rozpraszające światło. Znalazło to zastosowanie do badania powłok np. lakierów czy tworzyw sztucznych. Nowszy model SP 200G jest podręcznym spektrofotometrem do prostych badań identyfikacyjnych w podczerwieni. Jest podobny do modelu SP 200, zaopatrzony jest w dwie siatki dyfrakcyjne, ma nieco większą rozdzielczość, ale i nieco mniejszy zakres widma.

Z nowości omawianych na pokazie w dziedzinie nadfioletu i światła widzialnego należy wymienić: spektrofotometr rejestrujący, SP 800, do badań w nadfiolecie i w świetle widzialnym w zakresie 190—850 m μ . W porównaniu z SP 700 jest to przyrząd bardziej uproszczony i dlatego tańszy, o mniejszym zakresie widma, mniej dokładny (dokładność odczytu $\pm 0,02$ jednostek absorpcji), a równocześnie łatwiejszy w obsłudze i po zastosowaniu przystawek o znacznie zwiększonych możliwościach pomiaru. Aparat ten służy do rutynowych prac jakościowych oraz do prac ilościowych wymagających dokonywania pomiarów przy kilku długościach fal. Do ilościowej analizy mieszanin za pomocą analizy matematycznej krzywych absorpcji lub do dokładnych badań kinetycznych należy jednak korzystać z modelu SP 700. Aparat posiada dwie pozycje do umieszczenia kiuwet: pierwsza, dalej od detektora, przeznaczona jest do normalnych analiz, w drugiej zaś, blisko detektora, światło zostaje zogniskowane w środku kiuwety, a większość promieniowania rozproszonego pada na blisko położone okienko detektora. Ta druga pozycja jest szczególnie przydatna do pomiaru rzeczywistej absorpcji próbek mętnych lub rozpraszających światło. Oprócz standardowego wyposażenia produkuje się przystawki, które zmieniają aparat w wszechstronny i zautomatyzowany przyrząd, nadający się szczególnie do badań biochemicznych (kinetyka reakcji, rozdziały w gradiencie gęstości, rejestrowanie wycieku z kolumny chromatograficznej). Inne rodzaje produkowanych przystawek służą do rozszerzania skali, do badań w stałej temperaturze, oraz do badań światła odbitego, światła rozproszonego i badań fluorymetrycznych. Podobną ideę uproszczonego modelu zasadniczego oraz szeregu przystawek realizują również inne firmy, jak np. firma *Beckmann*, która wypuściła model DB. Koszt zasadniczego przyrządu SP 800 wynosi 1.875 funtów, a jednak zakup większości przystawek, które czynią ten przyrząd pełnowartościowym zwiększa jego cenę prawie o połowę. Do spektrofotometrów punktowych SP 500 i SP 600 wyprodukowano nowe przystawki: SP 525, która pozwala prawie automatycznie przenosić badany roztwór do kiuwety, oraz SP 549 zastępującą niewygodne suche bakterie.

Dalszy postęp zaznacza się także w dziedzinie atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej. Zastosowanie lampy wielopierwiastkowej oraz automatycznej głowicy z szeregiem lamp emisyjnych ułatwia zmianę lampy. Jak wiadomo, dla każdego analizowanego pierwiastka potrzebna jest inna lampa emisyjna. Duża poprawa czułości aparatury nastąpiła po opracowaniu impulsowych lamp modulowanych o dużym natężeniu światła. Wprowadzenie elektronicznego kodowania prądu detektora i lampy o wyładowaniach impulsowych polepszyło oddzielenie promieniowania lampy od emisji tła płomienia. Wprowadzono automatyczny zmieniacz próbek. Opracowano nowy model SP 90.

Zorganizowanie pokazu było celowe, ponieważ umożliwiło zebranych krytyczną ocenę własnego postępowania przy oznaczeniach spektrofotometrycznych i pozwoliło na szybkie zorientowanie się w nowościach aparatury spektrofotometrycznej.

Jerzy Bogajewski

KRONIKA PTBioch

Informacje zamieszczone w Kronice nie mają charakteru kompletnych sprawozdań. Celem Kroniki jest dostarczenie możliwie aktualnych informacji z życia Oddziałów naszego Towarzystwa. Materiały do Kroniki prosimy nadsyłać na adres: doc. dr J. Trojanowski, Lublin, ul. Akademicka 12, Katedra Biochemii UMCS.

J. Trojanowski

I. Zebrania naukowe w Oddziałach PTBioch

Oddział w Gdańsku:

23.III.66 Rybonukleazy zwierzęce i ich naturalny inhibitor (dr Alicja Bardoń).

Oddział w Lublinie:

18.XI.65 Nowe koncepcje biogenezy humusu (doc. dr J. Trojanowski).

11.III.66 Właściwości fizjologiczne haptoglobiny (dr J. Tomaszewski).

2.IV.66 Biochemiczny mechanizm rozkładu drewna przez grzyby (inż. R. Soppo, Bratysława, Czechosłowacja).

12.V.66 Synteza peptydów w fazie stałej (doc. dr M. Kański, Łódź).

Oddział w Szczecinie:

30.III.66 Współczesne metody badania aminooksydaz (dr B. Rózycki).

Oddział w Warszawie:

21.III.66 Niektóre problemy kontroli biosyntezy białka (doc. dr P. Szafranski).

25.VII.66 Radiation — Mutation and Repair in Bacteria (prof. dr Evelin Witkin, Nowy Jork, USA).

Oddział we Wrocławiu:

27.IV.66 Biogeneza niektórych metabolitów *Myrothecium roridum* (dr A. Siewiński).

II. Kronika personalna

1. Oddział w Lublinie:

S. Szczepaniak, adiunkt Katedry Chemii Ogólnej A. M., uzyskał stopień doktora nauk przyrodniczych.

2. Oddział w Warszawie:

doc. dr P. Włodawer i doc. dr Z. Zielińska z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN uzyskały tytuły profesora nadzwyczajnego. Dr Maria J. Piechowska z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, dr J. Kościelak i dr K. Murawski z Instytutu Hematologii w Warszawie, oraz dr St. Lewak z Katedry Biochemii U. W. uzyskali stopień docenta biochemii.

III. Nagrody naukowe

Doc. dr J. Kościelak z Instytutu Hematologii, Warszawa, otrzymał nagrodę naukową Wydziału VI PAN za prace nad budową substancji grupowych A i B z krwinek czerwonych.

IV. Staże zagraniczne

1. Dr St. Buraczewski z Warszawy odbył długoterminowy staż naukowy w *National Institute for Research in Dairying*, Shinfield, Anglia.
2. Dr E. Grochowska z Warszawy przebywała przez rok w Instytucie Medycyny Zapobiegawczej im. Listera, Londyn, Anglia.
3. Dr W. Jachymczyk z Warszawy przebywa na długoterminowym stażu w *Indiana University*, Lafayette, USA.
4. Dr J. Łobarzewski z Lublina odbył 8 miesięczny staż naukowy w Instytucie Biochemii WAN, Budapeszt, kierowanym przez prof. Strauba.
5. Dr J. Malec z Warszawy przebywała przez 3 miesiące w Zakładzie Chemii Fizycznej *Chester Beatty Institute*, London, Anglia.
6. Dr Z. Porembska z Warszawy odbyła długoterminowy staż naukowy w *Collège de France, Laboratoire de Biochimie*, Paryż, Francja.
7. Dr T. Szymczyk z Warszawy odbyła 8-miesięczny staż naukowy w *Istituto Superiore di Sanita, Centro Internazionale di Chimica Microbiologica*, Rzym, Włochy.

SPIS TREŚCI

B. Grzelakowska-Sztabert — Drogi biosyntezy pterydyn i tetrahydrofolanu	3
G. Palamarczyk-Leszczyńska, A. M. Konecka — D(-)mleczanowe dehydrogenazy drożdży	19
A. M. Konecka, G. Palamarczyk-Leszczyńska — Budowa i mechanizm działania cytochromu b_2	31
Z. Prasał — Ceruloplazmina	43
J. Gruda — O mechanizmie enzymatycznej hydrolizy ATP przez miozynę	61
A. J. Hłyńczak, J. Sysa — Związki fosforanowe krwinek czerwonych człowieka i zwierząt	83
T. Mikulski — Widma absorpcyjne fotoreceptorów siatkówki oka ludzkiego	95
W. Makarewicz — Powstawanie i wydalenie produktów azotowych u ryb	99
Recenzje książek (D. Hulanicka, T. Korzybski, M. Wiewiórowski)	111
Autoreferaty prac doktorskich (B. Grzelakowska-Sztabert, K. Chmielewski)	115
Sprawozdanie z pokazu aparatury spektrofotometrycznej UNICAM (J. Bogajewski)	119
Kronika PTBioch	121

W 2-gim zeszycie tego tomu ukażą się:

1. Fotochemiczne przemiany kwasów nukleinowych, K. L. Wierzchowski
2. Fotochemia związków flawinowych, S. Paszyc
3. Biologiczne skutki promieni U. V. u mikroorganizmów, I. Pietrzykowska
4. Chemiluminescencja w biologii, J. Sławiński
5. Lumisynteza, A. Zurzycka
6. Wpływ światła na strukturę aparatu fotosyntetycznego, J. Zurzycki
7. Formy chlorofilu *in vivo* i ich rola w fotosyntezie, S. Więckowski
8. Molekularna struktura chloroplastów, a światło, J. W. Szarkowski, T. Golański
9. Leon Marchlewski, W. Ostrowski

POSTĘPY BIOCHEMII

January 1967

ARTICLES IN POLISH

Volume 13

Number 1

B. Grzelakowska-Sztabert — The Pathways of Biosynthesis of Pteridines and Tetrahydrofolate (Dep. Biochem. Inst. Exp. Biol. PAN, Warszawa)	3
G. Palamarczyk-Leszczynska, A. M. Konecka — D(-)Lactic Acid Dehydrogenases of Yeast (Dep. Biochem. Med. School, Warszawa) . .	19
A. M. Konecka, G. Palamarczyk-Leszczynska — The Structure and Function of Cytochrom b ₂ (Dep. Biochem. Med. School, Warszawa)	31
Z. Prasał — Ceruloplazmin (Dep. Chem. Physiol. Med. School, Lublin) .	43
J. Gruda — On the Mechanism of ATP Hydrolysis by Myosin (Dep. Biochem. Inst. Exp. Biol. PAN, Warszawa)	61
A. J. Hłyńczak, J. Sysa — Phosphate Compounds of Human and Animal Erythrocytes (Dep. Physiol. Army Med. School, Łódź)	83
T. Mikulski — Absorption Spectrum of Retinal Photoreceptors in the Human Eye (Dep. Med. Physics. Med. School, Szczecin)	95
W. Makarewicz — The Production and Excretion of Waste Nitrogen Compounds in Fishes (Dep. Chem. Physiol. Med. School, Gdańsk) . .	99
Chronicle	121



Należy podawać kolejno: L. p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., J. Biol. Chem. 202 793 (1953). Wykaz skrótów tytułów czasopism podają *Post. Biochem.*, 7, 601 (1961). Cytując książki należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora(ów), tytuł, miejsce i rok wydania; np.: Przyłęcki S. J., Podręcznik Chemii Fizjologicznej, Łódź, 1947. Cytując artykuły w pracy zbiorowej należy podać po tytule tom i nazwiska wydawców, oraz na końcu stronicę; np. Schneider W. C., w *Methods in Enzymology*, tom III, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, New York, 1957, str. 680.

SPIS TREŚCI

B. Grzelakowska-Sztabert — Drogi biosyntezy pterydyn i tetrahydrofolanu	3
G. Palamarczyk-Leszczyńska, A. M. Konecka — D(-)mleczanowe dehydrogenazy drożdży	19
A. M. Konecka, G. Palamarczyk-Leszczyńska — Budowa i mechanizm działania cytochromu b_2	31
Z. Prasał — Ceruloplazmina	43
J. Gruda — O mechanizmie enzymatycznej hydrolizy ATP przez miozynę	61
A. J. Hłyńczak, J. Sysa — Związki fosforanowe krwinek czerwonych człowieka i zwierząt	83
T. Mikulski — Widma absorpcyjne fotoreceptorów siatkówki oka ludzkiego	95
W. Makarewicz — Powstawanie i wydalenie produktów azotowych u ryb	99
Recenzje książek (D. Hulanicka, T. Korzybski, M. Wiewiórowski)	111
Autoreferaty prac doktorskich (B. Grzelakowska-Sztabert, K. Chmielewski)	115
Sprawozdanie z pokazu aparatury spektrofotometrycznej UNICAM (J. Bogajewski)	119
Kronika PTBioch	121