

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

PSTBAH 22 (3)
245-436 (1976)

1976

tom 22 nr 3



PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

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

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

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

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

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

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

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

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

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

W. J. Jankowski

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

KWARTALNIK

1976 TOM 22 ZESZYT 3

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Psibah 22(3)
(245-436) (1976)

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

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

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

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

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Landman-Balińska

KOMITET REDAKCYJNY

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

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

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

I. Szumiel (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1976

Nakład 2170 (2070+100)

Ark. wyd. 14,5, ark. druk. 12,0

Pap. druk. sat. imp. kl. V, 65 g, 70×100

Zam. nr 595/76

J-105

Oddano do składania 23.IV.76 r.

Podpisano do druku we wrześniu 1976 r.

Druk ukończono we wrześniu 1976 r.

Cena zł 20,—

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Pamięci

Profesora dr hab. Witolda Brzeskiego

ZBIGNIEW KANIUGA *)

Regulacja włączania CO₂ w procesie fotosyntezy **

Regulatory Mechanisms in Photosynthetic Fixation of CO₂

W końcu lat 50-tych, gdy znano już cykl Calvina i wykrytą przez Arno-
na syntezę ATP i NADPH w izolowanych chloroplastach, mogło się wy-
dawać, że proces fotosyntezy został już w zasadzie wyjaśniony. Wkrótce
jednak ten optymizm okazał się przedwczesny. Ostatnie dziesięciolecie do-
starczyło bowiem wielu niezwykle istotnych odkryć dotyczących procesu
fotosyntezy. W okresie tym wykryto u pewnych roślin bardzo wydajny
mechanizm włączania CO₂, uzyskano interesujące dane dotyczące transpor-
tu metabolitów przez błonę chloroplastu, mechanizmu regulacji cyklu Cal-
vina oraz utraty CO₂ w procesie fotooddychania. O intensywności badań
wykonanych w latach 1965—75 mogą świadczyć liczne opracowania prze-
glądowe opublikowane w ostatnich pięciu latach. I tak oprócz artykułów
ogólnych omawiających drogę węgla w fotosyntezie (1—9, 12), inne doty-
czyły w całości lub w znacznej części transportu metabolitów przez bło-
nę chloroplastów (100, 11), występowania w pewnych roślinach mechaniz-
mu włączania CO₂ nowym szlakiem opisanym przez H a t c h a, S l a c k a,
i K o r t s c h a c k a (1, 12, 13), zależności między budową anatomiczną
liści a typem procesu fotosyntezy (14—16), ekologicznych aspektów tego
procesu (17), badania regulacji włączania CO₂ w cyklu Calvina (18—20),

*) Prof. dr hab., Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Żwirki i Wigury 93,
02-089 Warszawa.

**) Referat sympozjalny wygłoszony na XIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa
Biochemicznego, Toruń, 4—7 wrzesień, 1975 r.

Wykaz stosowanych skrótów: 3-PGA — 3-fosfoglicerynian; G-3-P — aldehyd 3-fos-
foglicerynowy; DHAP — fosforan dwuhydroksyacetonu; R-5P — rybozo-5-fosforan;
Ru-5P — rybulozo-5-fosforan; Xu-5P — ksylulozo-5-fosforan; RuDP — rybulozo-1,5-
dwufosforan; 6-1P — glukoza-1-fosforan; G-6P — glukoza-6-fosforan; F-6P — frukto-
zo-6-fosforan; FDP — fruktozo-1,6-dwufosforan; 6-PGlu — 6-fosfoglukonian; S-7P —
sedoheptulozo-7-fosforan; SDP — sedoheptulozo-1,7-dwufosforan; PEP — fosfoenolopi-
rgronian; P_i — ortofosforan; DHE-TPP — pirofosforan 1,2-dwuhydroksyetylotiaminy.
Witamina K₅ — 4-amino-2-metylo-1-naftochinon.

właściwości karboksylazy RuDP (21—23), zjawiska fotooddychania (24—27), powodującego w niektórych przypadkach do 50% strat włączonego CO_2 , biosyntezy glikolanu (5, 9, 26, 27) — głównego prekursora CO_2 w tym procesie, a także wpływu tlenu na fotosyntezę (28).

W niniejszym artykule zostaną przedstawione cztery główne zagadnienia związane z regulacją włączania CO_2 w procesie fotosyntezy i strat CO_2 w wyniku fotooddychania.

I. Transport metabolitów, koenzymów i jonów przez błonę chloroplastu

I-1. Preparaty izolowanych chloroplastów

Badania na przemieszczaniem się metabolitów fotosyntezy i oddychania przez podwójną błonę zwaną osłonką chloroplastu rozpoczęły się w połowie lat sześćdziesiątych w wyniku opracowania metod izolowania nieuszkodzonych chloroplastów (29—31). Preparaty chloroplastów otrzymane poprzednimi metodami, mimo katalizowania fosforylacji fotosyntetycznej nie włączały CO_2 zupełnie lub tylko w niewielkim stopniu (2—3 $\mu\text{mole/mg}$ chlorofilu/godz.). Okazało się bowiem, że czynnikiem warunkującym zachowanie osłonki chloroplastów jest odpowiednie środowisko izolacyjne, którego głównym składnikiem jest izotoniczny roztwór sacharozy (30, 31), mannitolu lub sorbitolu (32, 33). Dzięki wprowadzonym zmianom izolowane chloroplasty asymilowały CO_2 z szybkością ponad 100 $\mu\text{moli/mg}$ chlorofilu/godz. (30, 34). Poddanie takich chloroplastów szokowi osmotycznemu pozbawia je osłonki (33, 35) i powoduje prawie całkowitą utratę zdolności włączania CO_2 (35) i związanego z tym wydzielania tlenu (36). Szok osmotyczny uniemożliwia również wydzielanie tlenu, gdy substratem jest dodany 3-fosfoglicerynian (36). Uzyskanie preparatów chloroplastów w 100% nieuszkodzonych jest prawie niemożliwe, łatwiej natomiast otrzymać preparat chloroplastów całkowicie pozbawionych osłonki. Z tych względów zaproponowano kryteria jakości (37, 38) określające preparaty o znacznej liczbie chloroplastów nienaruszonych jako preparaty klasy A (lub I) oraz o zmiennym stosunku uszkodzonych jako klasy B (lub II) oraz pozbawionych osłonki jako preparaty klasy C (lub III). Preparaty chloroplastów klasy C nie włączają CO_2 i nie wydzielają tlenu spowodowanego włączeniem CO_2 lub przemianami egzogennej 3-PGA, katalizują natomiast fosforylację fotosyntetyczną i wydzielanie tlenu związane z transportem elektronów.

Obserwacje te wskazywały na istotne znaczenie nienaruszonej struktury podwójnej błony chloroplastów, która wybiórczo przepuszcza niektóre metabolity a nie przepuszcza innych, co ma podstawowe znaczenie

w regulacji fotosyntetycznego włączania CO₂. Regulacja ta dotyczy między innymi mechanizmów, pozwalających w sposób pośredni określać przemieszczanie niektórych metabolitów przez błonę chloroplastów.

I-2. Metody badania transportu

Badania nad translokacją metabolitów przez błonę chloroplastów stały się możliwe dzięki opracowaniu wielu metod umożliwiających ilościowe śledzenie tego procesu (10). Metody te można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Metody pierwszej grupy polegają na badaniu rozmieszczenia i przemieszczania się związków *in vivo* z zastosowaniem frakcjonowania składników komórki w środowisku niewodnym, a następnie kinetycznych pomiarach poziomu substratów i ich rozmieszczenia (39—41) względnie kinetycznych pomiarach rozmieszczenia związków znacznikowych (41—43). Należą tu również metody polegające na frakcjonowaniu składników komórki w środowisku wodnym i pomiarze ilości badanych związków w nie-naruszonych chloroplastach po szybkim ich wyizolowaniu (44). Metody drugiej grupy polegają na badaniu rozmieszczenia metabolitów i ich przemieszczania się *in vitro*, bądź w sposób bezpośredni i zastosowaniu chloroplastów wyizolowanych w środowisku wodnym i oznaczeniu rozmieszczenia metabolitów lub związków znacznikowych we frakcji chloroplastowej i w środowisku (45, 46), bądź w sposób pośredni badając reakcję metaboliczną chloroplastów na dodanie odpowiednich metabolitów (6, 11, 23, 47). Przegląd i krytyczną ocenę przydatności wymienionych metod podają Heber (10) i Walker (11).

Tabela I

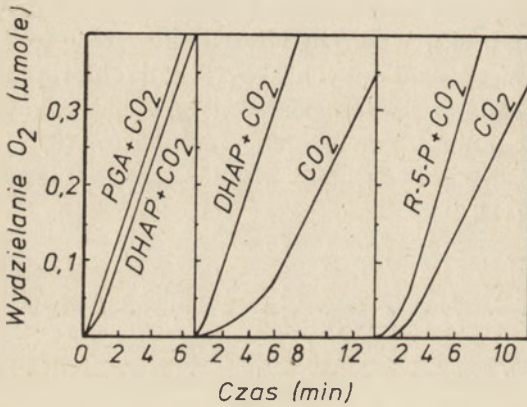
Zawartość znakowanych metabolitów we frakcji chloroplastowej i rozpuszczalnej po 3 i 7 minutach fotosyntezy z zastosowaniem ¹⁴CO₂ (45)

Metabolit	Stosunek zawartości metabolitu supernatant/osad*)	
	Po 3 min.	Po 7 min.
Sedoheptulozo-7-fosforan	0,06	0,2
Fruktozo-6-fosforan	0,4	0,37
Glukozomonofosforan	0,13	0,5
Rybulozo-1,5-dwufosforan	0,4	1,2
Sedoheptulozo-1,7-dwufosforan	2,0	2,5
3-fosfoglicerynian	4,8	16,6
Aldehyd 3-fosfoglicerynowy	znaczny	znaczny
Fosforany pentoz	8,5	14,7
Glikolan	5,5	77,0
Fosfodwuhydroksyaceton	42,5	72,0
Fruktozo-1,6-dwufosforan	5,5	77,0

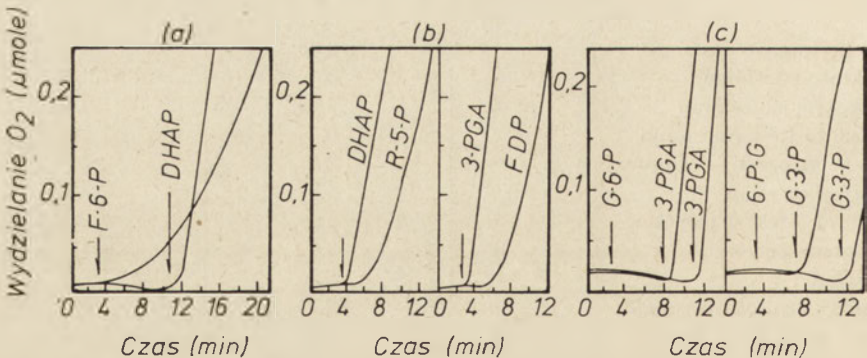
*) Gdy związek łatwo przenika przez błonę chloroplastu, wówczas wartości stosunku będą wysokie, jeśli zaś przenika słabo wartości stosunku będą niskie.

Izolowanie chloroplastów w środowisku niewodnym rozwinięte przez Stockinga (31a, 43) i Hebera (39) polega na podawaniu liściom $^{14}\text{CO}_2$, zamrażaniu ich w ciekłym powietrzu i frakcjonowaniu w niewodnym środowisku aby zapobiec wypływowi z chloroplastów (i innych organelli) związków rozpuszczalnych w wodzie. Technika rozwinięta w laboratorium Calvina a następnie zastosowana przez Basshama (45) do chloroplastów polega na krótkiej fotosyntezie w atmosferze $^{14}\text{CO}_2$ i badaniu rozmieszczenia znakowanych metabolitów we frakcjach rozpuszczalnej i chloroplastowej za pomocą analizy chromatograficznej. Wyniki takich oznaczeń podaje tabela 1.

Heldt (46, 48) zastosował do chloroplastów technikę bezpośrednich pomiarów znakowanych związków, stosowaną uprzednio do mitochondriów. Polega ona na inkubacji chloroplastów z radioaktywnymi związkami i wirowaniu przez olej silikonowy w celu usunięcia nie pobranego przez chloroplast znakowanego związku. Chloroplasty można następnie przenieść do nowego środowiska i w ten sposób badać przenikanie metabolitów do chloroplastów lub ich wypływanie z tych organelli.



Ryc. 1. Skracanie okresu indukcji włączania CO_2 przez pośredniki cyklu Calvina (49).



Ryc. 2. Cofanie inhibicji wywołanej ortofosforanem przez fosforany cukrów (50).

Przykładem metod pośrednich stosowanych w badaniach transportu metabolitów jest oznaczanie czasu skracania indukcji przez dodany pośrednik cyklu Calvina (2, 6, 11, 23) (Ryc. 1) lub cofanie inhibicji włączania CO₂ przez chloroplasty wywołanej obecnością ortofosforanu (11) Ryc. 2). Izolowane chloroplasty bezpośrednio po naświetleniu nie włączają CO₂ i wydzielają tlen bardzo powoli. Szybkości tych procesów wzrastają dopiero po okresie 1—3 minut indukcji. Opóźnienie włączania CO₂ jest prawdopodobnie wynikiem braku wystarczającej ilości pośredników w cyklu Calvina redukcji CO₂ (2, 6, 23, 49). Skrócenie okresu zastoju można uzyskać przez dodanie pośredników cyklu tj. 3-PGA, DHAP, R-5P, co tłumaczy się wejściem tych związków do chloroplastów (Ryc. 1).

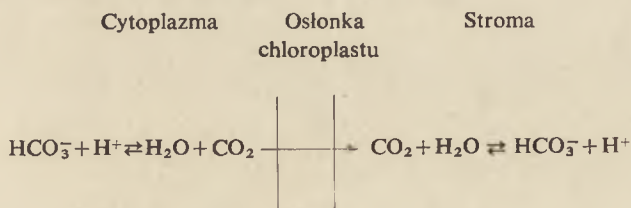
W obecności ortofosforanu w stężeniu większym niż 10⁻⁶M okres zastoju jest tak długi, że fotosynteza praktycznie ustaje. Cofnięcie inhibicji (Ryc. 2) po podaniu pośredników cyklu Calvina można uważać za dowód ich przenikania do chloroplastów (11, 50). Najszybciej następuje to po dodaniu DHAP i 3-PGA, podczas gdy F-6P, G-6P, Ru-5P i FDP przenikają znacznie wolniej.

I-3. Transport CO₂

Dwutlenek węgla rozpuszczony w wodzie ulega hydratacji w reakcji katalizowanej przez anhidrazę węglanową lub przez różne jony nieorganiczne np. ortofosforan:



W fizjologicznym zakresie pH dwutlenek węgla występuje w podanych wyżej formach, a wraz ze zmianą pH zmienia się stężenie ponu HCO₃⁻, wzrastając z 5% przy pH 5 do 95% przy pH 8. Łatwe przechodzenie jednej formy w drugą utrudnia ustalenie, którą formę wykorzystują rośliny w fotosyntezie — wolny CO₂ czy jon HCO₃⁻. Doświadczenia różnego typu, omówione ostatnio krytycznie przez Walke^{ra} (11) wykazały, że dwutlenek węgla przechodzi przez błonę chloroplastu nie jako jon HCO₃⁻, lecz jako wolny CO₂ zgodnie z reakcją:



postulowaną przez Werdana i Heldta (51) na podstawie bezpośrednich pomiarów i obliczeń wielkości stromy. Powstawanie w stromie jonu HCO₃⁻, wzmagająca tam bardzo aktywna anhidraza węglanowa (52) oraz alkalizacja środowiskowa spowodowana przemieszczaniem się protonów pod wpływem światła. To łączne działanie wytwarza rodzaj „pom-

plastu. Dane te wskazują, że bezpośredni transport ADP i ATP przez błonę chloroplastu nie może mieć istotnego znaczenia w procesie fotosyntezy, mimo wielu poprzednich danych, które na taką możliwość zdawały się wskazywać. Okazało się bowiem (41, 54, 55), że ADP i ATP są transportowane za pośrednictwem wahadłowo przenoszonych fosforanów trioz — G-3P i DHAP, które jednocześnie przenoszą równoważniki redukujące. DHAP utworzony w chloroplastach w wyniku przekształcenia 3-PGA przy udziale ATP i NADPH (Ryc. 3, ciąg reakcji a) przenika do cytoplazmy, gdzie jest utleniany poprzez G-3P i 1,3-PGA do 3-PGA, w wyniku czego powstaje NADH i otwiera się cząsteczka ATP (ciąg reakcji c). 3-PGA powraca następnie do chloroplastu i może ulegać ponownej redukcji do fosforanu trioz kosztem powstałych w procesie fotosyntezy NADPH i ATP. Ostatecznym wynikiem działania tego mechanizmu wahadłowego jest transport ATP i równoważników redukujących, dzięki czemu można obserwować na świetle wzrost zawartości cytoplazmatycznego ATP i jej spadek w ciemności, a także wykorzystywanie w procesach cytoplazmatycznych ATP powstającego w chloroplastach.

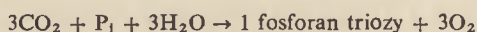
Metabolitem, który w cyklu Calvina przenika do cytoplazmy gdzie zostaje zużyty do syntezy sacharozy jest DHAP (Ryc. 3, ciąg reakcji d). Wprowadzie 3-PGA może przenikać przez błonę chloroplastu tak samo szybko jak DHAP, to jednak w rzeczywistości 3-PGA nie jest transportowany do cytoplazmy, ponieważ wówczas musiałby temu towarzyszyć transport równoważników redukujących niezbędnych do jego przekształcania w DHAP. Proces redukcji 3-PGA do G-3P zachodzi więc w chloroplastach (Ryc. 3, ciąg reakcji a) (10).

I-5. Transport NADP i NADPH

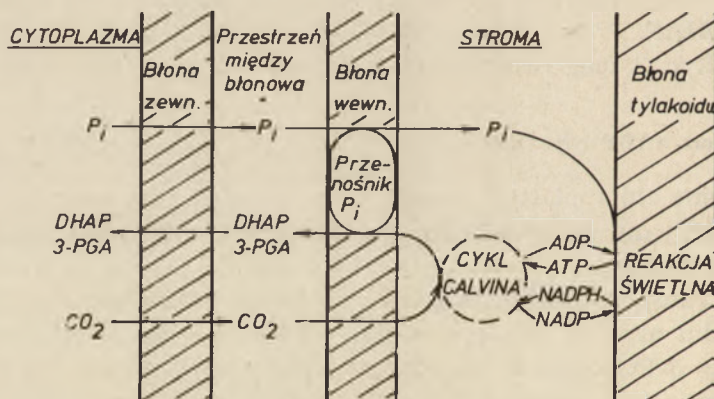
Izolowane chloroplasty o nienaruszonej osłonce nie redukują egzogenego NADP i nie wydzielają tlenu. Chloroplasty natomiast poddane szokowi osmotycznemu (zniszczone osłonki) katalizują obie te reakcje (39, 59—61). Transport równoważników redukujących zachodzi więc w sposób pośredni albo za pośrednictwem fosforanów trioz tworzących układ wahadłowy 3-PGA/DHAP, czemu towarzyszy przeniesienie do cytoplazmy fosforanu (por. rozdział I-4), albo przy udziale przenośnika kwasów dwukarboksylowych tj. układu wahadłowego jabłczan/szczawiooctan (57, 58). Jak widać z ryciny 3 (reakcja b) jabłczan jest donorem a szczawiooctan akceptorem równoważników redukujących i pośrednicząc w ich przemieszczaniu przez błonę tworzą układ wahadłowy między chloroplastową i cytoplazmatyczną pulą NAD(H). Układ wahadłowy jabłczan/szczawiooctan stwierdzono na przykład w procesie redukcji NAD w oświetlonych nienaruszonych chloroplastach w obecności szczawiooctanu, w utlenianiu przez mitochondria chloroplastowego NADPH, oznaczając stosunek jabłczan/asparaginian w chloroplastach na świetle i w ciemności (10, 11).

I-6. Transport fosforanu

Asymilacja CO_2 do poziomu cukrów w procesie fotosyntezy nie jest procesem wymagającym fosforanu. Jednakże, jeśli w środowisku izolowanych chloroplastów nie ma fosforanu, wówczas włączanie CO_2 i związane z tym wydzielanie O_2 zanika w ciągu kilku minut po rozpoczęciu oświetlenia (62). Dodanie fosforanu wznawia fotosyntezę bez znacznego opóźnienia, analogicznie jak dodanie CO_2 do preparatu chloroplastów w układzie pozbawionym tego składnika (49, 63), a ilości wydzielonego tlenu są trzykrotnie wyższe niż dodanego ortofosforanu (62). Stosując $^{14}\text{CO}_2$ i $^{32}\text{P}_i$ (64) stwierdzono, że głównym produktem przy krótkiej fotosyntezie w izolowanych chloroplastach jest DHAP powstający w reakcji:



Przy znacznym i łatwym przenikaniu fosforanu triozy przez błonę chloroplastów (równym 1/3 szybkości transportu CO_2) i ciągłym procesie asymilacji CO_2 na każdą cząsteczkę fosforanu triozy przeniesioną do cytoplazmy, jedna cząsteczka fosforanu zostaje pobrana przez chloroplast. Mechanizm ten potwierdzono doświadczalnie (55, 65) wykazując istnienie w błonie chloroplastów przenośnika fosforanu, który przenosi również DHAP i 3-PGA z szybkością 100 lub więcej $\mu\text{moli/mg chlorofilu/godz.}$ (Ryc. 4).



Ryc. 4. Udział przenośnika fosforanowego w transporcie ortofosforanu do chloroplastu i fosforanów triozy na zewnątrz wg Heldta i wsp. (66)

Przenośnik ten nie transportuje pirofosforanu i heksozomonofosforanu. Ortofosforan i DHAP hamują transport 3-PGA a 3-PGA i DHAP hamują transport ortofosforanu. Uwalnianie ortofosforanu wzmagają 3-PGA, DHAP i G-3P. Wymiana fosforanu zewnętrznego na wewnętrzny 3-PGA i fosforany cukrów (i odwrotnie) może stanowić podłoże inhibicji

fotosyntezy wywołanej ortofosforanem ($> 10^{-5}$ M) i jej cofania po dodaniu pośredników cyklu Calvina.

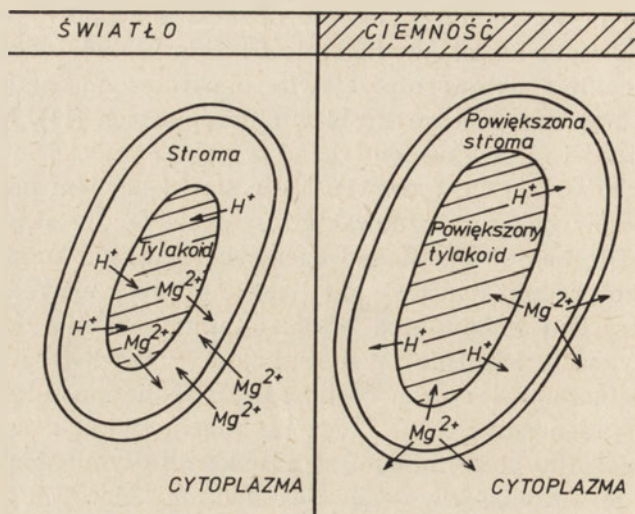
Fosforany cukrów cofają inhibicję fotosyntezy wywołaną ortofosforanem, co z kolei jest czynnikiem regulującym proces włączania CO₂. Wysokie bowiem wewnętrzne stężenie ortofosforanu sprzyja eksportowi fosforanu trioz z chloroplastów, natomiast niskie ułatwia odbudowywanie pośredników cyklu Calvina, co przejawia się skróconym okresem indukcji (por. Ryc. 2) oraz tworzeniem skrobi w chloroplastach (11). Mimo poznania tych zależności nie wyjaśniono dotąd w pełni zjawiska inihibicji ortofosforanem włączania CO₂, (por. 11). Może się tu bowiem nakładać kilka różnych procesów, jak np. hamowanie współzawodnicze aktywności karboksylazy RuDP, hamowanie dehydrogenazy triozofosforanowej przez ortofosforan jako produkt końcowy katalizowanej przez nią reakcji (11, 23).

Poza wykryciem przenośnika ortofosforanu, badania Heldta (46, 51, 55, 65) wykazały istnienie przenośnika ATP oraz kwasów dwukarboksylowych — jabłczanu i szczawiooctanu, asparaginianu i glutaminianu. Przy udziale przenośnika ATP ulega on przeniesieniu z szybkością do 5 μ moli/mg chlorofilu/godz., natomiast przenośnik wymienionych kwasów przemieszcza je z szybkością rzędu 100 μ moli/mg chlorofilu/godz., a więc z szybkością podobną do szybkości transportu ortofosforanu.

I-7. Transport protonów i magnezu

Wywołany światłem transport elektronów w chloroplastach powoduje, zgodnie z hipotezą Mitchella, uwalnianie protonów, które przemieszczają się do tylakoidu, przez co stroma chloroplastu staje się bardziej alkaliczna. Na skutek oświetlenia chloroplastów następuje spadek pH w tylakoidzie o 1,5 jednostki i wzrost pH w stromie o około 1 jednostkę (65a). To przemieszczanie się protonów wywołuje z kolei ruch innych jonów i metabolitów do i ze stromy. Postuluje się np. związek między pompą protonową i pobieraniem 3-PGA przy udziale przenośnika fosforanu (65), jak również przypuszcza się, że wzrost pH w stromie będzie sprzyjał nagromadzeniu się jonu dwuwęglanowego (66). Umożliwia to intensywne włączanie CO₂ stwarzając jednocześnie czuły mechanizm regulacji tego procesu pod wpływem światła (65a). Przemieszczaniu się protonów w oświetlonych chloroplastach towarzyszy gromadzenie się w stromie przede wszystkim jonów Mg²⁺. Pochodzą one zarówno z tylakoidu jak i cytoplazmy. Powoduje to wzrost stężenia magnezu (Ryc. 5) od 0 do około 10 μ M (67), co ma istotne znaczenie w regulacji aktywności karboksylazy RuDP, której powinowactwo do CO₂ wzrasta ze wzrostem stężenia Mg²⁺ (67—72). Ten wzrost stężenia Mg²⁺ na świetle jest jednym z czynników podwyższających w tych warunkach aktywność karboksylazy RuDP i zmniejszających ją w ciemności (45). Zjawisko to określa się mianem aktywacji świetlnej (67, 70, 73).

Poziom Mg^{2+} w stromie warunkuje zarówno powinowactwo karboksylazy RuDP do CO_2 jak i jej szybkość maksymalną. Zależności te wykazano



Ryc. 5. Wpływ światła i ciemności na przemieszczanie się magnezu w chloroplastach (11).

również w układzie rekonstruowanym złożonym z chloroplastów pozbawionych osłonki, białek stromy i koenzymów. Wydzielanie O_2 związane funkcjonalnie z włączaniem CO_2 rozpoczynało się po zwiększeniu stężenia Mg^{2+} z 1 do 5mM (23, 72) albo przez 10-krotne zwiększenie stężenia CO_2 (71). Wskazuje to, że aktywacja karboksylazy RuDP przez jony magnezu w układzie rekonstruowanym polega przede wszystkim na zmianach K_m i V_{max} tego enzymu.

I-8. Ilościowa charakterystyka transportu

Podwójną błonę chloroplastu cechuje selektywna przepuszczalność, która jest ważnym elementem regulacji transportu nie tylko związków już omówionych, lecz również względnie nieprzenikających jej fosforanów cukrów, wolnych cukrów, aminokwasów i kwasów karboksylowych. Transport tych związków przez błonę chloroplastów zachodzi z różną szybkością (Tabela 2). Można tu wyróżnić trzy podstawowe grupy związków, a w grupie o małej szybkości przenikania przez błonę chloroplastów takie metabolity (podgrupa a), których szybkość transportu jest mniejsza od 0,1 μ mola/mg chlorofilu/godz., co pozwala zaliczyć je do związków praktycznie nie przenikających przez błonę chloroplastów. Należą do nich: RuDP, S-7P, SDP, FDP, PEP, ADP, NADP i NADPH. Glikolan i gliksa-

lan podano w tabeli 2 w dwu grupach, ponieważ dane o szybkości ich transportu nie są zgodne.

Tabela 2

Szybkość przenikania metabolitów, koenzymów i jonów przez błony chloroplastów (9—11, 23, 48, 55, 74—80)

μmole/mg chlorofilu/godz.		
Mała*) 0—1,0	Duża 10—100	Bardzo duża > 100.
a) Rybulozo-1,5-dwufosforan	Ortofosforan	CO ₂
Sedoheptulozo-7-fosforan	Rybozo-5-fosforan	Fosforan dwuhydroksyacetonu
Sedoheptulozo-1,7-dwufosforan	Rybulozo-5-fosforan	Aldehyd 3-fosfoglicerynowy
6-fosfoglukonian	Ksylulozo-5-fosforan	Jabłczan
Glukozo-1-fosforan	α-ketoglutaran	Szczawiooctan
Fruktozo-1,6-dwufosforan	Asparaginian	Glikolan**)
Glukoza	Glutaminian	
Fosfoenolopirogronian	Glikolan**)	
1,3-fosfoglicerynian	Glioksalan**)	
ADP		
NADP, NAD		
b) ATP		
Ryboza		
Fruktoza		
Glioksalan**)		
c) Fruktozo-6-fosforan		
Glukozo-6-fosforan		

*) a) — szybkość w granicach 0—0,1; b) — szybkość w granicach 0—1,0; c) — szybkość w granicach 1—10 μmoli/mg chlorofilu/godz.

**) Brak zgodności danych w literaturze.

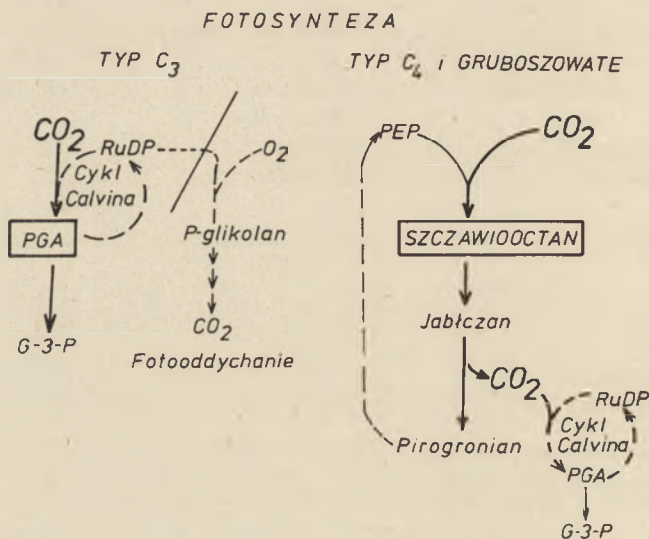
Tak bardzo zróżnicowana szybkość przenikania metabolitów przez osłonkę chloroplastów ma istotne znaczenie w regulacji fotosyntezy, ponieważ umożliwia albo zatrzymanie w chloroplastach metabolitów niezbędnych do działania cyklu Calvina np. RuDP, S-7P, SDP, albo szybki transport innych np. fosforanu trioz, niezbędnych do syntezy sacharozy. Niektóre z nich są nośnikami energii i równoważników redukujących tworząc układ wahadłowy jabłczan/szczawiooctan.

II. Mechanizm i regulacja włączania CO₂ w tkankach roślin typu C₄ i gruboszowatych

II-1. Mechanizm fotosyntezy różnych typów roślin

Większość wyższych roślin asymiluje CO₂ z atmosfery w sposób bezpośredni w złożonym cyklu redukcji dwutlenku węgla t.zw. cyklu Calvina. Dwa charakterystyczne ogniwa cyklu stanowią: RuDP jako akceptor CO₂

i pierwszy trwały produkt fotosyntezy — 3-PGA (Ryc. 6 schemat lewy). Od tego trójwęglowego pierwszego produktu fotosyntezy rośliny tak asymilujące określa się jako rośliny typu C_3 . Jest jednak wiele roślin należących do grup systematycznych, zarówno jedno- jak i dwuliściennych, w których pierwszym akceptorem CO_2 jest PEP (Ryc. 6, schemat prawy), a produktem reakcji związek czterowęglowy — szczawiooctan, od którego rośliny tak asymilujące określa się, jako rośliny typu C_4 , cały zaś ciąg metaboliczny związany z włączaniem CO_2 nosi nazwę szlaku Hatcha, Slacka i Kortchacka, którzy pierwsi wykryli ten proces. Utworzony ze szczawiooctanu jabłczan ulega dekarboksylacji i dopiero wówczas powstały CO_2 bierze udział w cyklu Calvina, w którym z RuDP i CO_2 powstają 2 cząsteczki 3-PGA i następują dalsze reakcje tego cyklu.



Ryc. 6. Podobieństwa i różnice procesu fotosyntezy u roślin różnych typów.

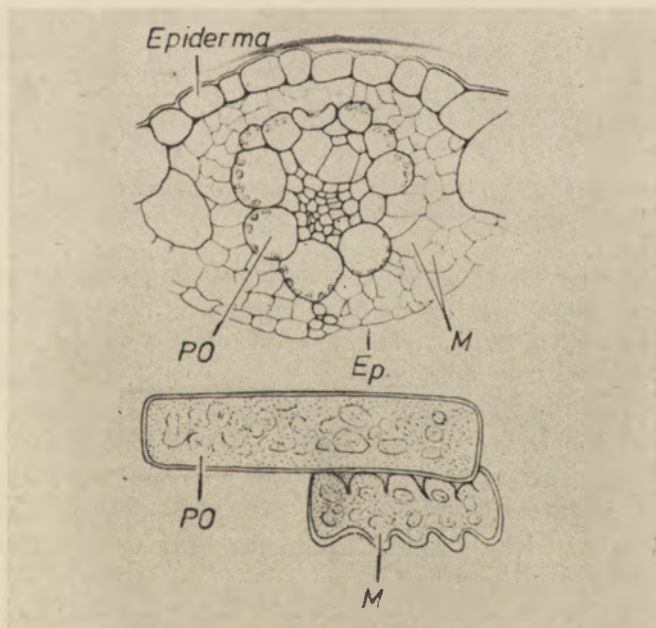
Fotosyntezę obu typów cechują dwa charakterystyczne zjawiska. Pierwszym z nich jest fotooddychanie obserwowane powszechnie w roślinach typu C_3 , a dyskusyjne w przypadku roślin typu C_4 . W roślinach typu C_3 pierwotnym substratem oddychania jest RuDP, którego rozpad w obecności tlenu katalizowany przez karboksylazę/oksygenazę RuDP prowadzi do powstania fosfoglikolanu, a następnie glikolanu, z którego w wyniku dalszych przemian uwalnia się CO_2 (Ryc. 6, lewy schemat). Drugim zjawiskiem jest t.zw. przestrzenne i czasowe rozdzielenie etapów fotosyntezy u roślin typu C_4 , wśród których specjalną grupę stanowią rośliny gruboszowate (t.zw. sukulenty). Przestrzenne rozdzielenie etapów fotosyntezy polega na tym, że synteza szczawiooctanu zachodzi w komórkach mezofilu, podczas gdy karboksylacja RuDP i pozostałe reakcje cyklu Calvina w komórkach pochwy okołowiązkowej. Czasowe rozdzielenie eta-

pów fotosyntezy, charakterystyczne dla roślin gruboszowatych polega na intensywnej pierwotnej asymilacji CO₂ i syntezie kwasów organicznych w nocy oraz wtórnej karboksylacji związanej z syntezą cukrowców w cyklu Calvina w ciągu dnia.

Te biochemiczne kryteria podziału na rośliny typu C₃ i C₄ oraz występowanie lub brak fotooddychania wiążą się ściśle z kryteriami anatomicznymi, takimi jak budowa liścia, budowa komórek pochwy okołowiązkowej, ultrastruktura chloroplastów i ich rozmieszczenie w komórkach i fizjologicznymi takimi jak: optymalna temperatura fotosyntezy, wrażliwość tego procesu na intensywność światła, ciśnienie tlenu, stężenie CO₂ w punkcie kompensacyjnym. Niektóre z tych zagadnień zostaną tu omówione.

II-2. Anatomia liścia i ultrastruktura chloroplastów

Jedną z podstawowych cech anatomicznych liści typu C₄ jest wieńcowe ułożenie komórek pochwy okołowiązkowej i komórek mezofilu wokół wiązki przewodzącej (Ryc. 7). Znaczenie fizjologiczne takiej budowy polega na szybkim transporcie produktów fotosyntezy z tkanek asymilujących do przewodzących i wzmacnianiu fotosyntezy na skutek usuwania produktów końcowych tego procesu. Wynikiem tego jest brak wydzielania CO₂ na świetle (81) oraz niski punkt kompensacyjny CO₂ (82).



Ryc. 7. Schemat budowy wieńcowej liścia rośliny typu C₄ (15).
PO — komórki pochwy okołowiązkowej; M — komórki mezofilu; EP — epiderma.

Rośliny typu \bar{C}_4 (1, 7, 16) o wysokiej wydajności fotosyntezy (17) w odróżnieniu od roślin typu C_3 o mniejszej wydajności fotosyntezy należą do różnych grup systematycznych. W tabeli 3 przedstawiono przykłady takich roślin. Wbrew początkowym oczekiwaniom opartym na analizie budowy anatomicznej liścia obecnie wiadomo, że podziału tego nie można stosować bez uwzględnienia kryterium biochemicznego. Co więcej, rośliny z poszczególnych gatunków tego samego rodzaju mogą wykazywać cechy dwu lub nawet trzech grup (16, 17). Podział roślin na typy C_3 i C_4 nie jest więc zgodny z kryterium taksonomicznym stosowanym w systematyce roślin.

Tabela 3

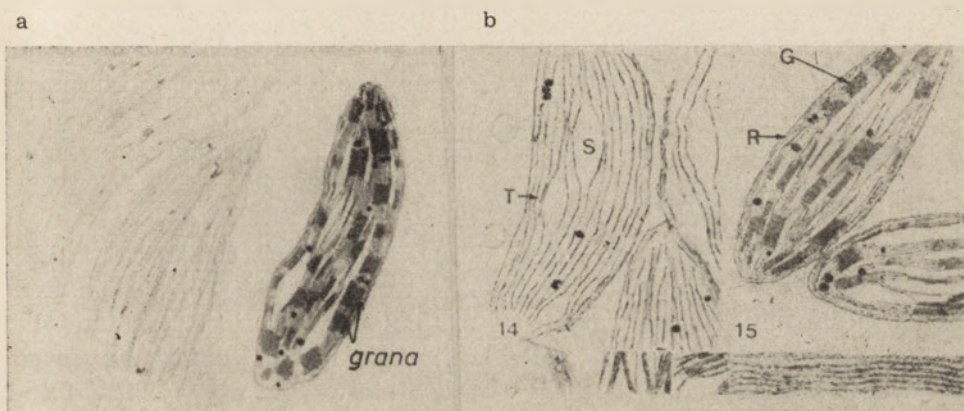
Rośliny typu C_3 i C_4
Zestawiono na podstawie danych (17)

Typ C_3	Typ C_4
Jednoliścienne:	
<i>Avena sativa</i> L.	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.
<i>Hordeum vulgare</i> L.	<i>Saccharum officinarum</i> L.
<i>Oryza sativa</i> L.	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench
<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>Zea mays</i> L.
<i>Cyperus rotundus</i> L.	<i>Cyperus papyrus</i> L.
<i>Panicum milliaceum</i> L.	<i>Panicum lindheimeri</i> Nash.
Dwuliścienne:	
<i>Arachis hypogae</i> L.	<i>Amaranthus edulis</i> spec.
<i>Beta vulgaris</i> L.	<i>Atriplex semibaccata</i> R. Br.
<i>Helianthus annuus</i> L.	<i>Kochia childsii</i> L.
<i>Lactuca sativa</i> L.	<i>Portulacca oleracea</i> L.
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	
<i>Spinacea oleracea</i> L.	
<i>Atriplex hastata</i> L.	<i>Atriplex rosea</i> L.
<i>Euphorbia corollata</i> L.	<i>Euphorbia maculata</i> L.

Intensywne badania nad roślinami jednoliściennymi (83) i dwuliściennymi (84), a także nad zależnością anatomii liścia i ultrastruktury komórek roślin dwuliściennych typu C_4 (85) doprowadziły do hipotezy o wpływie środowiska na przekształcenie cech fizjologicznych i morfologicznych roślin zaliczanych do różnych grup taksonomicznych (85). Według tej hipotezy, rozwiniętej w dalszych opracowaniach (15, 16) typ fotosyntezy i cechy strukturalne roślin grupy C_4 są przejawem adaptacji do wydajnego włączania CO_2 w warunkach ograniczonej wilgotności. Wspólnymi cechami roślin typu C_4 jest ich pochodzenie tropikalne i częste występowanie w środowiskach kserofitycznych.

Opublikowane w roku 1968 prace z czterech laboratoriów (82, 84—86) wykazały, że w komórkach mezofilu i pochwy okołowiązkowej roślin typu C_4 występują chloroplasty o wyraźnej strukturalnej dwupostaciowości.

Chloroplasty mezofilu zawierają wykształcone grana, podczas gdy chloroplasty pochwy okołowiązkowej prawie nie zawierają tych struktur (Ryc. 8a, b). Mogło to stwarzać wrażenie, że np. chloroplasty kukurydzy (87) i trzciny cukrowej są „bezgranowe” (88). Co więcej, „bezgranowe” chloroplasty komórek pochwy okołowiązkowej np. liści *Sorghum* miały nie zawierać II układu fotosyntezy (89, 90). W roślinach dwuliściennych typu C₄, np. *Portulaca oleracea* (16), nie obserwuje się strukturalnej dwupostaciowości chloroplastów występujących w obu typach komórek, chociaż w niektórych innych roślinach można ją stwierdzić. Tak więc, mimo występowania lub braku strukturalnej dwupostaciowości chloroplastów komórek roślin jedno- i dwuliściennych typu C₄ (15) nie można wykazać przyczynowego związku między budową chloroplastów a fotosyntezą typu C₄ (16). Stwierdzono bowiem, że chloroplasty komórek pochwy okołowiązkowej mimo braków wyraźnych gran zawierają obok układu I (94—96) również aktywny układ II fotosyntezy (94, 97, 98). Mogą więc wytwarzać ATP i NADPH w niezbędnej ilości.



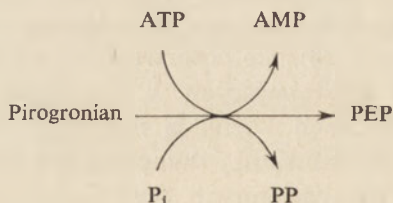
Ryc. 8a, b. Dwupostaciowość chloroplastów komórek mezofilu i pochwy okołowiązkowej liści kukurydzy (a) i *Froelichia gracilis* (b). Zdjęcie (a) wg (2), zdjęcie (b) wg (15).

II-3. Włączanie CO₂ w tkankach roślin typu C₄

K o r t s c h a k, pierwszy stwierdził w 1954 roku, że pierwotnym produktem fotosyntezy w liściach trzciny cukrowej są czterowęglowe dwukarboksylowe kwasy (16). To samo zjawisko opisał w roku 1960 K a r p i ł o w (91, 91a) badający kukurydzę. Wyniki tych prac nie zwróciły uwagi aż do czasu publikacji K o r t s c h a k a w 1965 roku (92), która zapoczątkowała serię badań H a t c h a i S l a c k a (1, 93). Doprowadziły one do poznania nowego mechanizmu włączania CO₂ i nazwania tej nowoodkrytej drogi włączania CO₂ szlakiem H a t c h a, S l a c k a i K o r t s c h a k a (2). Działanie tego szlaku warunkuje określone rozmieszczenie w komórkach oraz odpowiednią aktywność trzech enzymów.

II-3a. Enzymy

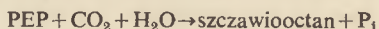
Pierwszym enzymem wykrytej przez Hatcha, Slacka i Kortschaka drogi jest fosfotransferaza ATP: pirogronian, P_i , która przekształca pirogronian w PEP:



Enzym ten występuje wyłącznie w roślinach. Jego aktywność w komórkach mezofilu trawy *Digitaria sanguinalis* (99) jest wyższa (100—200 μ moli/mg chlorofilu/godz.) niż w komórkach pochwy okołowiązkowej (20—50 μ moli/mg chlorofilu/godz.). W komórkach pochwy okołowiązkowej pirogronian może ulegać fosforylacji, transaminacji lub przemieszczeniu do komórek mezofilu.

Fosfotransferaza ATP: pirogronian jest enzymem regulatorowym. Jego aktywność hamują PEP, AMP, i PP, gdy reakcja przebiega w kierunku syntezy PEP, natomiast przez pirogronian gdy przebiega w lewo. Enzymatyczna redukcja grup S—S oraz obecność fosforanu aktywuje fosfotransferazę, podobnie jak i światło, którego intensywność warunkuje szybkość fosforylacji i fotoredukcji enzymu *in vivo* (1, 4).

Drugim kluczowym enzymem szlaku C_4 jest karboksylaza PEP, której w latach 50-tych przypisywano tylko rolę we włączaniu CO_2 w ciemności oraz w roślinach gruboszowatych (100). Dopiero w czasie badań fotosyntezy roślin typu C_4 okazało się, że w trzcinie cukrowej, kukurydzy i sorgo aktywność karboksylazy PEP jest 4—5-krotnie wyższa niż szybkość fotosyntezy tych roślin (101). Enzym katalizuje praktycznie nieodwracalną reakcję karboksylacji i hydrolizy:

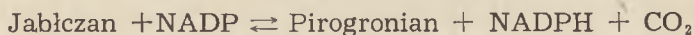


Molekularną „formą CO_2 ” wykorzystywaną w tej reakcji jest w przypadku liści orzeszka ziemnego i korzeni kukurydzy (102) HCO_3^- , w przypadku zaś liści kukurydzy CO_2 (103). Na podstawie wielu danych można przyjąć, że enzym z różnych części rośliny wykorzystuje jedną albo drugą formę substratu (7). K_m większości karboksylaz dla HCO_3^- lub „całkowitego CO_2 ” wynosi 0,3—0,4 mM (7).

Ze względu na kluczową rolę karboksylazy PEP we włączaniu CO_2 przez rośliny typu C_4 można oczekiwać własności regulatorowych tego enzymu, podobnie jak wykazuje to enzym bakteryjny. Z dotychczasowych danych wynika, że 0,25 mM szczawiooctan hamuje aktywność karboksylazy w 50%, natomiast asparaginian i pirogronian tylko w niewielkim stopniu (104). Dwu-, trzykrotną stymulację enzymu w wyciągach z liści roślin C_4

obserwowano pod wpływem G-6P, F-6P i R-5P (105, 106), podczas gdy 3-PGA stymulował lub hamował zależnie od stężenia (105). Ponieważ karboksylaza z liści roślin C₄ wykazuje sigmoidalną krzywą aktywności, można przypuszczać, że jest enzymem allosterycznym (104, 105). Właściwości kinetyczne i fizyczne roślinnych karboksylaz PEP były podstawą wprowadzenia ich podziału na cztery typy. Enzymy każdego typu mają brać udział w różnych drogach metabolicznych odpowiednich tkanek (106, 107).

Trzecim enzymem omawianego szlaku jest dehydrogenaza jabłczanowa (dekarboksylująca), która katalizuje reakcję:



Równowaga reakcji jest przesunięta na prawo i w kierunku przeciwnym może przebiegać przy nadmiarze pirogronianu i HCO₃⁻. Enzym został częściowo oczyszczony z liści kukurydzy (108), współdziała z NADP, wymaga dwuwartościowych jonów metali i wykazuje zmienne powinowactwo (K_m) do jabłczanu uwarunkowane pH. Fizjologiczna rola tego enzymu polega na uwalnianiu z jabłczanu CO₂, który następnie karboksylaza RuDP włącza do cyklu Calvina.

Cechą charakterystyczną omówionych enzymów jest ich znaczna aktywność, która w przypadku karboksylazy PEP jest 60-krotnie, a dehydrogenazy jabłczanowej (dekarboksylującej) 10-krotnie wyższa w tkankach roślin typu C₄ niż C₃. Porównanie aktywności karboksylazy PEP i RuDP z tkanek roślin typu C₃ i C₄ przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4

Porównanie aktywności karboksylazy fosfoenolopirogronianowej i rybulozo-1,5-dwufosforanowej z tkanek roślin o różnych szlakach fotosyntezy (99)

Enzym	K _m μM	Typ C ₃		Typ C ₄		
		Jęczmień	<i>Festuca elatior</i>	<i>Digitaria sanguinalis</i>	Trzcina cukrowa	<i>Cynodon dactylon</i>
		μmole CO ₂ /mg chlorofilu/godz.				
Karboksylaza fosfoenolopirogronianowa	7	14	21	236	830	680
Karboksylaza rybulozo-1,5-dwufosforanowa	420	296	380	132	130	170

II-3b. Izolowanie komórek mezofilu i pochw okołowiązkowych

Opracowanie metod izolowania komórek mezofilu i pochwy okołowiązkowej i ich chloroplastów pozwoliło na ustalenie rozmieszczenia poszczególnych enzymów biorących udział w asymilacji CO₂ w roślinach typu C₄. Najstarsza z metod polega na rozcieraniu liści w środowisku wodnym i wi-

rowaniu w gradiencie gęstości (109). Wydzielone tak z komórek mezofilu chloroplasty nie włączały jednak CO_2 . W drugiej metodzie zastosowanej do izolowania chloroplastów w środowisku niewodnym wykorzystano zjawisko gromadzenia się w pewnych warunkach większej ilości skrobi w chloroplastach pochwy okołowiązkowej niż mezofilu, co umożliwia rozdzielenie ich na zasadzie różnicy w gęstości (110, 111). Największe zastosowanie znalazła technika polegająca na rozcieraniu liści ze stopniowo wzrastającą intensywnością. Powoduje to kolejne uwalnianie zawartości komórek epidermalnych, następnie mezofilu i wreszcie pochw okołowiązkowych, których komórki są najbardziej odporne na rozcieranie. W ten sposób można uzyskać chloroplasty, enzymy lub całą zawartość wymienionych komórek (112). Stosowanie tej techniki (113—118) prowadziło jednak do wielu sprzeczności, wynikających z różnic w odporności badanego materiału na „różnicowe” intensywne rozcieranie. Mimo początkowych różnych zastrzeżeń, metoda izolowania komórek mezofilu i pochwy okołowiązkowej, wykorzystująca różną odporność ich ścian komórkowych, znalazła zastosowanie w badaniach (99, 119, 120) a opracowana następnie metoda enzymatyczna izolowania protoplastów mezofilu i komórek pochwy (122) pozwoliła na ilościowe badania udziału kluczowych enzymów szlaku C_4 w tych dwu rodzajach komórek (122a).

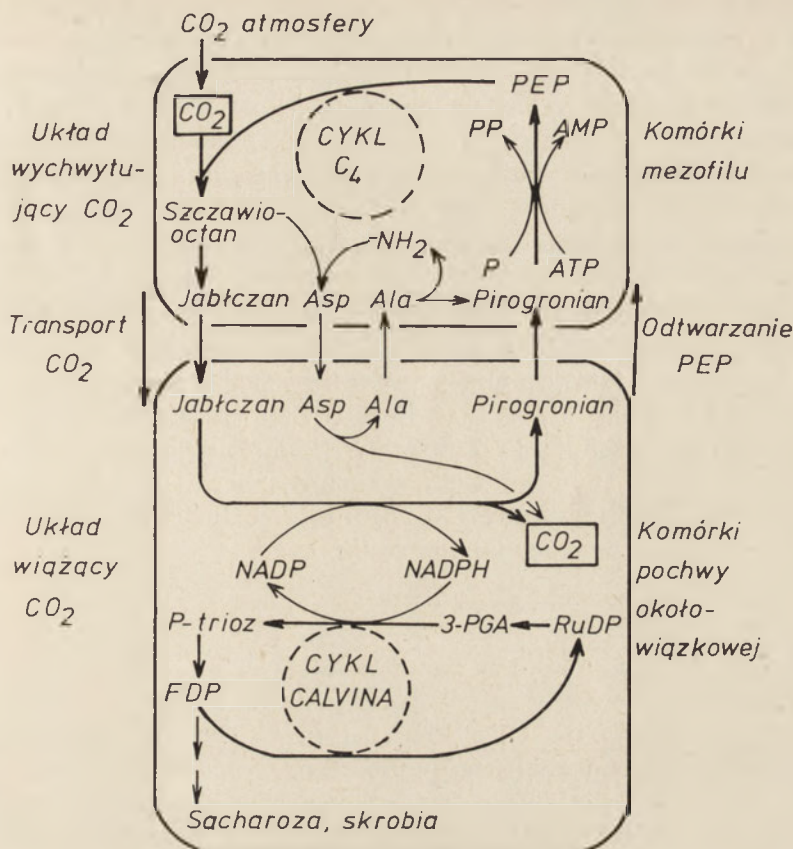
II-3c. Współdziałanie szlaku Hatcha, Slacka, Kortschaka i cyklu Calvina

Na podstawie badań kinetyki znakowania produktów fotosyntezy ^{14}C , rozmieszczenia i aktywności enzymów w komórkach mezofilu i pochwy okołowiązkowej, a także określenia powiązań metabolicznych obu tych rodzajów komórek zawierających chloroplasty i karboksylazy PEP i RuDP, Hatch i Slack (1, 13) zaproponowali ciąg reakcji biorących udział we włączaniu CO_2 w roślinach typu C_4 . Następujące fakty stanowią podstawę doświadczalną tego mechanizmu:

- przy krótkotrwałym włączaniu CO_2 głównymi produktami są szczawiooctan, jabłczan i asparaginian (ponad 50% włączonego znakowania) znakowane w C-4, oraz 3-PGA — znakowany w C-1;
- w wyciągach z liści wszystkich roślin typu C_4 występują karboksylazy PEP i RuDP. Ich aktywności są wyższe lub równe szybkości fotosyntezy odniesionej do ilości chlorofilu;
- liście tych roślin zawierają dwa, różniące się między sobą, rodzaje komórek fotosyntetyzujących — mezofilu i pochwy okołowiązkowej.

Te oraz inne fakty pozwoliły na schematyczne przedstawienie współdziałania szlaku Hatcha, Slacka i Kortschaka z cyklem Calvina we włączaniu CO_2 w roślinach typu C_4 (Ryc. 9).

W komórkach mezofilu z CO_2 i PEP powstaje pod wpływem karboksylazy szczawiooctan, a z niego zależnie od rośliny jabłczan lub asparaginian, które przenikają do komórek pochwy okołowiązkowej. Tam przy udziale dehydrogenazy jabłczanowej (dekarboksylującej) następuje od-



Ryc. 9. Schemat współdziałania szlaku Hatcha, Slacka i Kortschaka z cyklem Calvina u roślin typu C₄.

szczępienie CO₂, który staje się substratem karboksylazy RuDP zapoczątkowującej reakcje cyklu Calvina. Utworzony z jabłczanu pirogronian powraca do komórek mezofilu, gdzie w reakcji fosfotransferazy ATP: pirogronian odtwarza się zużyty uprzednio PEP. Jeśli nośnikiem włączonego CO₂ jest asparaginian, wówczas do komórek mezofilu powraca alana. Jak z tego schematu widać, CO₂ związany początkowo w grupie karboksylowej kwasów C₄ wchodzi następnie do cyklu Calvina, w wyniku reakcji katalizowanej przez karboksylazę RuDP. Jest to bowiem jedyny układ karboksylujący, dzięki któremu następuje jednoczesne gromadzenie produktów reakcji i wzrost ilości akceptora CO₂. W przypadku szlaku Hatcha, Slacka i Kortschaka tworzone kolejno: PEP, szczawiooctan, jabłczan i pirogronian stanowią układ karboksylacji—dekarboksylacji, który sam nie jest w stanie netto zasymilować CO₂. Z tych względów upadły obecnie pierwotne poglądy o szlaku Hatcha, Slacka i Kortschaka jako samodzielnym mechanizmie włączającym CO₂.

Sprzężenie dwóch mechanizmów włączania CO_2 przedstawione na rycinie 9 wynika z kilku istotnych cech tego układu stwierdzonych doświadczalnie. Jabłczan, asparaginian, alanina, G-3P i 3-PGA są związkami, które przenikają łatwo przez błonę chloroplastów (por. Tabela 2) jak i między komórkami mezofilu i pochwy okołowiązkowej. Badania z zastosowaniem izolowanych komórek mezofilu i pochwy okołowiązkowej wykazały, że w pierwszych występuje w przeważającej ilości karboksylaza PEP, natomiast w drugich głównie karboksylaza RuDP (99, 116, 119—123). Wynikiem takiego rozmieszczenia tych karboksylaz w komórkach mezofilu i pochwy okołowiązkowej oraz prawie równomiernego rozmieszczenia znacznej aktywności niektórych innych (np. dehydrogenazy G-3P, kinazy adenylowej, pirofosfatazy, aminotransferazy asparaginianowej i alaninowej) jest, stwierdzone przez Blacka (7), zjawisko włączania w roślinach typu C_4 pewnej ilości CO_2 (u trawy *Digitaria sanguinalis* około 15%) bezpośrednio przez komórki pochwy okołowiązkowej a pozostałej ilości przez komórki mezofilu. Autor ten postuluje możliwość zachodzenia tego procesu również w tkankach innych roślin.

II-3d. Odchylenia od podstawowego typu fotosyntezy C_4

Proces fotosyntezy niektórych roślin typu C_4 cechują pewne odchylenia od schematu przedstawionego wyżej. Np. *Cynodon dactylon* po krótkim (< 10 sek.) okresie fotosyntezy znakowany węgiel pojawia się przede wszystkim w asparagianie, a nie w jabłczanie i zanika szybciej niż znakowanie jabłczanu (99, 124), a więc odwrotnie niż w przypadku trzcinny cukrowej (93, 124). Różnice te są wynikiem znacznie mniejszego ($< 5\%$) poziomu dehydrogenazy jabłczanowej (dekarboksylującej) niż w trzcinie cukrowej, kukurydzy i *Digitaria sanguinalis* (108, 124—126) i większego poziomu transaminaz (126, 127). Ostatnio metabolizm jabłczanu i asparagianu był badany w izolowanych komórkach pochwy 3 grup roślin typu C_4 (127a). Badane rośliny charakteryzowały się wysoką aktywnością enzymów dekarboksylujących różne czterowęglowe kwasy w każdej z tych grup. Downton (126) proponował terminy—rośliny „tworzące jabłczan” (kukurydza, sorgo) lub „tworzące asparaginian” (*Amaranthus*, *Panicum*), które jednak nie przyjęły się, ponieważ wszystkie rośliny syntetyzują obydwa związki chociaż w różnej proporcji. Stwierdzono poza tym, że poszczególne części tej samej rośliny mogą gromadzić jeden lub drugi związek w większej ilości (128). To zróżnicowanie dróg węgla w procesie fotosyntezy roślin typu C_4 stało się dla Blacka (7) podstawą do podziału ich na trzy grupy. Uwzględnił w nim: pierwszy pojawiający się produkt włączania $^{14}\text{CO}_2$, związek transportowany z komórek mezofilu do pochwy okołowiązkowej i z powrotem oraz enzymy związane z tymi przekształceniami.

Drugim rodzajem odchylenia od podstawowego schematu włączania CO₂ w roślinach typu C₄ jest występowanie roślin pośrednich, w których działa zarówno mechanizm typu C₃ jak i C₄ lub też mechanizmy te występują oddzielnie w roślinach tej samej rodziny (por. Tabela 3). Wykazano bowiem (129), że w strukturalnie homogennej kulturze tkankowej *Portulaca oleracea* fotosynteza przebiega zgodnie ze szlakiem Hatcha, Slacka i Kortschaka podczas gdy w starzejących się liściach zachodzi równocześnie wymienionym szlakiem oraz poprzez cykl Calvina. Ponieważ liście te mają wieńcowe ułożenie komórek mezofilu i pochwy okołowiązkowej wskazuje to, że nie ma przyczynowego związku między anatomią liścia roślin typu C₄ a mechanizmem włączania CO₂ i jego przestrzenne rozdzielanie na reakcje zachodzące w obu rodzajach komórek nie jest czynnikiem warunkującym mechanizm fotosyntezy.

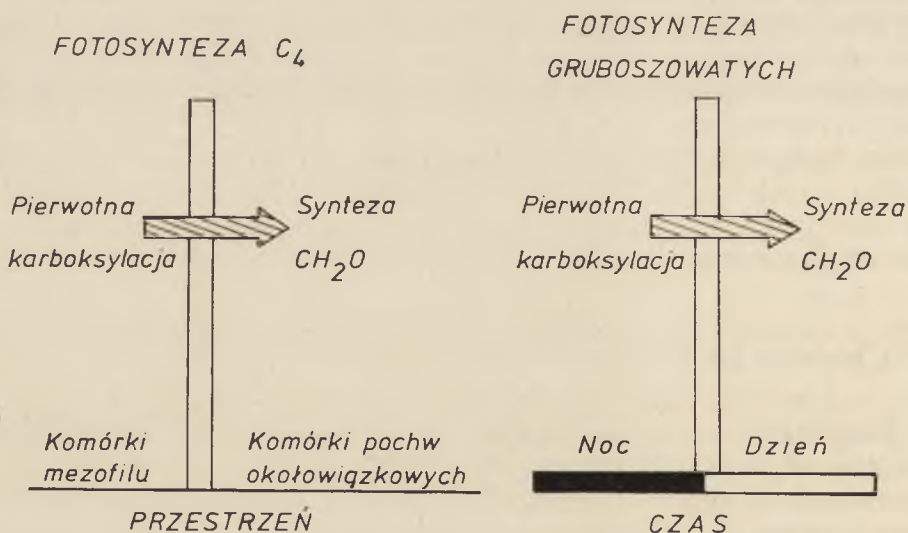
Mechanizm włączania CO₂ w roślinach gruboszowatych można również uważać za wypadkowy typu C₃—C₄. Rośliny gruboszowate są pośrednie w stosunku do pozostałych roślin zarówno pod względem budowy liścia jak i mechanizmów włączania CO₂. Takim przykładem są rośliny z rodziny *Aizoaceae*. Na podstawie budowy liścia i ultrastruktury komórki postulowano (15), że formą pośrednią jest *Mollugo verticillata*. Natomiast *M. cerviana* ma typową budowę wieńcową liścia i jest rośliną typu C₄ ze względu na charakter pierwotnych produktów fotosyntezy i fotooddychania. *M. verticillata* ma wprowadzić dobrze wykształcone komórki pochwy okołowiązkowej z licznymi chloroplastami, ale komórki mezofilu nie są ułożone centrycznie, lecz od strony górnej i dolnej liścia. Pierwszymi produktami fotosyntezy przy krótkim jej trwaniu są w jednakowej ilości 3-PGA i fosforany cukrów jak i jabłczan i asparaginian (130). Roślina ta wykazuje fotooddychanie o szybkości pośredniej między *M. cerviana* i roślinami typu C₃. Stwierdzono także, że w liściach sorgo po 1 minutowej fotosyntezie jest trzykrotnie więcej ¹⁴C-kwasu jabłkowego niż 3-PGA, ale po okresie kwitnienia w liściach gromadzi się głównie znakowany 3-PGA (131). Jednoznaczne zaliczenie wielu roślin do typu C₃ lub C₄ staje się coraz częściej bardzo wątpliwe. Dalsze badania nad formami pośrednimi roślin — jak można oczekiwać — spowodują prawdopodobnie zmiany w dotychczasowych poglądach na zależność między budową liścia a drogami węgla w fotosyntezie.

II-4. Włączanie CO₂ w tkankach roślin gruboszowatych

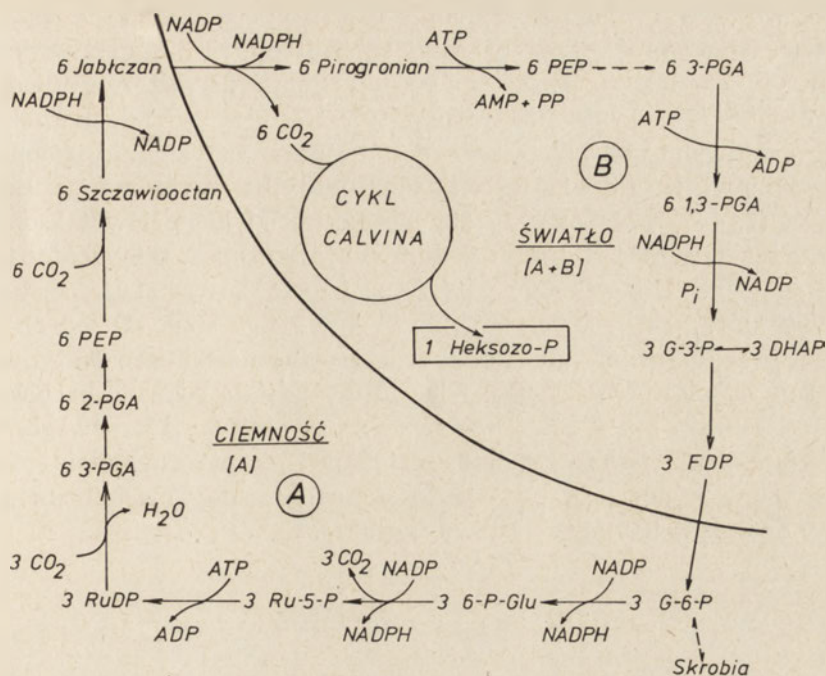
Podobieństwo fotosyntezy roślin typu C₄ i roślin gruboszowatych znane jest od dawna. Polega ono na syntezie kwasów organicznych, jako pierwszych produktów fotosyntezy (7, 16, 132). Ta analogia stała się podstawą określenia, że rośliny typu C₄ są „roślinami gruboszowatymi z budową wieńcową liści” (14, 15). W tkankach roślin typu C₄ procesy pier-

wotnej karboksylacji prowadzące do syntezy kwasów oraz syntezy cukrów są przestrzennie rozdzielone i zachodzą w dwu różnych rodzajach komórek, tworzących wieńcową strukturę liścia. W tkankach roślin gruboszowatych te same procesy metaboliczne są rozdzielone w czasie. Karboksylacja PEP i gromadzenie kwasów, głównie jabłkowego, zachodzi w ciągu nocy, natomiast w ciągu dnia następuje dekarboksylacja i synteza cukrów (Ryc. 10). Ważnym czynnikiem regulującym proces fotosyntezy jest temperatura (133), której optimum jest niższe dla karboksylazy, działającej głównie w nocy, a wyższe dla dehydrogenazy jabłczanowej (dekarboksylującej), działającej przede wszystkim w dzień.

Obok tych zewnętrznych podobieństw między fotosyntezą roślin typu C_4 i gruboszowatych istnieją istotne różnice. Bradbeer, Ranson i Stiller (134), stwierdzili w roślinach gruboszowatych w różnych warunkach doświadczalnych (ciemność lub ciemność + światło), że znakowanie jabłczanu w C-4 wynosi 66%, a w C-1 tylko 33%. Wyniki te tłumaczyli kolejnymi dwiema karboksylacjami, którym ulega związek trójwęglowy prekursora powstającego ze skrobi. Postulowano przeto, że G-6P ulega przekształceniu do Ru-5P, a następnie po karboksylacji RuDP jedna cząsteczka 3-PGA zawiera znakowanie C-1. Dalsze przekształcenia 3-PGA prowadzą do powstania PEP, który po karboksylacji daje jabłczan o znakowaniu w C-4:C-1 jak 2:1. Ten ciąg reakcji przedstawia część A ryciny 11. Znakowanie 3-PGA potwierdzili inni autorzy (7), natomiast znakowanie jabłczanu w kilku roślinach okazało się wyższe (82—95% w C-4) przy krótkich okresach fotosyntezy (137, 138), a przy dłuższych (do 24 godz.) znakowanie to wynosiło jeszcze 54% w C-4 (137, 138). Na



Ryc. 10. Schemat przestrzennego i czasowego rozdzielania procesów karboksylacji.



Ryc. 11. Schemat reakcji związanych z włączaniem CO₂ w ciemności (A) i w świetle (A+B) u roślin gruboszowatych (wg 7, 135, 136).

tej podstawie przyjęto, że β -karboksylacja PEP jest główną drogą włączania CO₂ w roślinach gruboszowatych w ciemności (131) przy czym PEP pochodzi z glikolitycznego rozpadu skrobi, a nie poprzez oksydacyjny cykl pentozowy jak to zaznaczono na rycinie 11.

Powszechnie przyjmuje się, że w roślinach gruboszowatych na świetle następuje dekarboksylacja jabłczanu i związanie uwolnionego CO₂ w cyklu fosforanów pentoz (Ryc. 11, część B). Sprawą otwartą jest los pirogronianu. Przez analogię z roślinami typu C₄ można by założyć, że fosfotransferaza ATP: pirogronian będzie tworzyć PEP, gdyż enzym ten występuje w niektórych gruboszowatych (139). Los pirogronianu w tkankach roślin oświetlonych nie jest jednak pewny, gdyż w tych warunkach działa również karboksylaza PEP (140, 141); mogą więc zachodzić także reakcje inne niż te, prowadzące do przekształcenia PEP w heksozy (Ryc. 11, część B). Dalsze ilościowe badania tego procesu prowadzone w ciemności i na świetle pozwolą określić udział obu karboksylaz we włączaniu netto CO₂ w tych warunkach. Na podstawie schematu reakcji opracowanego w laboratorium Blacka (7, 135, 136) wyliczono ilości ATP i NADPH potrzebne do włączania cząsteczki CO₂ (Tabela 5).

Drugim ciekawym zjawiskiem związanym z włączaniem CO₂ w liściach roślin gruboszowatych jest „rozdzielanie” przez nie izotopów ¹³C i ¹²C,

zaobserwowane również w przypadku roślin typu C_3 i C_4 , ale o ustalonym zakresie. Główną reakcją „rozróżniającą” izotopy ^{13}C i ^{12}C jest w tkankach roślin typu C_3 karboksylacja RuDP (142). Ponieważ rośliny gruboszowate asymilują CO_2 podobnie jak rośliny typu C_4 przy udziale karboksylazy PEP, oczekiwano podobnych wartości stosunku rozróżnienia izotopowego. Znalezione wartości odbiegały zakresem nie tylko od wszystkich roślin lądowych (7, 142a), ale okazały się niezależne od kryteriów taksonomicznych, gdyż stosunek $^{13}C : ^{12}C$ u *Sedum rubrotintum*, *S. telephoides* i *S. telephium* wynosił odpowiednio -14 , -22 i -29 . To wskazuje, że warunki otoczenia mogą powodować zmianę wartości tego stosunku od charakterystycznego dla roślin typu C_4 do charakterystycznego dla roślin typu C_3 (7). Przejście od pierwotnej karboksylacji przy udziale PEP do karboksylacji RuDP jako pierwotnej, przejawia się zmianą stosunku izotopowego. W metabolizmie węgla jest to zasadnicza zmiana i łącznie z odmiennym metabolizmem w ciemności i na świetle stanowi złożony mechanizm regulacyjny, dotychczas tylko częściowo poznany.

II-5. Budowa liści roślin typu C_4 a mechanizmy włączania CO_2

II-5a. Aspekty adaptacyjne

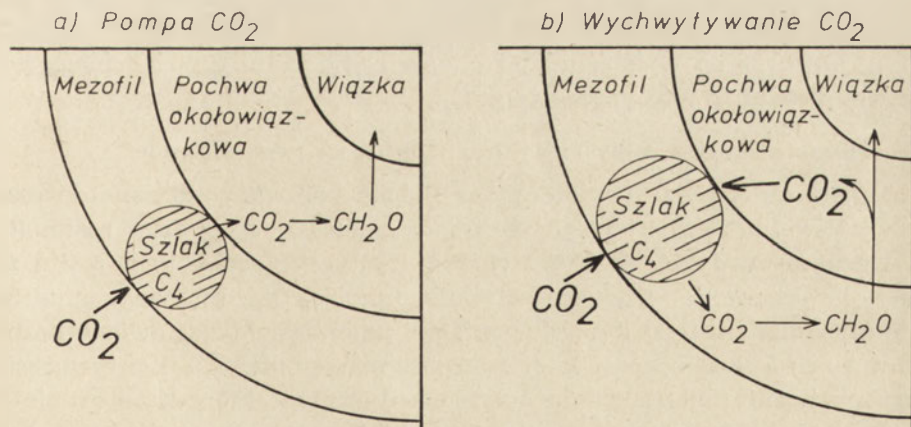
Wykształcenie się w roślinach różnic w fotosyntetycznym włączaniu CO_2 jest zdaniem Laetscha (16) wynikiem ich adaptacji do warunków środowiska. I tak rośliny typu C_4 charakteryzują rejony o okresach suszy i deszczów, a rośliny gruboszowate rejony mniej lub bardziej suche (14, 132). Obie grupy roślin cechuje wysoki stosunek włączanego CO_2 do pobranej wody (7). Ograniczona ilość wody w środowisku spowodowała wykształcenie takiej proporcji powierzchni rośliny gruboszowatej do jej objętości, która jest korzystna dla zatrzymania wody w tkankach, nie jest natomiast korzystna dla wymiany gazowej. Rośliny typu C_4 przystosowały się więc do środowiska o okresach suszy i obfitych deszczów, kiedy intensywnie rosną i asymilują. Budowa wieńcowa liści pozwala im z jednej strony ograniczać straty wody, z drugiej zaś wydajnie włączać CO_2 (16). Wiadomo np., że szybkość transpiracji traw typu C_4 i roślin C_4 z rodzaju *Atriplex* jest znacznie mniejsza niż traw typu C_3 i roślin C_3 z rodzaju *Atriplex* (143, 144).

Rośliny typu C_4 budzą najczęściej większe zainteresowanie ze względu na związki między anatomią liści a metabolizmem węgla, którego wynikiem są obniżone straty CO_2 na skutek fotooddychania (por. rozdział IV). Zdaniem Laetscha (16) jest to zjawisko wtórne w stosunku do pierwotnego, jakim było przystosowanie się roślin do wegetacji w warunkach ograniczonej ilości wody. Na poparcie tej tezy przytacza następującą zależność. *Mesembryanthemum crystallinum* jest rośliną gruboszowatą, gdy rośnie w środowisku zawierającym NaCl, natomiast typu C_3 , gdy nie ma

tej soli w podłożu (1, 45). Rośliny typu C₄ jak i gruboszowate są często halofitami. Środowiska kserofityczne zawierają znaczne ilości kationów (Na, K), które rośliny pobierają dla zachowania równowagi kationowo-anionowej z kwasami organicznymi (146). Jest wobec tego możliwe, że β -karboksylacja była formą przystosowania się roślin do syntezy anionów dla zrównoważenia nagromadzonych kationów na skutek zasolenia środowiska. Tak więc zmiany adaptacyjne struktury liści wywołane brakiem wody i zasoleniem poprzedziły zmiany prowadzące do wydajnego wiązania CO₂.

II-5b. Aspekty metaboliczne

Zakładając współzależność cech struktury i funkcji można wg Laet-scha (16) przedstawić obecne poglądy na mechanizm fotosyntezy roślin typu C₄ dwoma modelami (Ryc. 12). Pierwszy pogląd najbardziej rozpowszechniony, zakłada (Ryc. 12A), że pierwotna reakcja karboksylacji zachodzi w chloroplastach komórek mezofilu, skąd jabłczan lub asparaginian jest transportowany do komórek pochwy okołowiązkowej. Tam następuje ich dekarboksylacja i CO₂ jest ponownie wiązany i pojawia się w 3-PGA (por. Ryc. 9 i rozdział II-3a, b i c). Istotnym elementem tego modelu jest zwiększenie stężenia CO₂ w komórkach pochwy okołowiązkowej. Ten rodzaj „pompy CO₂”, zwiększając poziom CO₂ hamuje wytwarzanie glikolanu, a tym samym ogranicza fotooddychanie (por. rozdział IV). Dla pełnego potwierdzenia tego modelu brak jest dotąd bezpośrednich danych dotyczących transportu kwasów C₄ z komórek mezofilu do pochwy okołowiązkowej (16). Zgodnie z modelem „pompy CO₂” wieńcowa budowa liści ma być adaptacją prowadzącą do zwiększonego stężenia CO₂ w tkankach, które hamuje fotooddychanie i zwiększa przez to wydajność fotosyntezy (por. Tabela 5).



Ryc. 12. Postulowane mechanizmy włączania CO₂ u roślin typu C₄ wynikające z budowy wieńcowej liścia. (16)

A — mechanizm pompy CO₂, B — mechanizm wychwytywania CO₂.

Drugi pogląd (zilustrowany na Ryc. 12B) zakłada, że pierwotna karboksylacja zachodzi w cytoplaźmie komórek mezofilu, a kwasy C_4 ulegają dekarboksylacji w chloroplastach, gdzie CO_2 zostaje włączony w redukcyjnym cyklu pentozowym. Związkami transportowanymi z chloroplastów komórek mezofilu do chloroplastów pochwy okołowiązkowej do syntezy skrobi są pośredniki cyklu Calvina. Część CO_2 może być wiązana bezpośrednio w komórkach pochwy okołowiązkowej. Według tego modelu fotooddychanie przebiega głównie w komórkach pochwy okołowiązkowej, a wydzielony CO_2 ponownie ulega związaniu w cytoplaźmie komórek mezofilu, co stanowić ma mechanizm „wychwytywania CO_2 ”. Za słuszością tego modelu przemawiają badania rozmieszczenia enzymów. Karboksylaza RuDP występuje we frakcjach pochodzących z komórek mezofilu (110, 112, 114, 115, 118), a rozmieszczenie innych enzymów cyklu Calvina nie różni się istotnie (1, 16, 99).

Pierwszym doświadczalnym potwierdzeniem mechanizmu włączania CO_2 według modelu B były dane z pracowni G i b b s a (148, 149), gdzie stwierdzono znaczne włączanie CO_2 przez chloroplasty 4-6 dniowych siewek kukurydzy i syntezę produktów charakterystycznych dla roślin typu C_3 , podczas gdy liście, z których wyizolowano chloroplasty, wytwarzały produkty fotosyntezy typu C_4 . Co więcej, karboksylazę PEP znaleziono w roztworze zastosowanym do izolowania chloroplastów, a otrzymane chloroplasty nie metabolizowały jabłczanu i aspiraginianu (148). Podobnie chloroplasty *Amaranthus* nie zawierały karboksylazy PEP, chociaż stwierdzono ją w supernatancie (150). Model B, którego zwolennikiem jest L a e t s c h (16) nie wymaga wahadłowego transportu metabolitów między warstwami komórek, jak w modelu A. Założenie, że karboksylacja PEP zachodzi w cytoplaźmie byłoby zgodne z ogólnym poglądem o miejscu tej reakcji w komórkach innych roślin (2). Ostateczne rozstrzygnięcie, który z tych modeli jest słuszny, będzie możliwe po opracowaniu lepszych metod izolowania komórek obu typów, uzyskaniu z nich chloroplastów włączających CO_2 , oraz po wykazaniu, że chloroplasty roślin typu C_4 mogą wytwarzać produkty fotosyntezy typu C_3 .

II-6. Charakterystyczne cechy fotosyntezy trzech podstawowych grup

Tabela 5 podaje zestawione przez Blacka porównawcze dane dotyczące właściwości fotosyntetycznych trzech podstawowych grup roślin (C_3 , C_4 i gruboszowatych). Niektóre charakterystyczne cechy tych roślin zostały już omówione w tekście artykułu, inne jak np. fotooddychanie będzie przedmiotem rozdziału IV, pozostałe natomiast przedstawione liczbowo w tabeli 5 ilustrują najlepiej zależność między budową liści tych roślin a następstwami fizjologicznymi lub biochemicznymi, które ona warunkuje. Dotyczy to między innymi takich parametrów jak optimum temperatury wegetacji, szybkości maksymalnej fotosyntezy, stężenia CO_2 w punkcie kompensacyjnym, wpływu stężenia tlenu na fotosyntezę i fotooddycha-

Tabela 5

Porównanie niektórych właściwości fotosyntetycznych trzech grup roślin. Zestawiono na podstawie danych Blacka i wsp. (7, 17, 135)

Cecha*	Podstawowy mechanizm włączania CO ₂		
	Typ C ₃	Typ C ₄	Gruboszowate
1. Budowa liści w przekroju poprzecznym	Swobodne rozmieszczenie organelli w komórkach mezofilu lub miększu palisadowego z podobną lub mniejszą zawartością organelli w komórkach pochwy okółowiązkowej (jeśli takie występują)	Tkanę przewodzącą otacza określona warstwa komórek pochwy okółowiązkowej, która zawiera dużą ilość organelli. Warstwa(y) komórek mezofilu otaczają komórki pochwy okółowiązkowej	Struktura o gąbczastym wyglądzie. Komórki mezofilu mają duże wakuole z organellami równomiernie rozmieszczonymi w cytoplazmie. Najczęściej brak określonej warstwy miększu palisadowego.
2. Optimum temperatury dnia dla włączania netto CO ₂	15—25°	30—47°	około 35°
3. Szybkość maksymalna fotosyntezy (mg CO ₂ /dm ² powierzchni liścia/godz.)	15—40	40—80	zwykle około 1—4 (najwyższa podawana 11—13)
4. Stosunek transpiracji (g H ₂ O/g suchej masy)	450—950	250—350	50—55
5. Stężenie kompensacyjne CO ₂ (części/milion)	30—70	0—10	0—5 w ciemności 0—200 w rytmie dobowym
6. Kolejność karboksylacji na świetle	Karboksylacja RuDP	Karboksylacja PEP, a następnie RuDP	Równoczesna karboksylacja PEP i RuDP
7. Teoretyczne wymagania energetyczne dla włączania netto 1 cząsteczki CO ₂ (CO ₂ ; ATP; NADPH)	1:3:2	1:5:2	1:6,5:2
8. Wrażliwość fotosyntezy na zmianę stężenia O ₂ w granicach 1—21%	tak	nie	tak
9. Fotooddychanie (utlenianie glikolanu)	Występuje	Trudne do wykrycia. Występuje	Trudne do wykrycia. Występuje

* W porównaniu tym przyjęto stężenie O₂ 21%, a stężenie CO₂ 0,03%.

nie. Ze względów ekologicznych i użytkowych najbardziej jest interesująca wydajność fotosyntetyczna roślin t.zw. produktywność.

III. Regulacja cyklu Calvina

Z przedstawionych w poprzednim rozdziale faktów wynika, że wspólnym dla wszystkich roślin mechanizmem włączania CO_2 w procesie fotosyntezy jest redukcyjny cykl fosforanów pentoz, nazywany potocznie cyklem Calvina. Tak podstawowy i powszechny proces, jak można oczekiwać, musi podlegać precyzyjnej i zróżnicowanej regulacji. W ostatnim dziesięcioleciu uzyskano wiele danych wskazujących, że mechanizm regulacji cyklu polega na zmianach aktywności enzymów, wywołanych światłem lub ciemnością oraz zmianach szybkości transportu metabolitów przez błonę chloroplastów (por. rozdział I). Wykazanie etapów cyklu podlegających regulacji stało się możliwe dzięki zastosowaniu trzech podstawowych technik badawczych: a) badanie kinetyki znakowania metabolitów cyklu w komórkach glonów *in vivo* oraz w izolowanych chloroplastach przy zmianie warunków oświetlenia: światło/ciemność i ciemność/światło; b) badanie poziomu metabolitów i koenzymów w rekonstruowanym układzie chloroplastów oraz c) badanie właściwości enzymów regulatorowych po ich wyizolowaniu, przy czym szczególnie charakterystycznym enzymem cyklu okazała się karboksylaza RuDP. Okazało się także, że istotnym elementem regulacji jest światło, które w sposób pośredni wpływa na aktywność enzymów regulatorowych. Wynikiem tego jest działanie cyklu redukcyjnego w świetle a oksydacyjnego w ciemności.

III-1. Enzymy regulacyjne cyklu

Enzymami odpowiedzialnymi za regulację szybkości działania cyklu redukcyjnego w świetle są: kinaza Ru-5P (a), karboksylaza RuDP (b), dehydrogenaza G-3P (c), fosfataza FDP (d), fosfataza SDP (e) oraz w oksydacyjnym cyklu fosforanów pentoz w ciemności: dehydrogenaza G-6P (f). Miejsce ich działania w cyklu Calvina zaznaczono strzałkami na rycinie 13.

Kinaza Ru-5P (a). Aktywność tego enzymu, dostarczającego RuDP, bezpośredniego akceptora CO_2 , wydaje się zależeć od dwóch czynników, obu uwarunkowanych światłem. Pierwszym jest wysoki stan energetyczny (organizmów chemosyntetyzujących lub chloroplastów), którego wynikiem jest wysoki poziom ATP (a niski AMP). Drugim jest wysoki poziom NADH w organizmach chemosyntetyzujących (3) lub ATP w fotosyntetyzujących. Wysoki poziom ATP jako substratu przyspiesza reakcję, natomiast hamuje ją AMP jako inhibitor współzawodniczy (151—155). Rola wysokiego poziomu NADH (156) może być dwójaka — jako źródła energii oraz jako czynnika redukującego. Dodanie bowiem witaminy K_s (156a), która przyjmując elektrony z fotosyntetycznego transportu i utleniając się w świetle tlenem z powietrza — uniemożliwia redukcję enzymu, a przez

to jego aktywację. Aktywność kinazy RuDP w chloroplastach i liściach wzrasta pod wpływem światła (157—161). Aktywacja enzymu w chloroplastach po ich wstępnym oświetleniu następuje po $t_{1/2} = 15$ sek, a wzbudzony światłem aktywny stan enzymu zanika w ciemności z szybkością $t_{1/2} = 8$ min. (160). Aktywność enzymu hamują wolne jony magnezu oraz inhibitory transportu elektronów. Wskazywałoby to, że aktywacja kinazy Ru-5P jest wynikiem wytworzonego pod wpływem światła reduktora w miejscu poprzedzającym ferredoksynę (160).

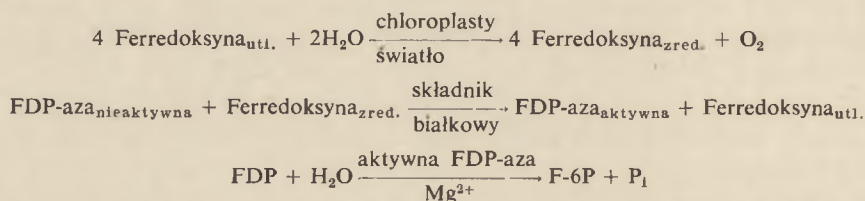
Dehydrogenaza G-3P (c). Enzym występujący w chloroplastach współdziała z NADP (162—164), a także z NAD. Próby rozdzielenia obydwu enzymów wydzielonych z liści szpinaku (165) i *Chlamydomonas reinhardi* (165) nie powiodły się, wykazano natomiast w enzymie otrzymanym z liści grochu (167), a ostatnio także z chloroplastów zielonych korzeni grochu współzawodnictwo między obu koenzymami. Na przykładzie doświadczeń z *Euglena gracilis* (169) i *Chlamydomonas reinhardi* (170) hodowanych w ciemności, a następnie oświetlanych, co powodowało wzrost aktywności dehydrogenazy współdziałającej z NADP, postulowano, że zmiana specyficzności enzymu wobec nukleotydów NAD i NADP następuje pod wpływem światła (170). W świetle enzym współdziałałby z NADPH, powstającym w wyniku fotosyntetycznego transportu elektronów, natomiast w ciemności z NADH, jak enzym glikolityczny. Przekształcenie jednej formy enzymu w drugą na skutek naświetlania etiolowanych siewek fasoli nie ulegała zahamowaniu przez chloramfenikol (171). Wzrost aktywności dehydrogenazy z NADP następował bardzo szybko (172), bo po 5—10 min. oświetlenia i nie hamowała go aktynomycyna (173). W izolowanych chloroplastach wzrostowi aktywności dehydrogenazy G-3P współdziałającej z NADP towarzyszył spadek aktywności z NAD (174), podobnie jak w liściach *Lemna gibba* (175). Wyniki te wskazywały, że pojawienie się formy enzymu współdziałającej z NADP nie jest syntezą białka *de novo*.

Ponieważ inkubacja homogenatu liści szpinaku lub bobu z NADPH zwiększała 6-krotnie aktywność dehydrogenazy, którą jeszcze wzmacniał dwutiotreitol, podczas gdy sam dwutiotreitol nie zwiększał aktywności enzymu (176), postulowano, że aktywacja dehydrogenazy G-3P przez światło polega na wytworzeniu w niecyklicznym transporcie elektronów NADPH, który jest związkiem aktywującym. Tłumaczyłoby to mechanizm aktywacji enzymu, ale nie zmianę specyficzności dehydrogenazy w stosunku do NAD i NADP w ciemności i na świetle. Biorąc pod uwagę budowę tetrameryczną dehydrogenazy G-3P oraz wyniki oznaczeń kinetycznych rozważano ostatnio możliwość występowania w enzymie dwu rodzajów miejsc wiążących nukleotydy (168). Jedne z nich mogłyby wiązać NAD i NADP, drugie zaś tylko jeden z nich, a więc inaczej niż w enzymie z *Euglena*, w którym istnieje oddzielne miejsce wiązania NAD i NADP (177). Dehydrogenazę G-3P aktywują ATP i wysokie stężenie jonów magnezu (178).

Fosfataza FDP i SDP (E.C. 3.1.3.11) (d,e). Badania zmian poziomu stężeń fruktozo-1,6-dwufosforanu i sedoheptulozo-1,7-dwufosforanu w komórkach *Chlorella* towarzyszące przejściu ze światła do ciemności i z ciemności do światła przyczyniły się do wykrycia regulatorowej roli fosfatazy FDP i SDP w przekształcaniu tych cukrów w ich monofosforany. FDP i SDP nagromadzały się w ciemności, natomiast w świetle ich poziom obniżał się (179). Dodanie w świetle kwasu kaprylowego (180) lub witaminy K₅ (156a) powodowało wzrost poziomu tych związków, co wskazywało na hamowanie fosfatazy. Również azotyn (działając jako akceptor elektronów) hamował aktywność fosfatazy FDP i SDP (19).

Fosfataza FDP jest enzymem chloroplastowym (157, 181). U *Euglena gracilis* hodowanej w ciemności aktywność tego enzymu jest niewielka, wzrasta zaś po naświetleniu komórek prawie równolegle ze wzrostem ilości chlorofilu (182a). Optimum pH fosfatazy FDP z liści szpinaku zależy od stężenia jonów magnezu (182). Homogenny preparat enzymu (182, 183) w odróżnieniu od swego odpowiednika z komórek нефотосынтетызujących, nie jest hamowany przez AMP. Oczyszczony enzym ma ciężar cząsteczkowy 195 000 (3).

Aktywność chloroplastowej fosfatazy FDP zależy od współdziałania enzymu ze składnikiem białkowym (niezidentyfikowanym), jonami magnezu i zredukowaną ferredoksyną (22, 183, 184) wg reakcji:



Zredukowaną ferredoksynę można zastąpić dwutiotreitolem (189). Aktywacja fosfatazy FDP i SDP pod wpływem światła polega więc na wywołaniu fotosyntetycznego transportu elektronów, któremu towarzyszy z jednej strony redukcja ferredoksyny, a z drugiej przemieszczanie się protonów, alkalizacja stromy chloroplastów i nagromadzanie się w niej Mg²⁺ (por. rozdział I-7). Ciemność uniemożliwia redukcję ferredoksyny i prowadzi do obniżenia pH i stężenia jonów Mg²⁺ w stromie. Wynikiem tych reakcji jest spadek aktywności fosfatazy, nagromadzenie się FDP i SDP i w następstwie zmniejszone włączanie CO₂ z braku dostatecznej ilości jego akceptora — RuDP.

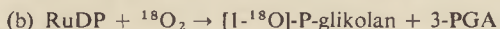
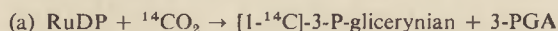
Dehydrogenaza G-6P (f). Badania kinetyki znakowania metabolitów fotosyntezy w komórkach *Chlorella* oraz chloroplastach (156a, 185) wykazały natychmiastowe pojawienie się 6-P-Glu po przejściu ze światła do ciemności lub w świetle w obecności witaminy K₅. W chloroplastach i liściach światło hamowało aktywność dehydrogenazy (186, 187), natomiast NADP ją aktywował (188). Co więcej, 6-P-Glu w fizjologicznym zakresie

stężeń hamuje aktywność karboksylazy RuDP (74, 190—192), co powoduje, znaczne obniżenie poziomu RuDP, substratu karboksylacji. Przeciwnie, zwiększony w świetle poziom RuDP powodował hamowanie aktywności dehydrogenazy G-6P niebiesko-zielonych glonów (193), a NADP w pewnych warunkach aktywował karboksylazę RuDP (194). Ostatnie badania Lendziana i Basshama (190) nie tylko potwierdziły poprzednie obserwacje, lecz stały się podstawą do bardziej precyzyjnego określenia mechanizmu regulacji dehydrogenazy G-6P przez RuDP i stosunek NADPH/NADP i oddziaływanie układu dehydrogenazy G-6P na redukcyjny cykl fosforanów pentoz. Tak więc RuDP i NADPH metabolity cyklu redukcyjnego, hamują aktywność dehydrogenazy G-6P, natomiast 6-P-Glu, metabolit cyklu oksydacyjnego hamuje aktywność karboksylazy RuDP. Jest to więc mechanizm wzajemnej regulacji obu cykli poprzez poziomy kluczowych metabolitów — RuDP i 6-P-Glu oraz wspólne ogniwo, jakim jest zmienny stosunek NADPH/NADP. Cykl redukcyjny podlega regulacji przez wysoki stosunek nukleotydów, a RuDP i 6-P-Glu są dalszymi czynnikami regulacji w cyklach, w których nie są metabolitami. W przeciwieństwie do innych organizmów w chloroplastach roślin ATP nie bierze udziału w regulacji dehydrogenazy G-6P i działania oksydacyjnego cyklu fosforanów pentoz (192).

III-2. Właściwości i regulacja karboksylazy RuDP

Karboksylaza RuDP (E.C. 4.1.139) (b) jest szczególnym enzymem cyklu fotosyntetycznej redukcji węgla, zarówno ze względu na katalizowaną przez siebie reakcję, jak i na swoje właściwości. Wynika to częściowo z właściwości substratu rybulozo-1,5-dwufosforanu. Ta ketoza bowiem, z dwoma grupami fosforanowymi i otwartym łańcuchem węglowym, jest tak reaktywna, że przyłączenie cząsteczki CO₂ z utworzeniem 2 cząsteczek 3-PGA zachodzi bez dodatkowego wkładu energetycznego (18). Szczególnie istotne są właściwości enzymu, który działa jako karboksylaza (194—196), ale także jako oksigenaza (197—199). Następstwa fizjologiczne tej ostatniej aktywności zostaną omówione w części IV artykułu.

Ta niespotykana specyficzność enzymu powoduje następujący przebieg reakcji:



W reakcji (a) enzym działa jako karboksylaza, w reakcji (b) zaś jako oksigenaza. W reakcji (a) CO₂ jest dołączany do C₂ RuDP a rozpad hydrolityczny zachodzi między C₂ i C₃, tworząc 2 cząsteczki 3-PGA. W reakcji (b) O₂ przyłącza się do C₂ RuDP (związanego z enzymem), który ma częściowo charakter anionowy na skutek utworzenia karboanionu przy C₂. Hydroliza tego pośrednika prowadzi do powstania fosfoglikolanu i 3-PGA.

Z przebiegu reakcji widać, że CO_2 i O_2 współzawodniczą o miejsce aktywne karboksylazy/oksygenazy RuDP, przy czym CO_2 hamuje reakcję utleniania a O_2 hamuje karboksylację RuDP.

Nie tylko właściwości enzymu, ale i historia jego odkrycia była nietypowa. W stanie elektroforetycznie czystym białko enzymu, jako t.zw. „frakcję I białka” otrzymali Wildman i Bonner w 1947 r. (200), a więc 7 lat wcześniej niż wykryto substrat i jego karboksylację (201, 202). Po blisko 25 latach wykazano identyczność „frakcji I białka” i karboksylazy RuDP (21, 22), która może stanowić nawet połowę frakcji rozpuszczalnej białek chloroplastowych (21). Oczyszczony preparat enzymu otrzymano prawie równocześnie w laboratoriach Horeckera, Ochoa'y i Rackera w latach 1956/57 (21, 22). Karboksylaza RuDP z glonów i wyższych roślin ma masę cząsteczkową około 560 000 daltonów ($S_{20,w} = 18,5$) i pod wpływem siarczanu dodecyłu, mocznika lub chlorowodoru gwanidyny dysocjuje na 2 rodzaje podjednostek: 8 o masie 54 000—60 000 i 8 podjednostek o masie 12 000—16 000 daltonów (22, 203).

Karboksylaza RuDP wykazuje duże powinowactwo do RuDP ($K_m = 1-2,5 \times 10^{-4} \text{M}$) (194, 204) przy wysycającym poziomie Mg^{2+} ($K_m = 1 \times 10^{-8} \text{M}$). Natomiast powinowactwo do HCO_3^- — jako do drugiego substratu ($K_m = 1-2 \times 10^{-2} \text{M}$) (204, 205) było od początku badań sprawą dyskusyjną, wobec małej aktywności cząsteczkowej karboksylazy (1340 $\mu\text{moli HCO}_3^-$ włączanego/mol enzymu/min.), enzymu o tak podstawowym znaczeniu. Ważnym odkryciem było stwierdzenie (206), że substratem karboksylazy jest CO_2 a nie HCO_3^- . Okazało się wówczas, że stała K_m wynosi $4,5 \times 10^{-4} \text{M}$. Odpowiada to w przybliżeniu ogólnej zawartości „ CO_2 ” ($\text{CO}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{CO}_3$) w zbuforowanym roztworze o pH 7,9 w równowadze z dwutlenkiem węgla w powietrzu (203). W roztworze o pH 7,9 gazowy CO_2 stanowi mniej niż 1% ogólnej ilości węgla, stąd dla uzyskania odpowiedniej szybkości włączania CO_2 przez preparat karboksylazy niezbędna jest aktywacja enzymu. Wniosek taki wypływał również z obserwacji, że izolowane chloroplasty wykazują większe powinowactwo do jonu węglanowego niż preparat karboksylazy (30, 207). Okazało się (23, 72, 200, 209, 211), że przez zwiększenie stężenia Mg^{2+} w mieszaninie reakcyjnej, zwiększa się powinowactwo karboksylazy do HCO_3^- i $K_m = 22 \text{mM}$ (206) osiąga wówczas wartość 5,6mM (68). Ostatnio stwierdzono występowanie formy karboksylazy RuDP o niskiej wartości K_m wobec HCO_3^- (0,5—0,8mM) (212), co odpowiadałoby nienaruszonym chloroplastom w czasie fotosyntezy. Zdaniem Lilley i Walkera (211) istotne znaczenie ma nie tylko powinowactwo ale także szybkość maksymalna i ilość karboksylazy. Dane Bahra i Jensena (212) wykazują bowiem, że forma karboksylazy o niskim K_m przy szybkości włączania 24 $\mu\text{moli CO}_2/\text{mg chl.}/\text{godz}$ niewiele różni się wydajnością od formy o pośredniej K_m (z mniejszym powinowactwem ale wyższej szybkości maksymalnej), która przy

tym samym stężeniu CO₂ w środowisku (9μM) włączała 27μmoli CO₂/mg chl./godz.).

Poza jonami magnezu, aktywatorami karboksylazy RuDP jest F-6P (209, 214), powstający w świetle z FDP pod wpływem fosfatazy, oraz znacznie silniejszym 6-P-Glu, FDP hamuje natomiast aktywność tego enzymu. Aktywność karboksylazy RuDP jest więc uwarunkowana stosunkiem stężeń F-6P/FDP (21). Obserwacje te są sprzeczne z wynikami pracowni Basshama (74, 190). Okazało się, że stymulacja lub hamowanie aktywności karboksylazy RuDP zależy nie tylko od stężenia badanych związków (substratów i efektorów) ale także od kolejności ich dodawania. Zapoczątkowało to bardziej szczegółowe badania własności regulatorowych tego enzymu (193a, 215).

Aktywność karboksylazy RuDP z liści szpinaku jest, przy niskich stężeniach CO₂ i 10mM stężeniu jonów magnezu, regulowana przez substraty — RuDP i CO₂ oraz przez efektory — 6-P-Glu, NADPH i FDP, nie jest nim natomiast F-6P. Wstępna preinkubacja enzymu z HCO₃⁻ i Mg²⁺ jest warunkiem koniecznym by fizjologiczne stężenia RuDP nie hamowały jego aktywności. Najwyższą aktywność enzymu uzyskuje się wówczas gdy mieszanina reakcyjna zawiera w czasie preinkubacji również 0,01mM 6-P-Glu lub 0,5 mM NADPH. Inhibitorami współzawodniczymi enzymu, po jego preinkubacji z HCO₃⁻ i Mg²⁺ w stosunku do RuDP są 6-P-Glu i FDP (wartości K_i dla 6-P-Glu i FDP wynoszą odpowiednio 0,02mM i 190 μM). NADPH lub 3-PGA dodane w stężeniach fizjologicznych równocześnie z RuDP nie wpływają na aktywność enzymu.

Na podstawie tych wyników, Chu i Bassham (190, 193a, 215) proponują allosteryczny model regulacji w połączeniu ze współzawodniczą inhibicją przez 6-P-Glu i FDP. Według tego modelu allosteryczne białko enzymu zawiera miejsca katalityczne, które wiążą substraty — RuDP i CO₂ oraz 6-P-Glu i FDP i co najmniej 4 miejsca regulatorowe, oznaczone I, A₁, A₂ i A₃. Przy braku Mg²⁺ lub HCO₃⁻, miejsce I wiąże silnie RuDP co powoduje zmiany konformacyjne cząsteczki enzymu, utrzymujące się przez 20 min, mimo dodanych następnie jonów magnezu i HCO₃⁻. Jeśli w środowisku nie ma RuDP, w miejscu A₃ wiąże się Mg²⁺ i HCO₃⁻ (lub CO₂), co powoduje utworzenie aktywnej formy enzymu ale z mniejszym powinowactwem do RuDP w miejscu I. Dodanie do takiego preparatu RuDP w stężeniu fizjologicznym wywołuje tylko częściową utratę jego aktywności. Ta aktywna forma enzymu może, w czasie preinkubacji z Mg²⁺ i HCO₃⁻, wiązać 6-P-Glu lub FDP w miejscu A₁ a NADPH w miejscu A₂. Przy optymalnym poziomie związanych efektorów (6-P-Glu lub NADPH) enzym zachowuje pełną aktywność, nawet jeśli następnie zostaje dodany RuDP. Przy braku jednego z efektorów, dodanie RuDP po okresie preinkubacji zmniejsza aktywność do ok. 40%. Mniej skuteczne działanie FDP jako efektora jest wynikiem wiązania go zarówno w miejscu I jak i A₁.

Tak złożony mechanizm regulacji aktywności karboksylazy RuDP tłumaczy wprowadzie obserwowane efekty różnych związków na aktywność enzymu, jednak do pełnego wyjaśnienia mechanizmu konieczne będzie zbadanie współdziałania podjednostek katalitycznych i regulatorowych allosterycznego białka enzymatycznego w wiązaniu substratów i efektorów.

III-3. Regulacja cyklu

Badania kinetyki znakowania metabolitów w komórkach *Chlorella* i izolowanych chloroplastach w czasie przejścia światło—ciemność i ciemność—światło oraz w świetle po dodaniu inhibitorów (witaminy K_s i kwasu kaprylowego) wykazały: regulację na świetle następujących etapów redukcyjnego cyklu fosforanów pentoz (18, 19, 73, 156a, 179), oznaczonych strzałkami na rycinie 13: (a) fosforylacja Ru5P z utworzeniem RuDP; (b) karboksylacja RuDP z utworzeniem 3-PGA; (c) redukcja 3-PGA z utworzeniem G-3P; (d) i (e) hydroliza FDP i SDP z utworzeniem monofosforanów tych cukrów, a w ciemności, w oksydacyjnym cyklu fosforanów pentoz utlenianie G-6P z utworzeniem 6-PGlu (f).

Światło nie aktywuje bezpośrednio żadnego z tych enzymów. Wywołuje natomiast transport elektronów i protonów w chloroplastach, któremu towarzyszy wytwarzanie czynników redukcyjnych w postaci zredukowanej ferredoksyny i NADPH oraz gromadzenie się w stromie jonów Mg^{2+} (por. rozdz. I-7). Dopiero one są bezpośrednimi aktywatorami enzymów. I tak jony Mg^{2+} i zredukowana ferredoksyna aktywują fosfatazy FDP i SDP; NADPH i Mg^{2+} aktywują karboksylazę RuDP, a NADPH kinazę Ru5P i dehydrogenazę G-3P.

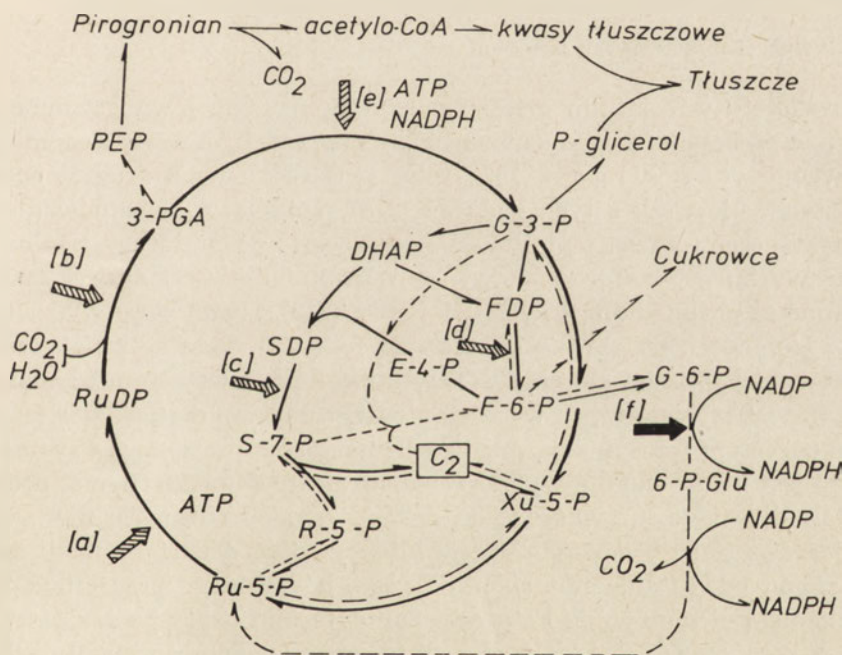
Brak światła natomiast, przerywając transport elektronów aktywuje dehydrogenazę G-6P na skutek gromadzenia się w tych warunkach NADP, który jest właściwym aktywatorem enzymu.

Zaznaczone strzałkami na rycinie 13 miejsca regulacji metabolicznej cyklu działają łącznie, aktywując w świetle fotosyntetyczny cykl redukcji węgla przy wysokim stosunku NADPH/NADP, a w ciemności hamują go przy niskim stosunku NADPH/NADP, aktywując równocześnie za pośrednictwem dehydrogenazy G-6P oksydacyjny cykl fosforanów pentoz.

Powiązania cyklu Calvina z dalszymi przemianami są następujące: Kinaza pirogronianowa (enzym regulatorowy występujący poza cyklem) przekształca FEP w pirogronian, który jest substratem w syntezie aminokwasów (alaniny) lub kwasów tłuszczowych (poprzez acetyloCoA). Spadek aktywności fosfatazy FDP powoduje nagromadzenie się 3-PGA, (G-3P) i DHAP, które mogą być wykorzystane w syntezie tłuszczów i białek. Synteza tłuszczów z cukru wymaga redukcji DHAP w celu wytworzenia fosforanu glicerolu, co powoduje zmniejszenie szybkości utleniania fosforanów trioz w ciemności. G-6P powstaje z F-6P zarówno w świetle jak i w ciemności. Na świetle obydwa związki są przekształcane w cukrowce

z udziałem UTP w syntezie sacharozy lub ATP w syntezie skrobi, w ciemności zaś G-6P zostaje utleniony do 6-PGlu.

Charakterystycznym elementem regulacji cyklu jest fakt, że 3-PGA i fosforany trioz potrzebne do syntezy białka i tłuszczu powstają w następstwie karboksylacji a przed reakcją katalizowaną przez fosfatazy FDP i SDP. Natomiast związek potrzebny do syntezy cukrowców — frukto-6-fosforan pojawia się po reakcji katalizowanej przez fosfatazę FDP a przed reakcją karboksylacji. Karboksylacja RuDP i reakcja katalizowana przez fosfatazy FDP i SDP są etapami ograniczającymi szybkość działania cyklu Calvina. Mała przeto nawet zmiana stosunku aktywności tych enzymów może powodować, że pośredniki cyklu zaczną nagromadzać się bądź w pierwszej połowie cyklu, t.j. między reakcją katalizowaną przez karboksylazę RuDP a reakcją katalizowaną przez fosfatazę FDP, bądź też drugiej połowie cyklu po reakcji katalizowanej przez fosfatazę FDP a przed karboksylacją RuDP. Ten mechanizm regulacji umożliwia gromadzenie się metabolitów cyklu redukcji węgla w miejscu, gdzie są one potrzebne do dalszych biosyntez (18).



Ryc. 13. Fotosyntetyczny cykl redukcji fosforanów pentoz (cykl Calvina) i etapy jego regulacji wg Basshama (18—20, uproszczony). Objaśnienia w tekście.

Wspólną cechą wszystkich enzymów regulatorowych cyklu jest, zgodnie z ogólną zasadą, „nieodwracalność” katalizowanych przez nie reakcji. Wartości zmiany energii swobodnej stanów równowagi dynamicznej poszczególnych reakcji w przypadku reakcji katalizowanej przez fosfatazę

FDP i SDP $\Delta G = -7\text{Kcal}$, w przypadku karboksylazy RuDP $\Delta G = -10\text{Kcal}$, a dla przekształcenia Ru5P w RuDP $\Delta G = -4\text{Kcal}$. Każdy z pozostałych 9 etapów cyklu, które w świetle nie są regulowane mają wartości ΔG między 0 a -2Kcal . (216). Tej samej prawidłowości podlega również przekształcenie PEP w pirogronian, którego $\Delta G = 4,5\text{Kcal}$, natomiast dla dwuetapowego przekształcenia 3-PGA w PEP $\Delta G = -2\text{Kcal}$ (217).

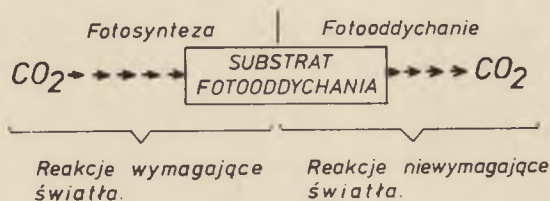
Te zmiany ujemnej wartości energii swobodnej wyrażają straty potencjału chemicznego w wyniku przekształcenia w ciepło w temperaturze pokojowej. Straty te odpowiadają wzrostowi entropii w całym układzie i są różnicą między energią, która została zgromadzona w wytworzonym ATP, NADPH i tlenie w reakcjach świetlnych a energią wytworzonych produktów fotosyntezy i wydzielonego tlenu. Tak więc, mimo strat energii jakie towarzyszą reakcjom katalizowanym przez enzymy regulatorowe, jest to zjawisko korzystne dla układów biologicznych, ponieważ przeciwdziała znaczniejszemu wzrostowi entropii (19).

IV. Fotooddychanie

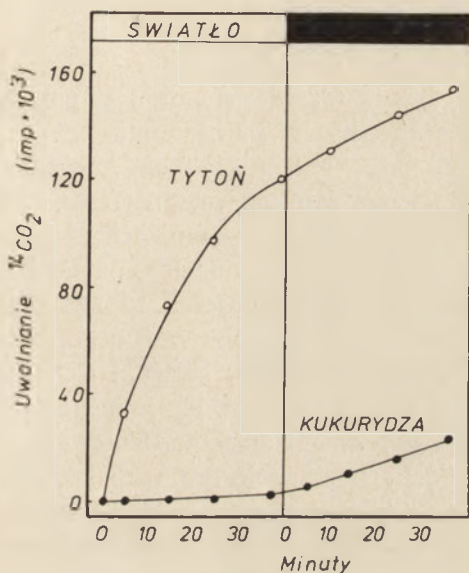
IV-1. Ogólna charakterystyka procesu

Rozwinięte w ostatnim dziesięcioleciu intensywne i wielostronne badania nad procesem fotooddychania roślin, poprzedziły o wiele wcześniejsze obserwacje Warburga z 1920 roku i Deckera z drugiej połowy lat 50-tych. Pierwszy z tych badaczy (218) zaobserwował hamowanie fotosyntezy glonów przez O_2 i zjawisko to przeszło do literatury pod nazwą efektu Warburga, drugi zaś stwierdził uwalnianie CO_2 z liści tytoniu w ciemności po uprzednim ich oświetleniu (219). Gwałtowne wydzielanie CO_2 w ciemności, po okresie oświetlania liści wzrastało ze zwiększeniem intensywności światła, stężenia CO_2 w atmosferze i wzrostem temperatury (220). Wskazywało to, że wydzielanie CO_2 w ciemności jest ściśle związane z procesem fotosyntezy, jak to schematycznie przedstawia rycina 14. Światło jest niezbędne dla wytworzenia substratu fotooddychania, podczas gdy dalsze reakcje, prowadzące do dekarboksylacji substratu nie wymagają już światła. Po pewnym czasie intensywność dekarboksylacji spada do poziomu oddychania mitochondrialnego, nazywanego przez fizjologów oddychaniem ciemniowym. Fotooddychanie, termin użyty po raz pierwszy przez Deckera i Tió (220a), jest to stymulowane światłem uwalnianie CO_2 i pobieranie O_2 (220b). Proces ten, charakteryzujący przede wszystkim rośliny typu C_3 , w znacznym stopniu obniża wielkość fotosyntezy netto. Cechuje go wysoki punkt kompensacyjny dla CO_2 , rzędu 40—70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ w 21% O_2 i 25° (25, 27), który w pewnych przypadkach (niektóre drzewa) może wynosić nawet 155 (27). Oznacza to, że w wyniku fotosyntezy rośliny te nie mogą obniżyć poniżej tej granicy stężenia CO_2 w zamkniętej przestrzeni. Dla porównania straty CO_2 na skutek fotood-

dychania w roślinach typu C₄ i gruboszowatych są niewielkie i punkt kompensacyjny CO₂ jest bliski 0 (25) (por. Tabela 5). Szybkość uwalniania ¹⁴CO₂ w świetle i w ciemności przez tytoń — roślinę typu C₃ i kukurydzę — roślinę typu C₄ przedstawia rycina 15.

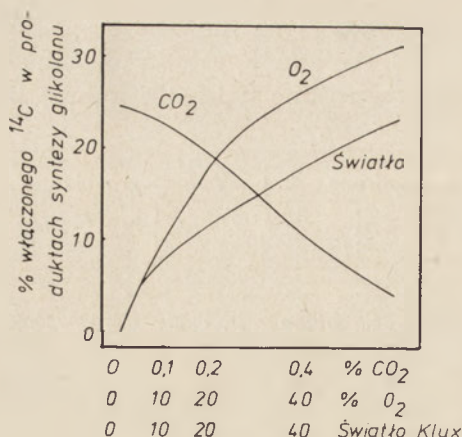


Ryc. 14. Schemat zależności między fotosyntezą a fotooddychaniem.



Ryc. 15. Wpływ światła i ciemności na uwalnianie ¹⁴CO₂ przez liście tytoniu i kukurydzy (243).

Z badań fizjologicznych wiadomo, że szybkość fotooddychania zależy przede wszystkim od takich czynników, jak: stężenie CO₂, stężenie O₂, intensywność światła oraz temperatura. Rycina 16 przedstawia schematycznie współzależność pierwszych trzech czynników i ich wpływ na szybkość pojawiania się ¹⁴CO₂ pochodzącego z przekształceń glikolanu. Przedstawiając wpływ danego czynnika założono, że dwa pozostałe mają wielkość charakterystyczną dla warunków występujących w przyrodzie, a więc 21% O₂, 0,03% CO₂ i pełne światło słoneczne. Z wykresu tego widać, że przy wzroście stężenia CO₂ następuje zmniejszenie ilości włączonego ¹⁴C do glikolanu i związków z niego powstających, natomiast stężenia O₂ i intensywności światła zwiększa ilość ¹⁴C uwolnionego z glikolanu i jego metabolitów. Podobnie wpływa wzrost temperatury otoczenia. Z przedstawionych na rycinie 16 zależności wynika, że istniejące w przyrodzie warunki sprzyjają procesowi fotooddychania, są natomiast mniej korzystne dla procesu fotosyntezy i ją ograniczają.



Ryc. 16. Współzależność wpływu CO₂, O₂ i światła na tworzenie glikolanu w roślinach (27).

Jedną z metod stosowanych do wykrycia fotooddychania jest pomiar netto fotosyntezy tego samego liścia w atmosferze 2⁰/₀ a następnie 21⁰/₀ O₂. W roślinach, charakteryzujących się fotooddychaniem, szybkość fotosyntetycznego włączania CO₂ jest około 45⁰/₀ wyższa w obecności 2⁰/₀ O₂ niż 21⁰/₀ O₂ przy 0,03⁰/₀ CO₂ i w 25°. Zmiana stężenia tlenu w granicach 2—21⁰/₀ natomiast nie wpływa na szybkość fotosyntezy w roślinach typu C₄ (25, 221) a stężenia wyższe (21—100⁰/₀) hamują nawet ten proces (222, 223). Zahamowanie to nie jest bezpośrednio związane z efektem Warburga, charakterystycznym dla roślin typu C₃, gdyż zwiększenie stężenia CO₂ nie cofa całkowicie tej inhibicji (222) ani jej nie usuwa (223). Istnieją sugestie, że w komórkach mezofilu roślin typu C₄ zwiększone stężenie tlenu hamuje odtwarzanie PEP (224, 225) względnie dekarboksylację lub karboksylację w komórkach pochwy (226). Wydaje się, że hamujący wpływ O₂ można obecnie tłumaczyć własnościami oksygenazy RuDP w sposób przedstawiony w rozdziale IV-2b.

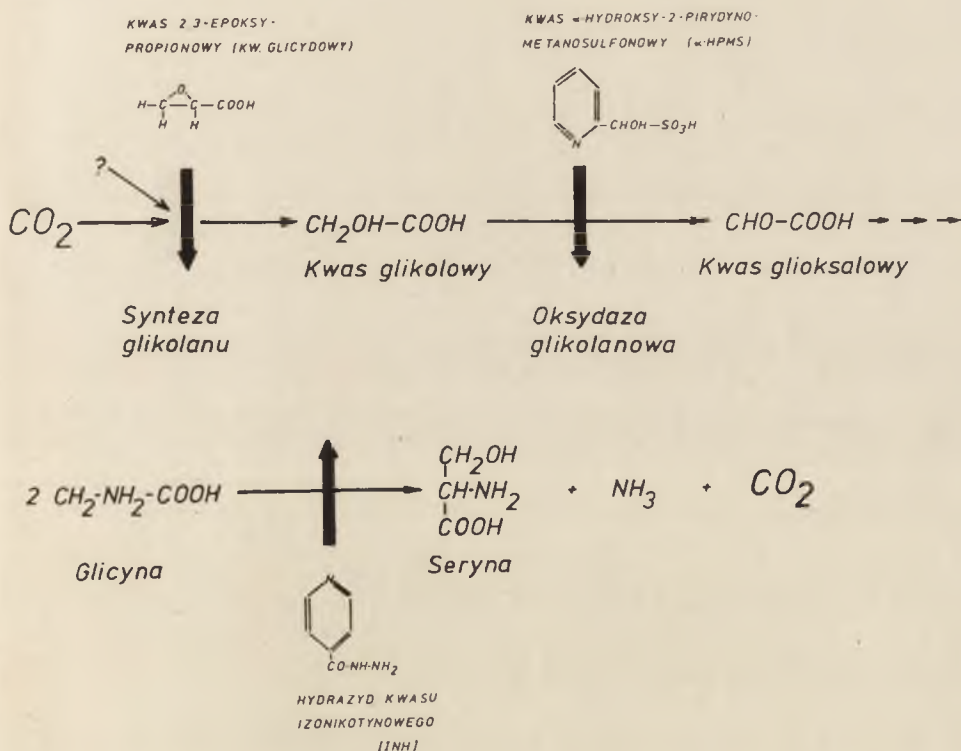
Mimo opracowania wielu metod dokładny pomiar fotooddychania jest nadal trudny i jest ciągle przedmiotem rozważań (5, 24, 25, 227, 228). Przede wszystkim trudno rozróżnić i oszacować ilościowo CO₂ pochodzący z oddychania mitochondrialnego od CO₂ wydzielanego w procesie fotooddychania. Trudno też oznaczyć ilość ponownie włączonego CO₂, pochodzącego z fotooddychania. Z przeprowadzonych doświadczeń przez Mangata i wsp. (229) wynika, że oddychanie mitochondrialne w świetle stanowi tylko 1/4 tego oddychania w ciemności, natomiast Raven (230), opierając się na danych doświadczalnych wielu autorów, uważa, że oddychanie mitochondrialne zachodzi w ciemności i w świetle z jednakową intensywnością. Podobne rozbieżności poglądów dotyczą też ponownego włączania CO₂ pochodzącego z fotooddychania gdyż może ono wynosić od 1/3 (231) do 2/3 (232) ilości wydzielonego CO₂.

Mimo tych trudności można jednak oszacować wielkość fotooddychania na podstawie wyników uzyskanych trzema niezależnymi metodami (26):

a) dokonując pomiarów wydzielania CO₂ do atmosfery pozbawionej tego gazu; b) przez ekstrapolację intensywności fotosyntezy przebiegającej przy różnych stężeniach CO₂ do stężenia zerowego tego gazu, i c) przez oznaczanie zróżnicowanego pobierania ¹⁴CO₂ i ¹²CO₂ (231, 233). Otrzymane tymi metodami dane wykazują, że szybkość fotooddychania roślin typu C₃ stanowi około 1/6 szybkości netto fotosyntezy w 25°, gdy stężenie CO₂ wynosi 0,03% a stężenie O₂ — 21% (25, 227, 234).

IV-2. Biosynteza substratu fotooddychania

Glikolan, jeden z pierwszych produktów fotosyntezy, jest powszechnie uważany za substrat fotooddychania (5, 24, 25, 27). Znaczne ilości glikolanu gromadzą się w pewnych warunkach w glonach (235—237). W liściach roślin syntezę glikolanu hamuje kwas glicydowy (2,3-epoksypropionowy) * (238), a utlenianie glikolanu do glioksalanu hamuje kwas α-hydro-



Ryc. 17. Miejsca działania inhibitorów syntezy i utleniania glikolanu.

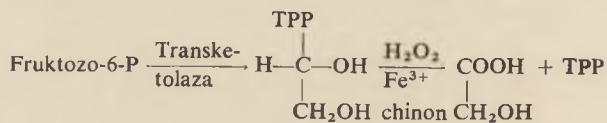
* Ostatnio stwierdzono, że kwas glicydowy jest inhibitorem oksigenazy RuDP, nie wpływa natomiast na aktywność karboksylazy RuDP (G. F. Wildner, J. Henekel, (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69, 268—275).

ksy-2-pirydynometanosulfonowy (239). Utworzona glicyna zostaje przekształcona dalej w serynę z wydzielaniem CO_2 i proces ten hamuje hydrazid kwasu izonikotynowego (239a), użyty pierwotnie przez Goldsworthy'ego (240) do hamowania fotooddychania (Ryc. 17).

Z kilku możliwych dróg biosyntezy glikolanu w komórkach glonów i roślin wyższych, za najbardziej prawdopodobne uważa się powstawanie glikolanu w reakcji katalizowanej przez transketolazę oraz w reakcji katalizowanej przez oksygenazę RuDP (26, 27, 241, 242).

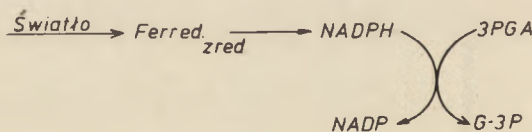
IV-2a. Powstawanie glikolanu z DHE-TPP

Powstające w fotosyntetycznym cyklu redukcji węgla ketozy (np. F-6-P, Xu-5-P, S-7-P) tworzą z TPP w reakcji katalizowanej przez transketolazy kompleks, pirofosforan dwuhydroksyetylotiaminy (DHE-TPP), t.zw. „aktywny aldehyd glikolowy”, który w obecności utleniacza (Fe^{3+} , H_2O_2 , chinonu, DCIP) ulega nieenzymatycznemu rozpadowi do glikolanu i TPP:

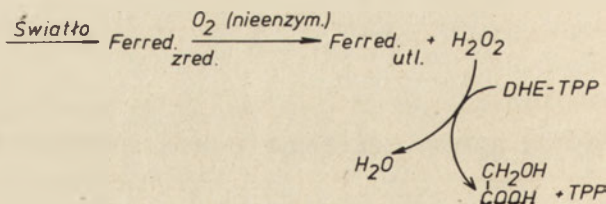


Mechanizm ten zdawał się znajdować potwierdzenie w wynikach pracowni Gibbsa (244, 245) gdzie stwierdzono, że izolowane chloroplasty, do których dodano F-6-P lub DHE-TPP oraz transketolazy i ferredoksy-

A) Wysokie $[\text{CO}_2]$, niskie $[\text{O}_2]$



B) Wysokie $[\text{O}_2]$, niskie $[\text{CO}_2]$



Ryc. 18. Powstawanie glikolanu z DHE-TPP wg hipotezy Coombsa i Whittinghama (246).

ny, tworzyły na świetle glikolan z szybkością odpowiadającą szybkości fotosyntezy. W procesie tym utleniaczem miał być H₂O₂, powstający w reakcji zredukowanej ferredoksyny z tlenem (reakcja Mehlera). Dodanie katalazy lub inhibitora fotosyntetycznego transportu elektronów hamowało syntezę glikolanu.

Możliwość syntezy glikolanu tą drogą rozważali już wcześniej Coombs i Whittingham (246), zakładając, że efekt Warburga jest wynikiem współzawodnictwa między CO₂ i O₂ o związek redukujący, powstający w reakcjach świetlnych fotosyntezy. Przy wysokim stężeniu CO₂ i niskim O₂ (Ryc. 18, reakcja A) występujący w dostatecznej ilości 3-PGA miał ulegać redukcji przez NADPH do G-3-P, natomiast przy niskim stężeniu CO₂ a wysokim O₂ (reakcja B) i niskim poziomie 3-PGA, który mógłby ulec redukcji, zredukowana ferredoksyna miała ulegać utlenianiu tlenem atmosferycznym z utworzeniem H₂O₂, który z kolei miał utleniać DHE-TPP do glikolanu.

Bardziej szczegółowa analiza tej drogi syntezy glikolanu wykazała, że proponowany mechanizm jest sprzeczny z wieloma obserwacjami. Po pierwsze zakłada on, że przy niskim stężeniu CO₂ synteza glikolanu będzie wzrastać wraz ze wzrostem intensywności światła, gdyż w tych warunkach będą powstawać znaczne ilości nadtlenu wodoru. Synteza glikolanu u *Chlamydomonas reinhardtii* okazała się jednak proporcjonalna do szybkości fotosyntezy przy różnych stosowanych intensywnościach światła (247). Postulowanego mechanizmu nie potwierdziły również oznaczenia punktu kompensacyjnego CO₂ przy różnym oświetleniu (248).

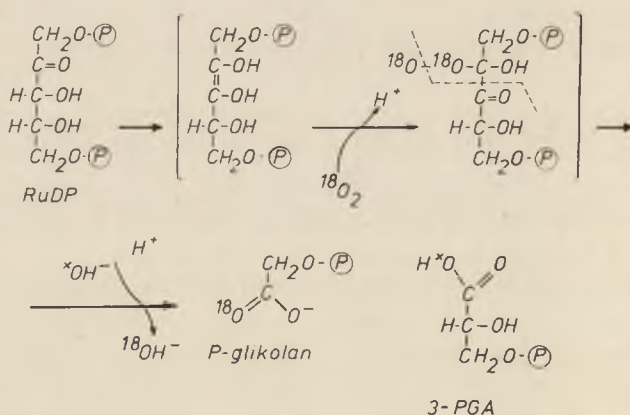
Przeciwko hipotezie Coombsa i Whittinghama przemawiają dalsze fakty. Tworzenie H₂O₂ przez fragmenty chloroplastów i nienaruszone liście osiąga maksimum przy 80% O₂ (249) podczas gdy taki poziom stymulacji fotooddychania nie następuje przy 100% O₂ (22, 250). Co więcej, znakowany ¹⁸O₂ pojawia się w grupie karboksylowej glikolanu a nie w wodzie powstającej z H₂O₂ (Ryc. 17, reakcja B). Mechanizm tworzenia glikolanu z DHE-TPP nie uwzględnia również występowania w chloroplastach aktywnej fosfatazy glikolanu i jej substratu P-glikolanu (253), a ponadto, wiadomo, że 50% CO₂ asymilowanego w procesie fotosyntezy ulega włączeniu poprzez glikolan (5, 27, 231). Trudno więc przyjąć by tak duży przepływ węgla w układzie biologicznym dokonywał się w nieenzymatycznym ciągu reakcji.

IV-2b. Powstawanie glikolanu w reakcji katalizowanej przez oksygenazę RuDP

Oksygenaza RuDP. Wykrycie w 1971 roku przez Bowesa, Ogrena i Hagemana (197), że karboksylaza RuDP ma również aktywność oksygenazy zapoczątkowało badania, których wyniki w istotny sposób przyczyniły się do wyjaśnienia wpływu O₂ na fotosyntezę i fotooddychanie (198,

199, 251, 252). Karboksylaza/oksygenaza RuDP katalizuje przyłączanie CO_2 lub O_2 do C_2 RuDP, który ma charakter anionowy na skutek utworzenia karboanionu przy C_2 . Hydroliza tego pośrednika po przyłączeniu O_2 , prowadzi do powstania 3-PGA i P-glikolanu, który pod wpływem fosfatazy występującej w chloroplastach (253) zostaje przekształcony w glikolan (Ryc. 19). CO_2 i O_2 współzawodniczą zapewne o miejsce aktywne karboksylazy/oksygenazy RuDP, gdyż O_2 jest inhibitorem współzawodniczym z CO_2 w reakcji katalizowanej przez karboksylazę, a CO_2 inhibitorem współzawodniczym z O_2 w reakcji katalizowanej przez oksygenazę (234, 251, 254, 255). Obie aktywności występują w dużej podjednostce enzymu (252, 256). Stosunek aktywności karboksylazy/oksygenazy podlega regulacji przez stężenia RuDP, CO_2 , O_2 , Mg^{2+} oraz pH (257). Aktywność oksygenazy hamują R-5-P i inne fosforany cukrów (258).

Na uwagę zasługuje to, że stosunek aktywność oksygenazy RuDP do aktywności karboksylazy RuDP, nie ulega zmianie w preparatach enzymu otrzymanych z organizmów względnie tlenowych np. *Rhodospirillum rubrum* (259) lub beztlenowych np. *Chromatium* (252). Podobnie nieoczekiwaną i nietypową jest właściwość enzymu przyłączania O_2 bez udziału flawoproteidu lub układu hemowego jak to ma miejsce w przypadku innych oksygenaz. Być może jest to wynikiem powstawania karboanionu przy C_2 RuDP, którego energia jest wystarczająca do reagowania z CO_2 lub O_2 (260).



Ryc. 19. Schemat reakcji katalizowanej przez oksygenazę RuDP.

Reagowanie karboksylazy/oksygenazy RuDP z CO_2 lub O_2 powoduje, że stężenia tych substratów są czynnikiem regulującym zarówno szybkość katalizowanych reakcji, jak i rodzaj tworzonych produktów. Duże stężenie O_2 a małe CO_2 stymuluje powstawanie P-glikolanu — substratu fotooddychania, natomiast duże stężenie CO_2 a małe stężenie O_2 (poniżej 21%)

stymuluje karboksylację, w wyniku której powstaje 3-PGA, jeden z pośredników cyklu fotosyntetycznej redukcji węgla. Te zależności mogą tłumaczyć mechanizm efektu Warburga.

Obok względnego stosunku stężeń CO₂/O₂, drugim czynnikiem regulującym syntezę glikolanu jest temperatura, wpływająca w różnicowany sposób na powinowactwo karboksylazy RuDP do CO₂ a oksygenazy do O₂. Ze wzrostem temperatury maleje powinowactwo karboksylazy do CO₂, co powoduje zmniejszenie szybkości karboksylacji. Powinowactwo enzymu do O₂ nie ulega w tych warunkach istotnym zmianom, co w rezultacie prowadzi do zwiększonej w stosunku do karboksylazy, aktywności oksygenazy a przez to i syntezę glikolanu, stymulującego fotooddychanie (234). Nie ma zgodności czy energia aktywacji reakcji karboksylacji i oksygenacji RuDP jest jednakowa (274) czy też różna (254).

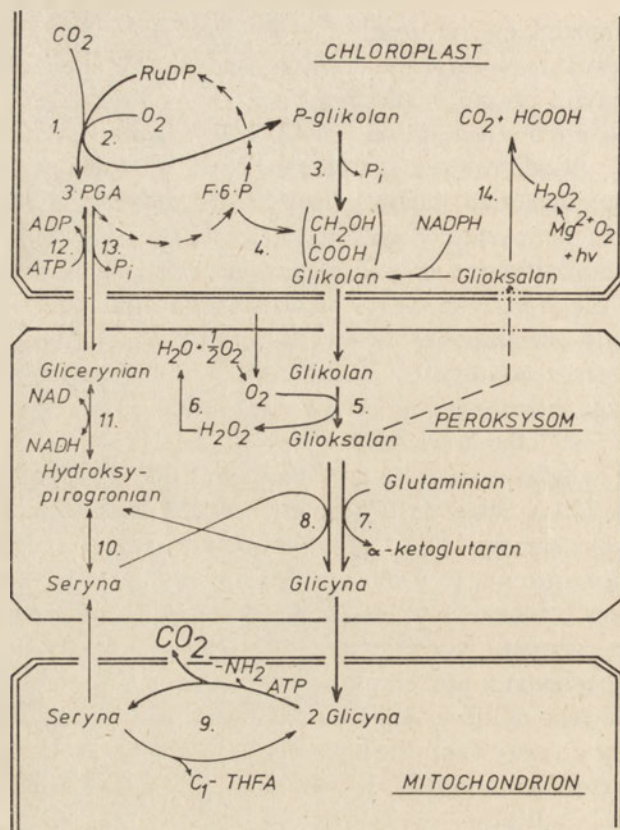
Dwutlenek węgla w stężeniu 0—300 cz./milion nie wpływa na proces fotooddychania (231). Stężenia CO₂ rzędu 700—1200 cz./milion nie hamują syntezę glicyny i seryny (261) i glikolanu (242, 247), co mogłoby wskazywać, że wysokie stężenia CO₂ nie hamują fotooddychania (261).

Ze wzrostem intensywności światła, fotooddychanie zwiększa się proporcjonalnie do wzrostu fotosyntezy. Ponieważ glikolan, jako substrat fotooddychania pochodzi z pośredników cyklu Calvina, światło jest niezbędne do działania tego cyklu a także do aktywacji oksygenazy RuDP, w sposób analogiczny do aktywacji karboksylazy RuDP (por. rozdział I-7 i III-2). Światło może również wpływać na wielkość fotooddychania, hamując oddychanie mitochondrialne.

Barwa światła wpływa na metabolizm glikolanu u glonów i roślin wyższych (262, 263), jednakże dotychczasowe wyniki nie wyjaśniają obserwowanych efektów (27).

IV-2c. Utlenianie glikolanu i wydzielanie CO₂

Pierwszym etapem w procesie fotooddychania jest synteza glikolanu w chloroplastach. Jego dalsze przemiany zachodzą, jak się obecnie przyjmuje, w sposób przedstawiony na rycinie 20 (27, 264, 265). Z chloroplastów glikolan przemieszcza się do peroksysomów, organelli o pojedynczej błonie, występujących w bliskim sąsiedztwie mitochondriów (Ryc. 21). W peroksysomach glikolan zostaje utleniony do glioksalanu z utworzeniem H₂O₂. W reakcji nieenzymatycznej z H₂O₂ glioksalan może wytworzyć mrówczan oraz CO₂, który według pierwotnego poglądu Zelitcha (23) miał być wynikiem fotooddychania. Później stwierdzono, że po dodaniu glikolanu i jonów manganu do izolowanych chloroplastów w warunkach tlenowych następuje po ich oświetleniu wydzielanie CO₂ (267, 268). Na tej podstawie Zelitch (268) sugerował, że glioksalan przenika do chloroplastów

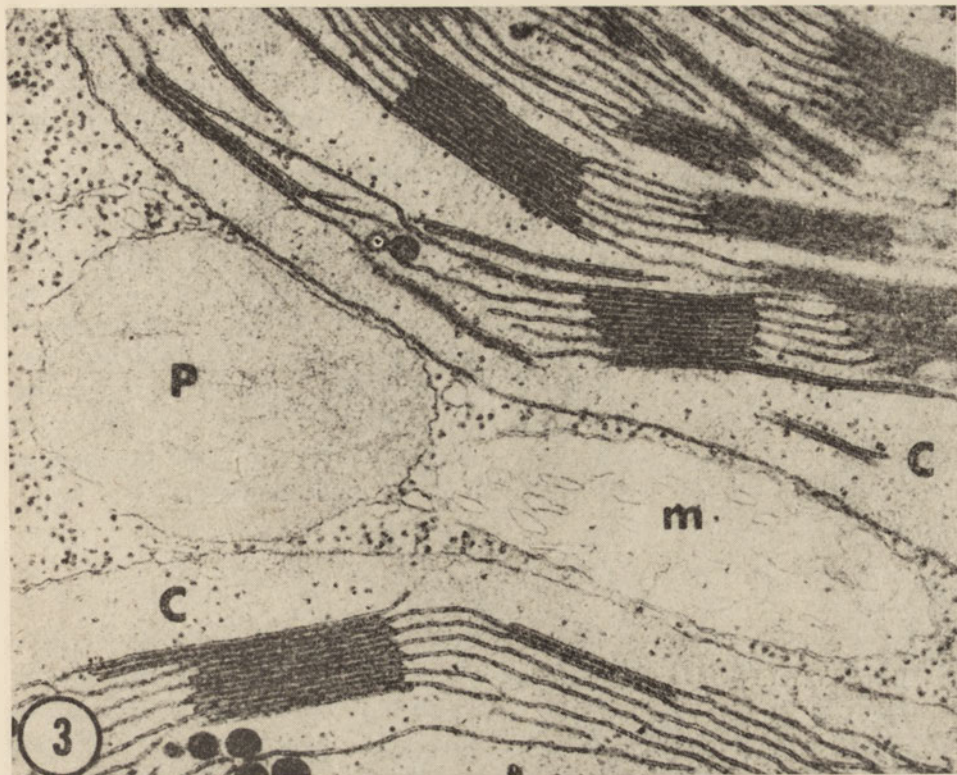


Ryc. 20. Postulowany przez Tolberta metabolizm glikolanu w procesie fotooddychania (27, 265, 265).

1. Karboksylaza RuDP; 2. Oksygenaza RuDP; 3. Fosfataza P-glikolanu; 4. Nieenzymatyczne utlenienie DHE-TPP; 5. Oksydaza glikolanu; 6. Katalaza; 7. Aminotransferaza glutaminian-glioksalan; 8. Aminotransferaza seryna-glioksalan; 9. Hydroksymetylotranferaza serynowa; 10. Aminotransferaza (niezidentyfikowana); 11. Oksydoreduktaza NADH: hydroksypirogronian; 12. Kinaza glicerynianowa; 13. Fosfataza 3-PGA.

tów i tam jest nieenzymatycznie utleniany do CO_2 i mrówczanu przez H_2O_2 , powstający w reakcji świetlnej fotosyntezy. Ostatnio stwierdzono, że ten typ reakcji zachodzi również w peroksysomach, jednakże z niewielką szybkością (269).

Uwalnianie CO_2 z grupy karboksylowej glikolanu następuje ze znaczną szybkością po przekształceniu go w glicynę, w reakcji katalizowanej przez aminotransferazę. W mitochondriach, z dwóch cząsteczek tego aminokwasu uwalnia się CO_2 i powstaje seryna. To przekształcenie glicyny w serynę uważa się obecnie za główne źródło CO_2 w procesie fotooddychania (27, 264, 265), pomimo, że szybkość tej przemiany stwierdzonej w krążkach liści tytoniu (239a) była znacznie mniejsza niż szybkość fotooddycha-



Ryc. 21. Chloroplasty, peroksysony i mitochondria w komórkach mesofilu liścia tymotki (*Phleum pratense*) (266).

C — chloroplast, m — mitochondrium, p — peroksyson.

nia. Dekarboksylację glicyny stymulują wzrastające do 100% stężenia tlenu (270). Z ryciny 20 widać, że tlen bierze udział w reakcjach powstawania oraz utleniania glikolanu katalizowanych przez oksygenazę RuDP i oksydazę glikolanu (odpowiednio).

IV-2d. Wpływ tlenu — efekt Warburga

Hamowanie fotosyntezy przez tlen, który jednocześnie stymuluje syntezę glikolanu i jego utlenianie w procesie fotooddychania, bywa tłumaczone w różny sposób. Coombs i Whittingham (246) sugerują, że stymulowana tlenem synteza glikolanu zmniejsza poziom pośredników cyklu Calvina i w ten sposób obniża stężenie RuDP, akceptora CO₂. Potwierdzeniem tego poglądu mogłoby być częściowe cofnięcie inhibicji fotosyntezy wywołanej O₂ przez dodanie R-5-P i FDP (242). Nie wiadomo jednak, czy jest to cofnięcie inhibicji czy skracanie okresu zastoju włączania CO₂ (23) (por. rozdział I-2). Pogląd o obniżaniu poziomu RuDP

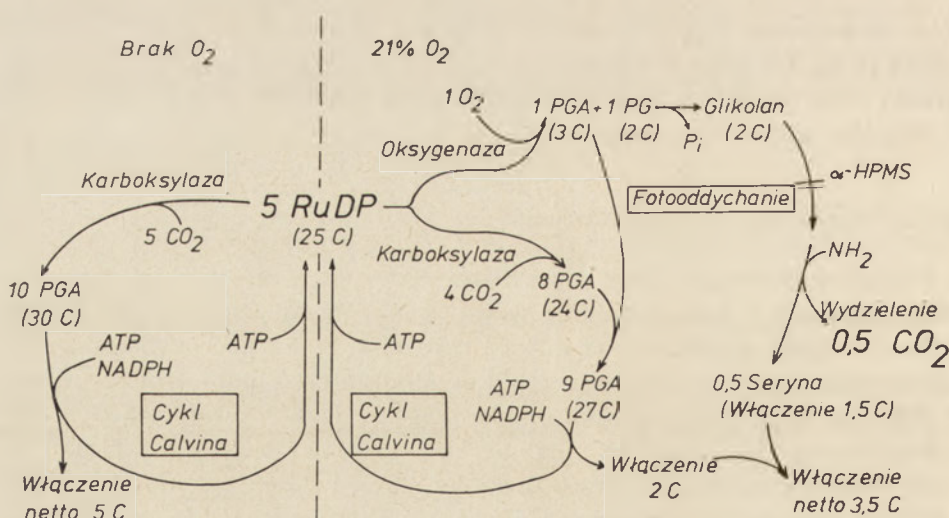
w chloroplastach przez O_2 nie znalazł również potwierdzenia doświadczalnego (236). Tlen w stężeniu 21% wprawdzie hamował fotosyntezę i stymulował tworzenie glikolanu w komórkach *Chlorella* w porównaniu z syntezą przy całkowitym jego braku, jednakże poziom RuDP był wyższy gdy fotosynteza przebiegała w obecności tlenu.

Druga hipoteza inhibicji fotosyntezy przez O_2 próbuje tłumaczyć to zjawisko współzawodniczeniem O_2 i CO_2 o centrum aktywne karboksylazy/oxygenazy RuDP (234, 255). Na podstawie obliczeń stałych inhibicji i powinowactwa przyjmuje się, że w roślinach typu C_3 bezpośrednia inhibicja przez O_2 wynosi 2/3 całkowitej inhibicji wywołanej O_2 , a pozostała 1/3 dotyczy wydzielania CO_2 w procesie fotooddychania (234). Dotychczasowe badania fizjologiczne i biochemiczne z zastosowaniem nienaruszonych liści, izolowanych chloroplastów i oczyszczonych preparatów karboksylazy/oxygenazy RuDP przedstawionych wyżej (rozdział IV-2b).

IV-3. Stechiometria fotosyntezy i fotooddychania

Powstawanie glikolanu w reakcji katalizowanej przez RuDP jest zdaniem Zelitcha (271) zbyt powolne w stosunku do szybkości fotooddychania w warunkach atmosferycznych. Zdawały się też wskazywać na to oznaczenia syntezy glikolanu w komórkach *Chlorella* (237), późniejsze przeliczenia wykazały jednak, że przekształcenia włączonego CO_2 poprzez P-glikolan są wystarczająco szybkie by umożliwić syntezę całej ilości glikolanu (234).

Ponieważ ilość węgla przekształconego poprzez glikolan odpowiada



Ryc. 22. Przybliżona stechiometria fotosyntezy i fotooddychania (234).

w przybliżeniu ilości netto CO₂ włączanego w procesie fotosyntezy, Z e - l i t c h (243) uważa, że aktywność enzymu lub ciągu reakcji biorącego udział w syntezie glikolanu powinna być równa szybkości karboksylacji. Pogląd ten pomija jednak fakt, że CO₂ włączony w reakcji karboksylacji RuDP służy zarówno do odtwarzania RuDP jak i włączania netto węgla. Jeśli przyjąć, że synteza glikolanu katalizowana przez oksygenazę RuDP jest równa szybkości włączania netto CO₂ wówczas na 4 cząsteczki włączonego CO₂ przypada włączanie 1 cząsteczki O₂. Badania z zastosowaniem preparatów karboksylazy/oksygenazy RuDP z liści soi i szpinaku wykazały (234, 254, 272, 273), że stosunek obu aktywności wynosi 4:1, a nawet 3:1 (273). Przyjmując za podstawę rozważań te prawidłowości postuluje się (234) stechiometrię fotosyntezy i fotooddychania przedstawioną na rycinie 22. W warunkach beztlenowych (lewa część schematu) w reakcji karboksylazy RuDP łączy się 5 cząsteczek CO₂ z 5 cząsteczkami RuDP i następuje włączanie netto 5 atomów węgla. W atmosferze 21% O₂ (prawa część schematu), przy stosunku aktywności karboksylazy/oksygenazy RuDP 4:1, na 4 cząsteczki włączonego CO₂, 2 atomy węgla pojawiają się w P-glikolanie, z którego w procesie fotooddychania uwalnia się 0,5 cząsteczki CO₂. Włączeniu ulega również 0,5 cząsteczki seryny tj. 1,5 atomu węgla. Z 4 cząsteczek CO₂ włączonego w reakcji karboksylazy RuDP, 2 atomy węgla służą do odtworzenia RuDP a 2 pozostałe zostają włączone, dając łącznie z atomami seryny włączenie netto 3,5 atomów węgla. Stąd fotosynteza netto w warunkach beztlenowych jest o 43% wyższa niż w warunkach tlenowych, co jest zgodne z wynikami badań fotooddychania wielu roślin typu C₃ (22, 233).

IV-4. Fotooddychanie roślin typu C₄ i glonów

Do niedawna sądzono, że w roślinach typu C₄ fotooddychanie nie występuje ponieważ, po pierwsze nie obserwuje się w świetle wydzielania CO₂ a w związku z tym stężenie kompensacyjne CO₂ jest bliskie 0, po drugie stężenie O₂ poniżej 21% nie zwiększa lub tylko w nieznacznym stopniu fotosyntezę netto. Te obserwacje mogły wskazywać na brak fotooddychania i związane z tym procesem hamowanie fotosyntezy przez O₂ (221, 222, 271—273).

Z badań ostatnich kilku lat wynika jednak, że i w roślinach typu C₄ występuje proces fotooddychania, gdyż egzogeny glikolan jest metabolizowany do CO₂ w tkance liścia lub izolowanych komórkach pochwy i przemiany te są wrażliwe na O₂ (270, 277), co wskazuje na udział w tym procesie peroksysomów, mitochondriów i enzymów szlaku glikolanu. Chociaż zawartość peroksysomów i aktywność enzymów tego szlaku zlokalizowanych w komórkach pochwy (120a, 278—280) są niższe niż u roślin

typu C_3 , to jednak istnieje potencjalna możliwość uwalniania CO_2 z glikolanu.

Pozorny brak fotooddychania w roślinach typu C_4 wiąże się z dwoma charakterystycznymi cechami fotosyntezy tej grupy roślin. Pierwszą z nich jest budowa wieńcowa liści, na którą składają się dwa rodzaje komórek — mezofilu i pochwy ułożonych kolistnie wokół wiązki (por. rozdział II-2 i Ryc. 7). Drugą, jest rozmieszczenie enzymów i określonych procesów w tych dwu typach komórek (por. rozdział II-3c i Ryc. 9). Wynikiem współzależności cech struktury i funkcji komórek fotosyntetyzujących, straty CO_2 w procesie fotooddychania są praktycznie niemożliwe. Postuluje się więc dwa mechanizmy tłumaczące to zjawisko. W pierwszym z nich, najbardziej rozpowszechnionym, zakłada się działanie „pompy CO_2 ” omówionej w rozdziale II-5b i przedstawionej schematycznie na rycinie 12A. Według tego mechanizmu w miejscu działania karboksylazy RuDP następuje zwiększenie stężenia CO_2 ponad stężenie tego związku, znajdującego się w równowadze z atmosferą liścia. Znalazło to potwierdzenie w oznaczeniach wewnętrznej puli CO_2 pochodzącego z włączonego uprzednio węgla przez liście roślin typu C_4 (7, 281, 282) co mogło sugerować, że warstwa komórek pochwy jest nieprzepuszczalna dla CO_2 (283, 284). Podobne zjawisko występuje w roślinach gruboszowatych, u których dekarboksylacja nagromadzonych kwasów organicznych powoduje zwiększenie stężenia CO_2 powyżej stężenia tego gazu w atmosferze. W tkankach roślin typu C_3 nie obserwuje się natomiast równowagi stężenia CO_2 w miejscu działania karboksylazy RuDP i zewnętrznej atmosfery (285).

Mechanizm „pompy CO_2 ”, powodując zwiększenie stosunku CO_2/O_2 w komórkach pochwy, zwiększa tym samym aktywność karboksylazy RuDP a ogranicza udział O_2 w reakcji katalizowanej przez oksygenazę RuDP i powstawanie tą drogą glikolanu jako substratu fotooddychania. Doświadczenia z $^{18}O_2$ wykazały, że jego wykorzystanie w roślinach typu C_4 jest wolniejsze niż w roślinach typu C_3 (286, 287), co jest prawdopodobnie wynikiem mniejszej szybkości tworzenia glikolanu i jego utleniania do CO_2 .

Według drugiego mechanizmu, przedstawionego na rycinie 12B i omówionego w rozdziale II-5b, fotooddychanie przebiega głównie w komórkach pochwy a wydzielony CO_2 jest ponownie wiązany w cytoplazmie komórek mezofilu, tworząc w ten sposób mechanizm „wychwytywania CO_2 ”.

Działanie obu mechanizmów jest ściśle związane z budową wieńcową liścia. Jest to adaptacja prowadząca nie tylko do zwiększania stężenia CO_2 w tkance ale także do skutecznego, ponownego włączania CO_2 . Prowadzi to do obniżenia fotooddychania i zwiększenia fotosyntezy netto. Tych powszechnie przyjętych prawidłowości nie potwierdziły jednak doświadczenia (288), w których dodany do tkanki liścia $^{14}CO_2$ nie był włączany szybciej w roślinach typu C_4 (kukurydzy) niż w roślinach nie zawierających chloroplastów komórki pochwy.

Głony, np. *Chlorella*, *Euglena gracilis*, cechuje również brak fotooddychania oraz bliski 0 punkt kompensacyjny CO₂ (289, 290), mimo, że są to organizmy typu C₃, syntetyzujące znaczne ilości glikolanu i metabolizujące go (291, 293). Niewykrywanie fotooddychania w glonach tłumaczono usuwaniem glikolanu do środowiska, co zmniejszało jego ilość jako substratu fotooddychania (293, 294). Przypuszcza się (293), że wydzielanie glikolanu do środowiska było spowodowane represją dehydrogenazy glikolanowej, gdy komórki rosły przy wysokim stężeniu CO₂, a więc w warunkach niekorzystnych dla syntezy glikolanu. Okazało się jednak (294), że aktywność dehydrogenazy glikolanowej glonu *Chlorella*, rosnącego w środowisku o zawartości 50% CO₂ jest taka sama jak w rosnącym w warunkach normalnych (0,03% CO₂), natomiast szybkość wydzielania glikolanu w czasie fotosyntezy była znacznie większa w pierwszym przypadku.

Według innych poglądów niewydzielanie CO₂ przez pewne glony jest wynikiem skutecznego działania mechanizmu ponownego włączania CO₂ (24) oraz ograniczeniem szybkości reakcji katalizowanej przez hydroksymetylotransferazę seryny (291) (por. Ryc. 20, reakcja 9), w wyniku której powstaje główna część uwalnianego CO₂ w procesie fotooddychania.

IV-5. Rola fizjologiczna

Rola fotooddychania w metabolizmie roślin jest ciągle nie wyjaśniona. Ponieważ procesowi temu nie można, jak dotąd, przypisać użytecznej funkcji, uważa się go więc często za proces, któremu towarzyszy strata energii i który powoduje obniżanie wydajności fotosyntezy netto (292). W próbach wyjaśnienia roli i przyczyn istnienia fotooddychania w roślinach rozpatruje się kilka możliwości. Goldsworthy (295) uważa, że tworzenie glikolanu jest pozostałością pierwotnych mechanizmów metabolicznych. Natomiast Lorimer i Andrews (260) postulują, że fotooddychanie jest nieuniknioną konsekwencją występowania O₂ w atmosferze, który w reakcji katalizowanej przez oksygenazę RuDP tworzy P-glikolan. W obu hipotezach fotooddychanie rozpatrywano jako proces usuwania niepotrzebnych, ubocznych produktów fotosyntezy — P-glikolanu i glikolanu. Jeśli tak jest rzeczywiście, to mechanizmy usuwania zasymilowanego węgla są zróżnicowane. Głony usuwają znaczną (2—12%) część wytworzonego glikolanu do środowiska (27, 296), w roślinach lądowych typu C₃ wytworzony glikolan ulega utlenieniu i dekarboksylacji (por. Ryc. 20), natomiast w roślinach typu C₄ nie obserwuje się strat węgla spowodowanych fotooddychaniem i tym można tłumaczyć prawie dwukrotnie wyższą wydajność fotosyntezy netto niż w roślinach typu C₃ (292). Podobny mechanizm wydajnego wykorzystania włączanego CO₂ występuje w roślinach gruboszowatych (por. rozdział II-4).

Bardziej użyteczną rolę przypisują fotooddychaniu Osmo i Björkman (297). Sugerują oni, że fotooddychanie jest mechaniz-

mem, który zabezpiecza centra fotochemiczne aparatu fotosyntezy przed naruszeniem ich przez światło w okresach niedoboru wody i intensywnego oświetlenia. Według tej hipotezy liście mogłyby syntetyzować glikolan i włączać ponownie uwolniony w procesie fotooddychania CO_2 , gdy aparaty szparkowe są zamknięte, rozpraszając w ten sposób energię fotochemiczną i zabezpieczając aparat fotosyntezy przed uszkodzeniem.

Wreszcie, tylko Tolbert i Ryan (273) uważają fotooddychanie za proces korzystny dla roślin, gdyż wpływa na ustalenie stężenia kompensacyjnego CO_2 w atmosferze. Zabezpiecza w ten sposób przed całkowitym usunięciem CO_2 z atmosfery ziemskiej, dla której płaszcz CO_2 jest niezbędny. Jeśli tak jest rzeczywiście, to znów tylko rośliny typu C_3 umożliwiałyby utrzymanie tej równowagi.

Autor jest wdzięczny Panu Prof. P. Małowskiemu, Organizatorowi XIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Toruniu, oraz tym wszystkim uczestnikom tego Zjazdu, którzy swoim zainteresowaniem i zachętą przyczynili się do przygotowania niniejszego artykułu.

Jednocześnie pragnie podziękować Dr J. A. Basshamowi, C. C. Blackowi, jr., U. Heberowi, W. M. Laetchowi, D. A. Walkerowi i I. Zelitchowi za przesłanie mu odbitek ich artykułów przeglądowych omawiających przedstawione tu zagadnienia oraz autorom zdjęć za pozwolenie ich zamieszczenia.

Artykuł nadszedł 20.3.1976.

PIŚMIENICTWO

1. Hatch M. D., Slack C. R., (1970), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 141—162.
2. Walker D. A., Crofts A. R., (1970), *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 389—428.
3. Preiss J., Kosuge T., (1970), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 433—466.
4. Hatch M. D., Osmond C. B., Slayter R. O., red., (1971) *Photosynthesis and Photorespiration*, Wiley-Interscience, New York.
5. Zelitch I., (1971), *Photosynthesis, Photorespiration and Plant Productivity*, Academic Press, New York.
6. Gibbs M., (1971), w *Structure and Function of Chloroplasts*, red. M. Gibbs, str. 169—214, Springer-Verlag, New York.
7. Black C. C. Jr., (1973), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**, 253—286.
8. Björkman O., (1973), *Photophysiology*, **8**, 1—63.
9. Zelitch I., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 123—145.
10. Heber U., (1974), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**, 393—421.
11. Walker D. W., (1974), w *Plant Biochemistry*, red. D. H. Northcote, t. 11, str. 1—49, Seria I, Med. Tech. Publ. Int. Rev. Sci., Butterworths, London.
12. Ting I. P., (1971), w *Photosynthesis and Photorespiration*, red. Hatch M. D., Osmond C. B., Slayter R. O., str. 169—185, Wiley-Interscience, New York.
13. Hatch M. D., (1971), w *Photosynthesis and Photorespiration*, red. Hatch M. D., Osmond C. B., Slayter R. O., str. 139—152, Wiley-Interscience, New York.
14. Laetch W. M., (1969), *Sci. Progr. Oxford*, **57**, 323—351.
15. Laetch W. M., (1971), w *Photosynthesis and Photorespiration*, red. Hatch M. D., Osmond C. B., Slayter R. O., str. 323—349, Wiley-Interscience, New York.
16. Laetch W. M., (1974), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**, 27—52.

17. Black C. C. Jr., (1971), *Adv. Ecol. Res.*, **7**, 87—113.
18. Bassham J. A., (1972), w *Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis Research*, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 2, str. 1723—1735, W. Jung, The Hague.
19. Bassham J. A., (1971), *Science*, **172**, 526—534.
20. Bassham J. A., (1973), *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **27**, 461—483.
21. Kawashima N., Wildman S. G., (1970), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 325—358.
22. Buchanan B. B., Schürmann P., (1973), w *Current Topics of Cellular Regulation*, red. Horecker B. L., Stadman E. R., t. 7, 1—20.
23. Walker D. W., (1973), *New Phytologist*, **72**, 709—735.
24. Goldsworthy A., (1970), *Bot. Rev.*, **36**, 321—340.
25. Jackson W. A., Volk R. J., (1970), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 385—432.
26. Chollet R., Ogren W. L., (1975), *Bot. Rev.*, **41**, 137—179.
27. Tolbert N. E., (1973), w *Current Topics of Cellular Regulation*, red. Horecker B. L., Stadman E. R., t. 7, str. 21—50.
28. Maleszewski S., (1974), *Post. Biochem*, **20**, 379—402.
29. Walker D. A., (1964), *Biochem. J.*, **92**, 22C—23C.
30. Jensen R. G., Bassham J. A., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **56**, 1095—1101.
31. Walker D. A., (1971), w *Methods in Enzymology*, red. San Pietro A., t. 23, 211—220, Academic Press, New York-London.
- 31a. Stocking C. R., (1971), w *Methods in Enzymology*, red. San Pietro A., t. 23, 221—228, Academic Press, New York-London.
32. Hall D. O., Reeves S. G. Baltscheffsky H., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 359—366.
33. Reeves S. G., Hall D. O., West J., (1972), w *Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis Research*, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 2, 1357—1369. W. Jung, The Hague.
34. Bucke C., Walker D. A., Baldry C. W., (1966), *Biochem. J.*, **101**, 636—641.
35. Walker D. A., (1967), w *Biochemistry of Chloroplasts*, red. Goodwin T. W., t. 2, 53—69, Academic Press, New York.
36. Walker D. A., (1965), *Plant Physiol.*, **40**, 1157—1161.
37. Hall D. O., (1972), *Nature, New Biology* **235**, 125—126.
38. Lilley R. McC., Fitzgerald M. P., Rienits K. G., Walker D. A., (1975), *New Phytologist*, **75**, 1—10.
39. Heber U., Santarius K. A., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **109**, 390—408.
40. Heber U., Santarius K. A., Hudson M. A., Hallier V. W., (1967), *Z. Naturforsch.*, **226**, 1189—1199.
41. Heber U., Santarius K. A., (1970), *Z. Naturforsch.*, **256**, 718—728.
42. Heber U., Willenbrink J., (1964), *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 313—324.
43. Stocking C. R., Williams G. R., Ongun A., (1963), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **10**, 416—421.
44. Nobel P. S., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 134—143.
45. Bassham J. A., Kirk M., Jensen R. G., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 211—218.
46. Heldt H. W., (1969), *FEBS Letters*, **5**, 11—14.
47. Bamberger E. S., Gibbs M., (1965), *Plant Physiol.*, **40**, 919—926.
48. Heldt H. W., Sauer F., (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **234**, 83—92.

49. Walker D. A., Cockburn W., Baldry C. W., (1967), *Nature*, **216**, 597—599.
50. Colburn W., Walker D. A., Baldry C. W., (1968), *Biochem. J.*, **107**, 89—95.
51. Werdan K., Heldt H. W., (1972), w Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis Research, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 2, 1337—1344, W. Jung, The Hague.
52. Poincelot R. P., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 336—340.
53. West K. R., Wiskich J. T., (1968), *Biochem. J.*, **109**, 527—532.
54. Stocking C. R., Larson S., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 278—282.
55. Heldt H. W., Rapley L., (1970), *FEBS Letters*, **10**, 143—148.
56. Krause G. H., (1971), *Z. Pflanzenphysiol.*, **65**, 13—23.
57. Heber U., Krause G. H., (1972), w Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis Research, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 2, 1023—1033 W. Jung, The Hague.
58. Heber U., Krause G. H., (1971), w Photosynthesis and Photorespiration, red. Hatch M. D., Osmond C. B., Slayter R. O., str. 218—225, Wiley-Interscience, New York.
59. Cockburn W., Baldry C. W., Walker D. A., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **143**, 614—624.
60. Mathieu Y., (1967), *Photosynthetica*, **1**, 57—63.
61. Heber U., Hallier U., Hudson M. A., (1967), *Z. Naturforsch.*, **22b**, 1200—1215.
62. Cockburn W., Baldry C. W., Walker D. A., (1967, *Biochim. Biophys. Acta*, **131**, 594—596.
63. Walker D. A., Hill R., (1967), *Biochim. Biophys. Acta* **131**, 330—338.
64. Baldry C. W., Bucke C., Walker D. A., (1966), *Nature*, **210**, 793—796.
65. Heldt H. W., Sauer F., Rapley L., (1972), w Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis Research, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 2, str. 1345—1355. W. Jung, The Hague.
- 65a. Werdan K., Heldt H. W., Milovancev M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta* **396**, 276—292.
66. Werdan K., Heldt H. W., (1972), w Mechanism in Bioenergetics, red. Azzone G. W., Ernster L., Papa S., Quagliariello E., Siliprandi N., str. 285—299, Academic Press, New York, London.
67. Lin D. C., Nobel P. S., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 622—631.
68. Sugiyama T., Nakayama N., Akazawa T., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 737—744.
69. Bassham J. A., Sharp P., Morris I., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 898—900.
70. Jensen R. G., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **234**, 371—380.
71. Stokes D. M., Walker D. A., McCormick A. V., (1971), *Nature*, **233**, 346—347.
72. Walker D. A., (1972), w Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis Research, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 2, str. 1773—1778.
73. Jensen R. G., Bassham J. A., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 227—234.
74. Chu D. K., Bassham J. A., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 224—227.
75. Walker D. A., Kosciukiewicz K., Case C., (1973), *New Phytologist*, **72**, 237—247.

76. Schwenn J. D., Lilley R. M., Walker D. A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **325**, 586—595.
77. Kelley G. J., Gibbs M., (1973), *Plant Physiol.*, **52**, 674—676.
78. Poincelot R. P., (1974), *Plant Physiol.*, **54**, 520—526.
79. Poincelot R. P., (1975), *Plant Physiol.*, **55**, 849—852.
80. Werdan K., Heldt H. W., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **283**, 430—441.
81. El-Sharkawy M., Hesketh J. O., (1965), *Crop. Sci.*, **5**, 417—421.
82. Downton W., Tregunna E., (1968), *Can J. Bot.*, **46**, 207—215.
83. Hatch M. D., Slack C. R., Johnson H., (1967), *Biochem. J.*, **102**, 417—422.
84. Johnson H. S., Hatch M. D., (1968), *Phytochemistry*, **7**, 375—380.
85. Laetsch W. M., (1968), *Am. J. Bot.*, **55**, 875—883.
86. Downes R. W., Hesketh J. D., (1968), *Planta*, **78**, 79—84.
87. Andersen K. S., Bain J. M., Bishop D. G., Smillie R., (1972), *Plant Physiol.*, **49**, 461—466.
88. Laetsch W. M., Price I., (1969), *Plant Physiol.*, **56**, 77—87.
89. Downton W., Berry J., Tregunna E., (1970), *Z. Pflanzenphysiol.*, **63**, 194—198.
90. Downton W., Pylotis N., (1971), *Can J. Bot.*, **49**, 179—182.
91. Karpilow Y. S., (1960), *Kazakhstan Agr. Inst.*, **4**, 21—32; *Trans. Kazakhstan Sci. Chem. Inst.*, **41**, 15—24.
- 91a. Tarczewski I. A., Karpilow Y. S., (1963), *Fizjol. Rast.*, **10**, 229—231.
92. Kortschak H. P., Hartt C. E., Burr G. O., (1965), *Plant Physiol.*, **40**, 209—213.
93. Hatch M. D., Slack C. R., (1966), *Biochem. J.*, **101**, 103—111.
94. Anderson J. M., Woo K. C., Boardman N. K., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **245**, 398—408.
95. Arntzen C. J., Dilley R. A., Neumann J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **245**, 267—269.
96. Polya G. M., Osmond C. B., (1972), *Plant Physiol.*, **49**, 267—269.
97. Mayene B. C., Edwards G. E., Black C. C., (1971), *Plant Physiol.*, **47**, 600—605.
98. Smillie R. M., Anderson K. S., Tobin N. F., Entsch B., Bishop D. G., (1972), *Plant Physiol.*, **49**, 471—475.
99. Edwards G. E., Black C. C., (1971), w *Photosynthesis and Photorespiration*, red. Hatch M. D., Osmond C. B., Slayter R. O., str. 153—168, Wiley-Interscience, New York.
100. Walker D. A., (1962), *Biol. Rev.*, **37**, 215—256.
101. Slack C. R., Hatch M. D., (1967), *Biochem J.*, **103**, 660—665.
102. Filmer D. L., Cooper T. G., (1970), *J. Theor. Biol.*, **29**, 131—145.
103. Waygood E. R., Maché R., Tan C. K., (1969), *Can J. Bot.*, **47**, 1455—1458.
104. Lowe J., Slack C. R., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **235**, 207—209.
105. Coombs I. P., Baldry C. W., (1972), *Nature*, **238**, 268—270.
106. Ting I. P., Osmond C. B., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 439—447.
107. Ting I. P., Osmond C. B., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 448—453.
108. Johnson H. S., Hatch M. D., (1970), *Biochem. J.*, **119**, 273—280.
109. Baldry C. W., Coombs J., Gross D., (1968), *Z. Pflanzenphysiol.*, **60**, 78—81.
110. Slack C. R., (1969), *Phytochemistry*, **8**, 1387—1391.
111. Slack C. R., Hatch M. D., Goodchild D. J., (1969), *Biochem. J.*, **114**, 489—500.

112. Björkman O., Gauhl E., (1969), *Planta*, **88**, 197—203.
113. Baldry C. W., Bucke C., Coombs J., (1971), *Planta*, **97**, 310—319.
114. Berry J. A., Downton W. J., Tregunna E. B., (1970), *Can. J. Bot.*, **48**, 777—786.
115. Bucke C., Long S. P., (1971), *Planta*, **99**, 199—210.
116. Huang A. H. C., Beevers H., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 242—248.
117. Osmond C. B., Harris B., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **234**, 270—282.
118. Poincelot R. P., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 336—340.
119. Edwards G. E., Lee S. S., Chen T. M., Black C. C., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 389—395.
120. Edwards G. E., Black C. C., (1971), *Plant Physiol.*, **47**, 149—165.
- 120a. Liu A. Y., Black C. C., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **149**, 269—280.
121. Edwards G. E., Gutierrez M., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 728—732.
122. Kanai R., Edwards G. E., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 1133—1137.
- 122a. Gutierrez M., Huber S. C., Ku S. B., Kanai R., Edwards G. E., (1971), w Proceeding of the IInd International Congress on Photosynthesis Research, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 2, str. 1219—1230, W. Jung, The Hague.
123. Hatch M. D., Kagawa T., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 842—853.
124. Chen T. M., Brown R. H., Black C. C., (1971), *Plant Physiol.*, **47**, 199—203.
125. Andrews T. J., Johnson H. S., Slack C. R., Hatch M. D., (1971), *Phytochemistry*, **10**, 2005—2013.
126. Downton W. J. S., (1970), *Can. J. Bot.*, **48**, 1795—1880.
127. Downton W. J. S., (1971), *Can. J. Bot.*, **49**, 1439—1442.
- 127a. Rathnam C. K. M., Edwards G. E., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**, 214—225.
128. Usuda H., Kanai R., Takeuchi M., (1971), *Plant Cell Physiol.*, **12**, 117—130.
129. Laetsch W. M., Kortschak H. P., (1972), *Plant Physiol.*, **49**, 1021—1023.
130. Kennedy R., Laetsch W. M., (1974), *Science*, **184**, 1087—1089.
131. Khanna R., Sinha S. K., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 121—124.
132. Laetsch W. M., (1968), *Am. J. Bot.*, **55**, 875—883.
133. Brandon B. C., (1967), *Plant Physiol.*, **42**, 977—984.
134. Bardbeer J. W., Ranson S. L., Stiller M., (1958), *Plant Physiol.*, **33**, 66—70.
135. Black C. C., Edwards G. E., Kani R., Mollenhauser H. H., (1972), w Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis Research, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 3, str. 1745—1757, W. Jung, The Hague.
136. Rouhani I., Vines H. M., Black C. C., (1973), *Plant Physiol.*, **57**, 97—103.
137. Sutton B. G., Osmond C. B., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 360—365.
138. Levi C., Gibbs M., (1972), *Plant Physiol.*, Suppl., **49**, 59.
139. Kluge M., Osmond C. B., (1971), *Naturwissenschaften*, **85**, 414—415.
140. Avadhani P. W., Osmond C. B., Tan K. K., (1971), w Photosynthesis and Photorespiration, red. Hatch M. D., Osmond C. B., Slayter R. O., str. 288—293, Wiley-Interscience, New York.
141. Kluge M., (1971), w Photosynthesis and Photorespiration, red. Hatch M. D., Osmond C. B., Slayter R. O., str. 283—287, Wiley-Interscience, New York.

142. Whelan T., Sackett W. M., Benedict C. R., (1972), *Assoc. Southeast Biol. Bull.*, **19**, 109. (cyt. wg 7).
- 142a. Bender M. M., Rauchani I., Vines H. M., Black C. C., (1973), *Plant Physiol.*, **52**, 427—430.
143. Downes R. W., (1969), *Planta*, **88**, 26—73.
144. Slayter R. O., (1970), *Planta*, **93**, 175—189.
145. Winter K., (1973), *Planta*, **109**, 135—145.
146. Campbell L. C., Pitman M. G., (1971), w *Salinity and Water Use*, red. Talamán T., Philip J. R., str. 207—224, McMillan, London.
147. Nagy A. H., Passery M., Faludi-Dangiel A., (1971), *Plant Physiol.*, **47**, 301—305.
148. Gibbs M., Latzko E., O'Neal D., Hew C. S., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1356—1361.
149. O'Neal D., Hew C., Latzko E., Gibbs M., (1972), *Plant Physiol.*, **49**, 607—614.
150. Lyttleton J., (1971), w *Photosynthesis and Photorespiration*, red. Hatch M. D., Osmond C. B., Slayter R. O., str. 232—239, Wiley-Interscience, New York.
151. Johnson E. J., (1966), *Arch. Biochem. Biophys.*, **114**, 178—183.
152. Gale N. L., Beck J. V., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 792—796.
153. McFadden B. A., Tu C. C. L., (1967), *J. Bacteriol.*, **93**, 886—893.
154. Mayeux J. V., Johnson E. J., (1967), *J. Bacteriol.*, **94**, 409—414.
155. MacElroy R. D., Johnson E. J., Johnson M. K., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 678—682.
156. MacElroy R. D., Johnson E. J., Johnson M. K., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 272—275.
- 156a. Krause G. M., Bassham J. A., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 553—565.
157. Latzko E., Gibbs M., (1968), *Z. Pflanzenphysiol.*, **59**, 184—194.
158. Latzko E., Gibbs M., (1969), w *Progress in Photosynthesis Research*, red. Metzner H., str. 1824—1830, H. Laupp, Tubingen.
159. Latzko E., Garnier R. V., Gibbs M., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 1140—1144.
160. Avron M., Gibbs M., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 136—139.
161. Champigny M. L., Bismuth E., Lovergne D., (1975), w *Proceedings 3rd International Congress Photosynthesis*, red. Avron M., t. 2. Bioenergetics and Carbon Metabolism, str. 1441—1448, Elsevier, Amsterdam.
162. Heber U., Pon N. G., Heber M., (1963), *Plant Physiol.*, **38**, 335—360.
163. Latzko E., Gibbs M., (1968), *Z. Pflanzenphysiol.*, **59**, 184—194.
164. Smillie R. M., Fuller R. C., (1960), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 368—372.
165. Schulman M. D., Gibbs M., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 1805—1812.
166. Hudock G. A., Fuller R. C., (1965), *Plant Physiol.*, **40**, 1205—1211.
167. Melandri B. A., Baccarini A., Pupillo P., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 160—164.
168. McGowan R. E., Gibbs M., (1974), *Plant Physiol.*, **54**, 312—319.
169. Braverman G., Konigsberg N., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, **43**, 374—381.
170. Fuller R. C., Hudock G. A., (1967), w *Biochemistry of Chloroplasts*, red. Goodwin T. W., t. 2, str. 181—190, Academic Press, New York.
171. Margulies M. M., (1964), *Plant Physiol.*, **39**, 579—585.
172. Ziegler H., Ziegler I., (1965), *Planta*, **65**, 369—380,

173. Ziegler H., Ziegler I., Beth K., (1967), *Planta* **72**, 247—251.
174. Muller B., Ziegler H., (1969), *Planta*, **85**, 96—104.
175. Ziegler H., Ziegler I., Schmidt-Clausen H. J., (1968), *Planta*, **81**, 181—192.
176. Muller B., Ziegler I., Ziegler H., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **9**, 101—106.
177. Pupillo B., (1972), *Phytochemistry*, **11**, 153—161.
178. Muller B., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **205**, 102—109.
179. Pederson T. A., Kirk M., Bassham J. A., (1966), *Physiol., Plant* **19**, 219—231.
180. Pederson T. A., Kirk M., Bassham J. A., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **112**, 189—203.
181. Smillie R. M., (1960), *Nature*, **187**, 1024—1025.
- 182a. Smillie R. M., (1964), *Can. J. Bot.*, **41**, 123—134.
182. Preiss J., Biggs M. L., Greenberg E., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 2292—2293.
183. Buchanan B. B., Schurmann P., Kalberer P. P., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5952—5964.
184. Buchanan B. B., Kalberer P. P., Arnon D. I., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 74—
185. Bassham J. A., Kirk M., (1968), w *Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis*, red. Shibata K., Takamiya A., Jagendorf A. T., Fuller R. C., str. 365—378, University of Tokyo Press.
186. Anderson L. E., Ng T.C.L., Park K. E., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 835—849.
187. Lendzian K., Ziegler H., (1970), *Planta*, **94**, 27—36.
188. Lendzian Z., Ziegler H., (1972), w *Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis Research*, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 3, str. 1831—1838, W. Jung, The Hague.
189. Anderson L. E., (1974), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 907—913.
190. Chu D. K., Bassham J. A., (1973), *Plant Physiol.*, **52**, 373—379.
191. Avron M., Gibbs M., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 140—143.
192. Lendzian K., Bassham J. A., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **396**, 260—275.
193. Pelroy R. A., Rippka R., Stanier R. V., (1972), *Arch. Microbiol.*, **87**, 303—322.
- 193a. Chu D. K., Bassham J. A., (1974), *Plant Physiol.*, **54**, 556—559.
194. Weissbach A., Horecker B. L., Hurwitz J., (1956), *J. Biol. Chem.*, **218**, 795—810.
195. Jakoby W. B., Brummond D. O., Ochoa S., (1956), *J. Biol. Chem.*, **218**, 811—822.
196. Racker E., (1957), *Arch. Biochem. Biophys.*, **69**, 390—310.
197. Bowes G., Ogren W. L., Hageman R. H., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 716—722.
198. Andrews T. J., Lorimer G. H., Tolbert N. E., (1973), *Biochemistry* **12**, 11—17.
199. Lorimer G. H., Andrews T. J., Tolbert N. E., (1973), *Biochemistry* **12**, 18—23.
200. Wildman S. G., Bonner J., (1947), *Arch. Biochem.*, **14**, 381—392.
201. Quayle J. R., Fuller R. C., Benson A. A., Calvin M., (1954), *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3610.

202. Weissbach A., Smyrniolis R. Z., Horecker B. L., (1954), *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3611
203. Siegel M. I., Wishnick M., Lane M. D., (1972), w *The Enzymes*, red. Boyer P. D., t. 6, str. 169—192, Academic Press, New York.
204. Paulsen J. M., Lane M. D., (1966), *Biochemistry*, **5**, 2350—2357.
205. Kieras F. J., Haselkorn R., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 1264—1270.
206. Cooper T. G., Filmer D., Wishnick M., Lane M. D., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1081—1083.
207. Jensen R. G., (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **234**, 360—370.
208. Jensen R. G., Bahr J. T., (1972), w *Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis Research*, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 3, 1787—1794 W. Jung, The Hague.
209. Buchanan B. B., Schürmann P., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4956—4964.
210. Lilley R. McC., Holborow K., Walker D. A., (1973), *New Phytologist*, **72**, 657—662.
211. Lilley R. McC., Walker D. A., (1975), *Plant Physiol.*, **55**, 1087—1092.
212. Bahr J. T., Jensen R. G., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 39—44.
213. Schürmann P., Buchanan B. B., Arnon D. I., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **267**, 111—124.
214. Buchanan B. B., Schürmann P., (1972), *FEBS Letters*, **23**, 157—159.
215. Chu D. K., Bassham J. A., (1975), *Plant Physiol.*, **55**, 720—726.
216. Bassham J. A., Krause G. H., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 207—221.
217. Kanazawa T., Kirk M. R., Bassham J. A., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **205**, 401—408.
218. Warburg O., (1920), *Biochem. Z.*, **103**, 188—217.
219. Decker J. R., (1955), *Plant Physiol.*, **30**, 82—84.
220. Decker J. P., (1959), *Plant Physiol.*, **34**, 100—102 i 103—106.
- 220a. Decker J. P., Tió M. A., (1959), *J. Agr. Univ. P. R.*, **43**, 50—55.
- 220b. Tolbert N. E., (1971), w *Photosynthesis and Photorespiration*, red. Hatch M. D., Osmond C. B., Slayter R. O., str. 458—471, Wiley-Interscience, New York.
221. Downes R. W., Hesketh J. D., (1968), *Planta*, **78**, 79—84.
222. Forrester M. L., Krotkov G., Nelson C. D., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 428—431.
223. Poskuta J., (1969), *Physiol. Plantarum*, **22**, 76—85.
224. Chollet R., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 850—856.
225. Stamieszkin I., Maleszewski S., Poskuta J., (1972), *Z. Pflanzenphysiol.*, **67**, 180—182.
226. Lewanty Z., Maleszewski S., Poskuta J., (1971), *Z. Pflanzenphysiol.*, **65**, 469—472.
227. Calvin D. T., Fock H., (1972), *Methods in Enzymology*, **24**, 246—260.
228. Raven J. A., (1972), *New Phytologist*, **71**, 995—1014.
229. Manganat D. S., Levin W. B., Bidwell R. G. S., (1974), *Canad. J. Bot.*, **53**, 411—415.
230. Raven J. A., (1972), *New Phytologist*, **71**, 227—247.
231. Ludwig L. J., Calvin D. T., (1971), *Plant Physiol.*, **48**, 712—719.
232. Samish A. B., Palla J. E. Jr., Dornhoff G. M., Shilles R. M., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 28—30.
233. Ludwig L. J., Calvin D. T., (1971), *Can. J. Bot.*, **49**, 1299—1313.
234. Laing W. A., Ogren W. L., Hageman R. H., (1974), *Plant Physiol.*, **54**, 678—685.

235. Warburg O., Krippahl G., (1960), *Z. Naturforsch.*, **15b**, 197—199.
236. Bassham J. A., Kirk M., (1962), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **9**, 376—380.
237. Bassham J. A., Kirk M., (1973), *Plant Physiol.*, **52**, 407—411.
238. Zelitch I., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 367—377.
239. Zelitch I., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 1632—1638.
- 239a. Zelitch I., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 109—113.
240. Goldsworthy A., (1966), *Phytochemistry*, **5**, 1013—1019.
241. Eickenbusch J. D., Beck E., (1973), *FÉBS Letters*, **31**, 225—228.
242. Robinson J. M., Gibbs M., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 790—797.
243. Zelitch I., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 579—584.
244. Plaut Z., Gibbs M., (1970), *Plant Physiol.*, **45**, 470—474.
245. Shain Y., Gibbs M., (1971), *Plant Physiol.*, **48**, 325—330.
246. Coombs J., Whittingham C. P., (1966), *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B.*, **164**, 511—520.
247. Bowes G., Berry J. A., (1972), *Carnegie Inst. Washington, Year Book*, **71**, 148—158.
248. Heath O. V. S., Meidner H., Spanner D. C., (1967), *J. Exp. Bot.*, **18**, 746—751.
249. Heber U., French C. S., (1968), *Planta*, **79**, 99—112.
250. Forrester M. L., Krotkov G., Nelson C. D., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 422—427.
251. McFadden B. A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 312—317.
252. Takabe T., Akazawa T., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1173—1179.
253. Richardson J. M., Tolbert N. E., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 1285—1290.
254. Badger M. R., Andrews T. J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 204—210.
255. Bowes G., Ogren W. L., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2171—2176.
256. Nishimura M., Akazawa T., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2277—2281.
257. Rayan F. J., Tolbert N. E., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4229—4233.
258. Ryan F. J., Tolbert N. E., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4234—4238.
259. Ryan F. J., Jolly S. O., Tolbert N. E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 1233—1241.
260. Lorimer G. H., Andrews T. J., (1973), *Nature*, **243**, 359—360.
261. Snyder F. W., Tolbert N. E., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 514—515.
262. Grishina G. S., Maleszewski S., Frankiewicz A., Voskresenskaja N. P., Poskuta J., (1974), *Z. Pflanzenphysiol.*, **73**, 189—197.
263. Voskresenskaja N. P., (1972), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **23**, 219—234.
264. Tolbert N. E., (1971), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **22**, 45—74.
265. Tolbert N. E., (1973), *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **27**, 215—239.
266. Frederick S. E., Newcomb E. H., (1969), *Science*, **163**, 1353—1355.
267. Elstner E. P., Heupel A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **325**, 182—188.
268. Zelitch I., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 698—707.
269. Hallwell B., Butt V. S., (1974), *Biochem. J.*, **138**, 217—224.
270. Kisaki T., Yano N., Hirabayashi S., (1972), *Plant Cell Physiol.*, **13**, 581—584.
271. Zelitch I., (1973), *Curr. Adv. Plant Sci.*, **3**, 44—54.
272. Bahr J. T., Jensen R. G., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 408—413.
273. Tolbert N. E., Ryan F. J., (1975), *Proc. 3rd Intern. Congress of Photosynthesis*, red. M. Avron, t. 2, str. 1303—1320 Elsevier, Amsterdam.
274. Chen T. M., Brown R. H., Back C. C., (1970), *Weed Sci.*, **18**, 399—403.

275. Moss D. N., Willmer C. M., Crookston R. K., (1971), *Plant Physiol.*, **47**, 847—848.
276. Troughton J. H., (1971), *Planta* **100**, 87—92.
277. Heichel G. M., (1972), *Plant Physiol.*, **49**, 490—496.
278. Chen T. M., Dittrich P., Campbell W. H., Black C. C., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 246—262.
279. Frederick S. E., Newcomb E. H., (1971), *Planta* **96**, 152—174.
280. Osmond C. B., Harris B., (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **234**, 270—282.
281. Hatch M. P., (1971), *Biochem. J.*, **125**, 842—853.
282. Wynn T., Brown H., Campbell W. H., Black C. C., (1973), *Plant Physiol.*, **52**, 288—291.
283. Troughton J. H., (1972), Proc. 8th International Conference on Radiocarbon Dating, **2**, 420—437.
284. Whelan T., Sackett W. M., Benedict C. R., (1973), *Plant Physiol.*, **51**, 1051—1054.
285. Björkman O., (1973), *Photophysiology* **8**, 1—63.
286. Volk R. J., Jackson W. A., (1972), *Plant Physiol.*, **49**, 218—223.
287. Mulchi C. L., Volk R. J., Jackson W. A., (1971), w Photosynthesis and Photorespiration, red. Hatch M. D., Osmond C. B., Slayter R. O., str. 35—50, Wiley-Interscience, New York.
288. Goldsworthy A., Day P. R., (1970), *Nature* **228**, 687—688.
289. Brown D. L., Treguna E. B., (1967), *Canad. J. Bot.*, **45**, 1135—1143.
290. Cheng K. H., Colman B., (1974), *Planta* **115**, 207—212.
291. Bruin W. J., Nelson E. B., Krotkov N. E., (1970), *Plant Physiol.*, **46**, 386—391.
292. Zelitch I., (1975), *Science* **188**, 626—633.
293. Merrett M. J., Lord J. M., (1973), *New Phytologist.*, **72**, 751—767.
294. Colman B., Miller A. G., Grodziński B., (1974), *Plant Physiol.*, **53**, 395—397.
295. Goldsworthy A., (1969), *Nature* **224**, 501—502.
296. Tolbert N. E., (1973), w Algal Physiology and Biochemistry, red. W. D. P. Steward, Blackwell, Oxford.
297. Osmond C. B., Björkman O., (1972), *Carnegie Inst. Washington Year Book* **71**, 141—148.

Profesor David Shugar laureatem Medalu Finsena

Profesor David Shugar, Kierownik Zakładu Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN został odznaczony Medalem im. Nielsa Finsena za badania w dziedzinie fotochemii i struktury kwasów nukleinowych i białek.

Nagroda im. Nielsa Finsena została ufundowana ku uczczeniu duńskiego pioniera fotobiologii i fototerapii (1860—1904) i jest przyznawana przez Międzynarodowy Komitet Fotobiologiczny (M.K.F.) od roku 1937.

Dotychczasowymi laureatami Medalu Finsena był cały szereg wybitnych fotobiologów i fotochemików. Wymienimy przykładowo kilka dobrze w Polsce znanych nazwisk: A. Terenin, ZSRR (1964), A. Hollaender, USA, E. J. Bowen, Anglia (1968), Th. Förster, RFN, R. Hill, Anglia, R. Latarjet, Francja (1972).

Przyznanie Medalu Finsena nastąpiło na wniosek Polskiej Grupy Fotobiologicznej skierowany do M.K.F., która jednomyślnie wysunęła kandydaturę Profesora Shugara. Nagroda ta jest uznaniem jego osobistego wkładu w dziedzinę fotochemii i fotobiologii kwasów nukleinowych, a także uznaniem dorobku polskiej szkoły fotobiologicznej, której był twórcą i wieloletnim promotorem.

Profesor David Shugar jest jednym z założycieli międzynarodowego czasopisma „*Photochemistry and Photobiology*” (1962). W 1966 roku Wydział Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego powierzył mu organizację pierwszej w Polsce Katedry Biofizyki.

Profesor Shugar ma wielkie zasługi dla polskiej fotobiologii, zarówno przez własną działalność naukową, jak i przez wychowanie swych uczniów, dziś już samodzielnych pracowników naukowych.

Medal Finsena będzie wręczony Prof. Shugarowi w czasie Kongresu Fotobiologicznego, który w bieżącym roku odbędzie się w Rzymie. Na uroczystym przyjęciu w dniu 31 sierpnia na Kapitolu, osiągnięcia Profesora Davida Shugara omówi Profesor R. B. Setlow z USA.

MARIA LERCHER *

Protoplasty roślinne i ich zastosowanie w badaniach biologicznych

Plant Protoplasts and their Application in Biological Investigations

Protoplast zgodnie z definicją Hansteina z 1880 r. (1) jest komórką roślinną pozbawioną ściany komórkowej, zachowującą jednak właściwości fizjologiczne. Mimo, że pierwsze protoplasty otrzymano w XIX w. dopiero w ostatnich latach, po opracowaniu enzymatycznych metod trawienia ściany komórkowej, rozszerzyły się badania nad otrzymywaniem protoplastów, ich hodowlą i zastosowaniem w badaniach z różnych dziedzin genetyki, fizjologii i biochemii.

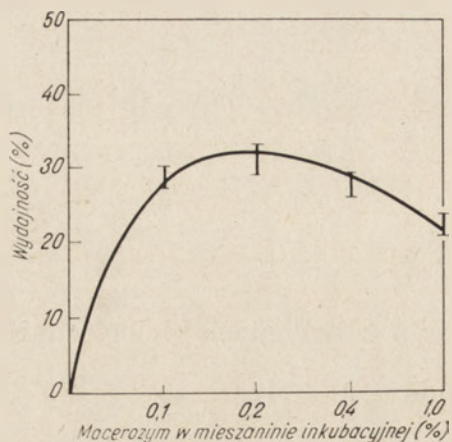
I. Otrzymywanie protoplastów

Usuwanie ściany komórkowej można przeprowadzić dwiema metodami — mechaniczną i enzymatyczną.

Metodę mechaniczną do otrzymywania protoplastów roślinnych zastosował po raz pierwszy w 1892 roku Klercker (1). Autor ten ciął podane plazmolizie tkanki i izolował w ten sposób nieliczne, nieuszkodzone protoplasty. Metodą tą można otrzymywać protoplasty tylko z tkanek, w których plazmoliza zachodzi łatwo i dlatego nie pozwala ona na otrzymanie ich z większości tkanek.

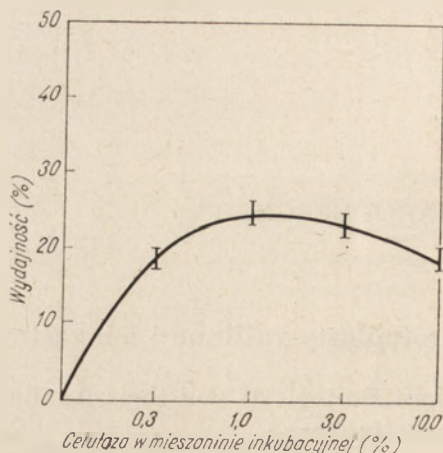
Trawienie enzymatyczne ściany komórkowej w celu otrzymania protoplastów zastosowano już w 1919 r. do komórek drożdży, trawiąc ich ściany sokiem żołądkowym ślimaka *Helix pomatia* (1). W następnych latach stosowano tę metodę do otrzymywania protoplastów z grzybów, bakterii i roślin wyższych (2, 3, 4). Metoda enzymatyczna pozwala na uzyskanie nienaruszonych protoplastów z dobrą wydajnością prawie ze wszystkich roślin i tkanek miękkiszowych. Wydajność tej metody zależy jednak od indywidualnych cech rośliny.

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



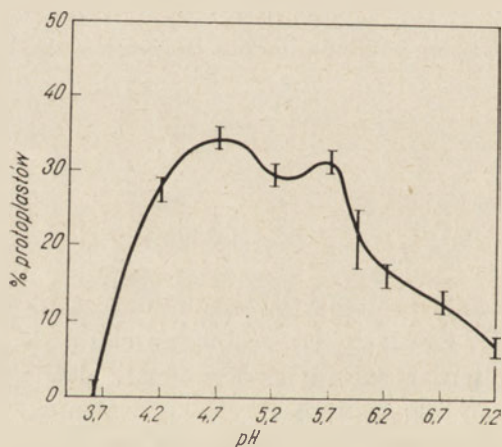
Ryc. 1. Wydajność otrzymywania protoplastów z liści tytoniu w zależności od stężenia Macerozemu (7).

Roztwór inkubacyjny zawierał 0,1 M D-mannitol, 2% Cellulazę, 0,3% siarczan dekstranu oraz Macerozym w stężeniu od 0 do 1%.



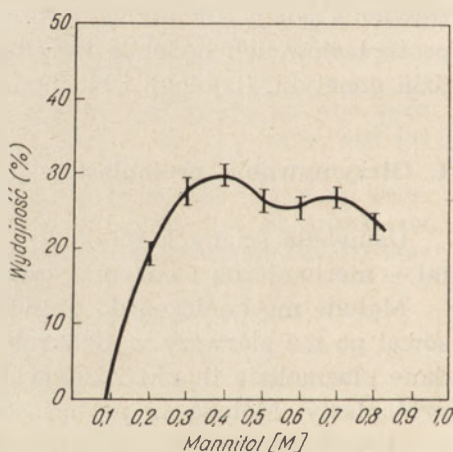
Ryc. 2. Wydajność otrzymywania protoplastów z liści tytoniu w zależności od stężenia Cellulazy (7).

Roztwór inkubacyjny zawierał 0,2% Macerozym, 0,7 M D-mannitol, 0,3% siarczan dekstranu oraz Cellulazę w stężeniu od 0 do 10%.



Ryc. 3. Wydajność otrzymywania protoplastów z liści tytoniu w zależności od pH mieszaniny inkubacyjnej (7).

Roztwór inkubacyjny zawierał 1% Cellulazę, 0,2% Macerozym, 0,7 M D-mannitol oraz 0,3% siarczan dekstranu.



Ryc. 4. Wydajność otrzymywania protoplastów z liści tytoniu w zależności od stężenia mannitolu (7).

Mieszanina inkubacyjna zawierała 1% Cellulazę, 0,2% Macerozym oraz 0,3% siarczan dekstranu.

Najbardziej znaną i najpowszechniej stosowaną metodą otrzymywania protoplastów jest metoda opracowana w 1968 r. przez Takebe i Otsuki (5), którzy na skrawki liści tytoniu, z których dolnej powierzchni usunięto epidermę, działali kolejno dwoma preparatami enzymatycznymi. Pierwszy z nich zawierający pektynazę, a otrzymywany z *Rhizopus* sp

nosi handlową nazwę Macerozym, drugi zaś zawierający celulozę, a otrzymywany z grzyba *Trichoderma viride* ma handlową nazwę Cellulaza P 1500. Działanie Macerozymu powodowało rozpad tkanki na pojedyncze komórki, z których następnie po strawieniu ich ścian Cellulazą uzyskiwano protoplasty.

Izolowanie protoplastów przeprowadza się w roztworze mannitolu o różnym stężeniu (0,6 — 0,8 M), w czasie od 1 do 4 godzin, zależnie od rodzaju tkanki. Ryciny 1, 2, 3 przedstawiają zależność wydajności opisywanej metody od stężenia w mieszaninie inkubacyjnej — Macerozymu, Cellulazy i Mannitolu. Okazało się, że również pH mieszaniny inkubacyjnej wpływa na wydajność otrzymywania protoplastów (Ryc. 4) (7).

W ostatnich latach wprowadzono pewne modyfikacje metody Takebe i Otsuki. Zamiast zdzierania epidermy z dolnej powierzchni liścia, stosuje się enzymatyczne trawienie kutikuli (6) a następnie preparaty pektynazy (preparat handlowy), zamiast Macerozymu. Preparat ten zawiera bowiem pewne białka toksyczne powodujące lizę protoplastów z niektórych gatunków roślin (8). Uważa się, że dodatek siarczanu dekstranu do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej Macerozym chroni protoplasty przed toksycznym działaniem tych białek (5). Do otrzymywania protoplastów często stosuje się również trawienie skrawków liści jednocześnie Macerozymem i Cellulazą (9—13).

Podobne postępowanie stosuje się do otrzymywania protoplastów z wielu roślin zielnych dwu- i jednoliściennych (13, 14). Liście roślin jednoliściennych wolniej ulegają maceracji niż liście roślin dwuliściennych. Wynika to z obecności w nich śluzowatych substancji utrudniających działanie enzymu. Stopień maceracji zależy od indywidualnych cech danej rośliny i waha się w podanych warunkach od 20 do 95%. Aby wyizolować komórki otrzymane w wyniku maceracji rośliny poddaje się dalszemu trawieniu celulazą. W pewnych przypadkach jak np. z *Zinnia elegans* nie udało się otrzymać protoplastów nawet przy bardzo długo trwającej inkubacji komórek z Cellulazą P 1500, komórki *Vigna sinensis* natomiast ulegały zniszczeniu w wyniku inkubacji z tym preparatem.

Z tkanek twardych, takich jak tarczka zarodkowa lub warstwa aleuronowa zbóż, protoplasty udaje się uzyskać z niewielką wydajnością (15—20%). Protoplasty takie otoczone są jeszcze resztkową ścianą tzw. ścianą Onozuki. Dopiero po dalszym ich trawieniu „Glusulazą” uzyskiwano całkowicie pozbawione ściany komórkowej protoplasty (15).

II. Właściwości protoplastów, regeneracja ściany i podziały

Pojedyncze komórki lub protoplasty można utrzymać przy życiu przechowując je w roztworze zawierającym sole nieorganiczne w odpowiednich stężeniach, 0,8M mannitol, hormon wzrostowy 6-benzyladeninę

oraz antybiotyki (5). Jednakże tylko pewne antybiotyki nie wywierają ujemnego wpływu na hodowlę protoplastów. Wykazano, że dobrą ochronę przed zakażeniem grzybami zapewniają amfoterycyna B i nystatyna, przy czym tylko nystatyna nie wywierała ujemnego wpływu na biosyntezę białek w protoplastach. Spośród wielu badanych środków przeciwbakteryjnych tylko karbenicylina, cefalorydyna i gentamycyna nie dopuszczały do powstania zakażeń bakteryjnych, nie upośledzając zarazem włączania aminokwasów do białek. Wykazano ponadto, że te antybiotyki nie hamowały regeneracji ściany i podziałów protoplastów (16, 17).

Strukturę enzymatycznie izolowanych protoplastów badano przy pomocy mikroskopu świetlnego i elektronowego (18, 19). Jak wykazano, centralną część protoplastu zajmuje wakuola stanowiąca 70% jego objętości. Jądro, chloroplasty, mitochondria, aparat Golgi'ego i retikulum endoplazmatyczne, występujące w cienkiej warstwie cytoplazmy zajmującej przestrzeń między wakuolą a błoną komórkową, mają nie zmieniony wygląd. W chloroplastach pojawia się krystaliczna substancja, której nie znajduje się w plastydach komórek otoczonych ścianą. Podobne zjawisko krystalizacji występujących w dużej ilości w chloroplastach białek frakcji I (karboksylaza rybulozodwufosforanu) obserwowano w całych liściach lub izolowanych chloroplastach po umieszczeniu ich w roztworach hipertonicznych (21).

Porównanie protoplastów otrzymanych z korzenia *Allium cepa* (cebula) metodą mechaniczną i enzymatyczną, wykazało, że protoplasty otrzymane metodą mechaniczną były mniejsze i wykazywały wyższą aktywność transaminazową i RN-azową, (Tabela 1) (22, 23). Aktywność obydwu enzymów była także wyższa w protoplastach otrzymanych metodą mechaniczną, prawdopodobnie z powodu krótszego czasu usuwania ściany komórkowej w porównaniu z metodą enzymatyczną.

Protoplasty izolowane metodą enzymatyczną mogą regenerować ścianę komórkową, jak wykazano to badając regenerację ściany protoplastów z owoców pomidora (24). To samo zjawisko stwierdzono również badając

Tabela 1

Aktywność RN-azowa* i transaminazowa** w protoplastach otrzymanych z korzenia *Allium cepa* (22)

Enzym	Protoplasty	
	otrzymane metodą mechaniczną	otrzymane metodą enzymatyczną
RN-aza	10,4 ± 3,2	6,1 ± 2,7
Transaminaza	10,2 ± 2,4	7,9 ± 4,7

* Aktywność wyrażona w gęstości optycznej ($\times 10^3$) przy 260nm w przeliczeniu na 10^7 protoplastów.

** Aktywność wyrażona w μg wytworzonego pirogronianu w przeliczeniu na 10^7 protoplastów.

inne rośliny (20, 25—30). Tworzenie się nowej ściany wokół protoplastów badano przy pomocy fluoryzującego związku (Calcofluor White ST.), tworzącego połączenie z celulozą (20). Po dwóch dniach hodowli 60—80% protoplastów wykazywało na powierzchni fluorescencję, świadczącą o powstawaniu nowej ściany komórkowej, a po trzech dniach praktycznie wszystkie protoplasty posiadały zregenerowaną ścianę.

Protoplasty wykazują normalną zdolność do podziałów. Już po trzech, czterech dniach hodowli 60—80% protoplastów przechodzi pierwszy podział. Potomne komórki dzielą się po pięciu do siedmiu dniach hodowli, a po dziesięciu dniach zachodzi trzeci podział. W tym też czasie obserwowano zanik zielonej barwy chloroplastów oraz spadek liczby tych organeli w przeliczeniu na protoplast, co sugeruje, że liczba chloroplastów nie zwiększa się w czasie podziałów protoplastu. Wśród całej masy protoplastów dzielących się prawidłowo, znajdują się takie, które nie dzielą się a tylko wydają niewielkie ilości cytoplazmy, z której tworzą się tak zwane subprotoplasty. Sacharoza (2%), w płynnym podłożu hodowlanym, sprzyja wytwarzaniu subprotoplastów. Podziały protoplastów, otrzymanych z mięksiszu liści tytoniu obserwowano również w hodowli na podłożu stałym — zawierającym agar (31). Rozpoczęły się one, podobnie jak w protoplastach hodowanych w pożywce płynnej, trzeciego dnia, a w ciągu dwóch tygodni wszystkie wyjściowe protoplasty wytworzyły małe kolonie, w których stwierdzono zanik chloroplastów. Organelle te pojawiły się ponownie dopiero po trzech tygodniach hodowli.

Podobne podziały otrzymywano również podczas hodowli protoplastów z marchwi (32, 33) z liści petunii (34), grochu (35), fasoli (36), asparagusa (37) i soi (38), jak również tetraedrycznych haploidalnych komórek pyłku kwiatowego *Nicotiana tabacum* (tytoń szlachetny) i *Atropa belladonna* (pokrzyk wilcza — jagoda) (39, 40).

We wszystkich omówionych hodowlach protoplastów na podłożu stałym zamiast mannitolu stosowano sacharozę, co zapewniało regenerację ściany komórkowej i prawidłowy przebieg kario- i cytokinazy. W nieobecności sacharozy nie następowała regeneracja ściany komórkowej, obserwowano tylko samą kariokinezę, co prowadziło do powstawania wielojądrowych protoplastów (41, 42).

III Dyferencjacja i zlewianie się protoplastów

Protoplasty mogą nie tylko dzielić się lecz również ulegać dyferencjacji prowadzącej do wytworzenia tkanek i narządów, a nawet całej rośliny. Do tego celu można wykorzystać protoplasty roślin haploidalnych (35, 43) i diploidalnych (32, 33, 35, 41, 44, 45, 46).

Aby doprowadzić do dyferencjacji protoplastów trzeba ich hodować

prowadzić w specjalnych warunkach. Haploidalne protoplasty otrzymano z haploidalnych roślin tytoniu wyhodowanych z pyłku kwiatowego. Protoplasty te przechowywane w roztworze zawierającym sole nieorganiczne, witaminy, mannitol, czynniki wzrostowe 6-benzyloaminopurynę i kwas dwuchlorofenoksyoctowy (roztwór I), wytwarzały kolonie komórek, które następnie hodowano w roztworze I zawierającym 0,6% agar i 0,5 M sacharozę zamiast mannitolu (43, 47).

Stwierdzono wpływ podanych w różnych stężeniach substancji wzrostowych — kwasu dwuchlorofenoksyoctowego i 6-benzyloaminopuryny na podziały protoplastów hodowanych na różnych podłożach (Tabela 2). Ha-

Tabela 2

Podziały haploidalnych protoplastów *N. tabaceum* w zależności od kwasu dwuchlorofenoksyoctowego i 6-benzyloaminopuryny występujących w różnych kombinacjach stężeń (43).

Środowisko hodowlane	Stężenie substancji wzrostowych (mg/ml)		Tworzenie subprotoplastów	Dzień w którym zachodzi I podział	Komórki dzielące się po tym czasie %
	2,4-D*	BA**			
płynne	1,0	1,0	++	10—12	10
	0,1	1,0	+	5—6	70—80
	1,0	0,1	++	5—9	10—20
	0,1	0,1	+	7—8	30—40
z dodatkiem agaru	1,0	1,0	—	10—11	50—60
	0,1	1,0	—	15—16	30—40
	1,0	0,1	—	15—16	20—30
	0,1	0,1	—	20	10

+ subprotoplasty tworzą się, — brak subprotoplastów.

* 2,4-D — kwas dwuchlorofenoksyoctowy

** BA — 6-benzyloaminopuryna

mowanie podziałów protoplastów hodowanych na podłożach płynnych obserwowano w obecności kwasu dwuchlorofenoksyoctowego i 6-benzyloaminopuryny użytych w stężeniach 1mg/ml. Częstotliwość podziałów protoplastów zwiększała się po 10-krotnym obniżeniu stężenia kwasu dwuchlorofenoksyoctowego. W hodowlach na stałym podłożu natomiast obie substancje wzrostowe w stężeniu 1 mg/ml nie zmniejszały liczby dzielących się protoplastów.

Aby spowodować wytworzenie się pędu kolonie komórek wyhodowanych z protoplastów, przenoszono do roztworu zawierającego sole mineralne, witaminy, 2% sacharozę, zeatynę, adeninę, kwas indoliloctowy (1 mg/ml), 0,8% agar (roztwór II) i naświetlano je światłem o natężeniu 1000 lux w ciągu 18 godzin na dobę. Po dwóch tygodniach zaczęły formować się pędy. Wówczas, jako podłoże hodowlane zastosowano roztwór

pozbawiony zeatyny i adeniny, a zawierający kwas indoliloctowy w stężeniu tylko 0,1mg/ml. Po tygodniu hodowli pojawiły się korzenie, a po pięciu miesiącach hodowli w tych warunkach otrzymano kwitnące rośliny, z których około 80% zawierało haploidalną liczbę chromosomów w komórkach. Tak więc możliwość wyhodowania haploidalnych roślin z protoplastów stwarza duże możliwości hodowli nowych odmian.

Roślinne protoplasty wykazują również zdolność do zlewania się ze sobą w odpowiednich warunkach i tworzenia hybrydowych komórek (48—68). Wykazano, że sole nieorganiczne stymulują zlewanie się protoplastów otrzymanych z liści *Brassica chinensis* (kapusta chińska) i *B. oleracea* (kapusta warzywna) (55, 57). Na zlewanie się protoplastów wywierają ponadto wpływ obecność pewnych soli mineralnych w roztworze, w którym zachodzi degradacja ściany komórkowej (Tabela 3). Stwierdzono, że

Tabela 3

Łączenie się protoplastów *Brassica* sp. w obecności różnych soli nieorganicznych (55).

Roztwór do izolowania protoplastów metodą enzymatyczną*	Roztwór soli stosowanej do łączenia protoplastów**					
	KCl	KNO ₃	NaCl	NaNO ₃	CaCl ₂	Ca(NO ₃) ₂
KCl	—	—	++	++	—	—
KNO ₃	—	—	+	++	—	—
NaCl	+	+	+	+	—	—
CaCl ₂	—	—	—	—	—	—
Ca/NO ₃ / ₂	—	—	—	—	—	—

* Roztwór zawierał 0,1% pektynazę, 5% celulazę i 0,7 M roztwór badanej soli.

** Stężenie soli 0,7M.

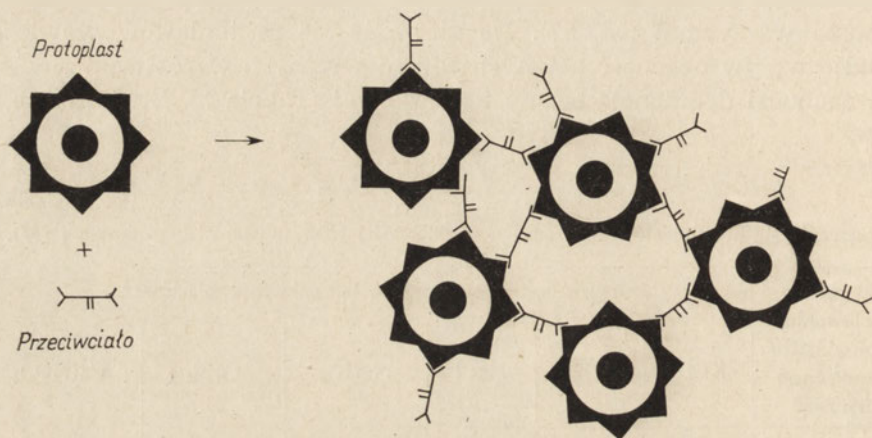
++ — intensywne złączanie, + — powolne złączanie, — — brak złączania.

dużą wydajność zlewania się protoplastów można uzyskać dodając soli potasowych do roztworu enzymów trawiących ścianę, a soli sodowych do roztworu, w którym zachodzi ich zlewanie.

Badano również wpływ pewnych białek, żelatyny, globuliny, kazeiny, histonów i peptonu na zlewanie się protoplastów *Allium fistulosum* (czosnek dęty), *B. chinensis* (kapusta chińska), *Daucus carota* (marchew) i wykazano, że tylko żelatyna stymulowała ten proces (53).

Do agregacji i zlewania się protoplastów znalazła również zastosowanie metoda immunologiczna (54). Protoplasty z *Vicia hajastana*, *Glycine maxima* i *Bromus inermis* (stokłosa bezostna) wytrącano surowicą otrzymaną z królików, które immunizowano zawiesiną tych protoplastów. Metodą tą uzyskiwano ponad 75% agregacji protoplastów. Prze-

ciwiała anty- i *V. hajastana* powodowały agregację zarówno protoplastów *V. hajastana* jak i *G. maxima* i odwrotnie. Przeciwciała anty- *B. inermis* dobrze agregowały protoplasty z tej rośliny jak i protoplasty *V. hajastana*. Wskazuje to na duży stopień podobieństwa znajdujących się na błonie protoplastów miejsc czynnych w procesie agregacji (ryc. 5). Jednakże nie wszyscy autorzy zgadzają się z obserwacją, że w czasie agregacji zachodzi zlewanie się protoplazmy protoplastów (62). Uważają oni, że dopiero po zastosowaniu takich czynników jak glikol polietylenowy, poli-L-ornityna przy wysokich wartościach pH w obecności jonów wap-



Ryc. 5. Schemat agregacji protoplastów homologicznymi przeciwciałami (54).

nia może nastąpić połączenie się protoplazmy protoplastów. Coraz częściej jako czynnik ułatwiający zlewanie się protoplastów stosuje się właśnie glikol polietylenowy (61, 62, 64, 65, 66, 68). Stwierdzono, że działa on na protoplasty stopniowo. Początkowo, pod jego wpływem obserwuje się zmniejszenie objętości protoplastów, w wyniku usunięcia części wody, następnie zaś silne zlepianie błon komórkowych poszczególnych protoplastów, a w konsekwencji agregację i ostateczne zlanie się komórek.

Carlsonowi i wsp. udało się wyhodować po raz pierwszy hybrydowe rośliny ze zlanych protoplastów (51). Łączył on protoplasty dwóch gatunków tytoniu, *Nicotiana glauca* i *N. langsdorfii*, stosując azotan sodu jako czynnik powodujący zlewanie. Protoplasty połączone na drodze hybrydacji, umieszczone w pożywce opisanej przez Nagata i Takebe (31), dzieliły się tworząc tkankę kallusową, natomiast protoplasty obu wyjściowych gatunków w tych samych warunkach nie wytwarzały nawet kolonii. Ta różnica we wzroście hybrydów i protoplastów wyjściowych stanowiła podstawę selekcji hybrydowych komórek, z których w odpowiednich warunkach rozwijały się dojrzałe rośliny. Porównano somatyczne hybrydy, otrzymane w wyniku zlania protoplastów pochodzących z *N. glauca* i *N. langsdorfii* ze znanymi płciowymi amfiploidami tych sa-

mych gatunków. Porównawcze badania morfologiczne, genetyczne i biochemiczne potwierdziły hybrydowy charakter wyhodowanych z protoplastów roślin (51). Otrzymano także somatyczne hybrydy z połączenia haploidalnych protoplastów otrzymanych z dwóch wrażliwych na światło odmian tytoniu *N. tabacum* subletalna (s) i *N. tabacum* bladezielona (v) (67). Okazało się, że rośliny te charakteryzują się podobnymi cechami jak rośliny powstałe w wyniku płciowej krzyżówki wymienionych odmian tytoniu. Dane te unaocniają potencjalne korzyści dla hodowli roślin, wynikające ze zdolności protoplastów do somatycznej hybrydyzacji.

IV. Pobieranie przez protoplasty makrocząsteczek, chloroplastów, bakterii i wirusów

Protoplasty mogą również pobierać nie tylko drobne cząsteczki związków występujących w pożywce lecz także większe cząstki a nawet bakterie i chloroplasty. Wykazano, że protoplasty *N. tabacum* pobierają ferrytynę (69). Ukazały się także doniesienia na temat pobierania znakowanego DNA przez protoplasty *Petunia hybrida* i *Ammi visnaga* (73, 74). Dowiedziono również, że protoplasty *Petunia* sp. i *Daucus carota* włączają chloroplasty glonów (70—72). Okazało się także, że do protoplastów z liści grochu wnika bakterie (*Rhizobium leguminosarum*) (75). Obecność bakterii wewnątrz komórek roślinnych potwierdzono za pomocą mikroskopu elektronowego. Stwierdzono, że bakterie mogą wnikać do protoplastów tylko w czasie enzymatycznej degradacji ściany. Nie obserwowano wnikania *R. leguminosarum* podczas inkubowania z zawiesiną bakterii już otrzymanych protoplastów, a także skrawków liści. Przypuszczalnie podczas trawienia ściany zachodzą w błonie komórkowej pewne zmiany umożliwiające wniknięcie bakterii.

Protoplasty okazały się szczególnie dogodnym materiałem do badań zakażenia roślin wirusami (76—87). Przy pomocy mikroskopu elektronowego wykazano, że do protoplastów wnika nienaruszone cząstki wirusowe (76—79), co pozwoliło na rozpoczęcie badań nad mechanizmem wnikania wirusów do komórki roślinnej. Wykazano, że do zainfekowania komórek roślinnych wirusem niezbędna jest obecność, w zawiesinie wirusów służącej do infekcji, poli-L-ornityny (76, 79, 83) znanej jako czynnik stymulujący pinocytozę w komórkach zwierzęcych (88). Okazało się, że poli-L-ornitynę można zastąpić takimi polikationami jak poli-L-lizyna, poli-D-lizyna, poli-L-arginina (77). Większość autorów uważa, że wirusy wnika do protoplastów na zasadzie pinocytozy (76, 78, 89, 90). Jednak wyniki innych badań (77, 79) sugerują, że do wniknięcia wirusa do protoplastów niezbędne jest uszkodzenie błony komórkowej, a poli-L-ornityna i inne polikationy powodują prawdopodobnie takie uszkodzenie.

V. Zastosowanie protoplastów w badaniach metabolizmu komórek roślinnych

Opracowanie metody izolowania protoplastów pozwoliło na rozpoczęcie nowego typu badań metabolizmu roślin wyższych na poziomie komórkowym dzięki możliwości przeprowadzenia ich na dużej populacji homogennych komórek.

Wykazano na przykład przydatność protoplastów do badania procesów fotosyntezy (91—94) i fotooddychania (91). W badaniach tych porównywano włączanie CO_2 przez zawiesinę protoplastów z liści słonecznika z włączaniem tego prekursora do całych liści. Stwierdzono, że optymalne włączanie CO_2 do protoplastów zachodzi w warunkach naświetlania optymalnych dla fotosyntezy w całych liściach. Wykazano, że w warunkach optymalnego naświetlania w wyniku zachodzącego równocześnie z fotosyntezą fotooddychania, w liściach słonecznika nagromadzają się jako główne produkty glicyna i seryna. W protoplastach natomiast izolowanych z liści tej rośliny w tych samych warunkach naświetlania wykrywano w dużej ilości jako produkt fotooddychania — glikolan. Glikolan również wytwarza glon *Chlorella pyrenoidosa*, która też wydala go do podłoża. Podobny wynik uzyskano, gdy w roztworze wodnym, w którym trzymano protoplasty, było bardzo mało tlenu, co ograniczało fotooddychanie, a w konsekwencji utlenienie glikolanu do glioksalanu i dalsze jego przekształcenie w glicynę i serynę.

Protoplasty stanowią również bardzo dobry materiał do badania biosyntezy kwasów nukleinowych i biosyntezy białka (18, 95, 96). Syntezę RNA badano inkubując protoplasty tytoniu z uracylem znakowanym ^{14}C (95). Po 12 godzinach inkubacji 20% podanej radioaktywności znaleziono w RNA protoplastów. Elektroforeza wyizolowanego RNA wykazała, że radioaktywność znajduje się przede wszystkim w 25 S i 18 S RNA rybosomów frakcji cytoplazmatycznej, natomiast mniej niż 10% włączonego uracylu znajdowano w RNA rybosomów chloroplastowych tj. we frakcji

Tabela 4

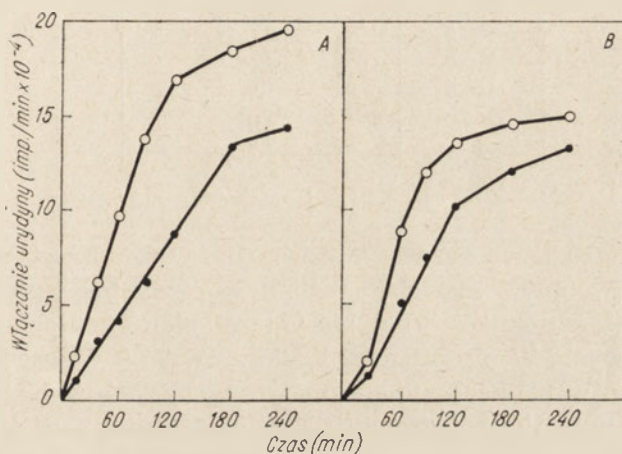
Wpływ inhibitorów na syntezę kwasów nukleinowych (RNA) w protoplastach *N. tabaceum* (95).

Inhibitor	Stężenie ($\mu\text{g/ml}$)	Hamowanie (%)	
		Włączanie ^{14}C -uracylu do RNA	Włączanie ^{14}C -uracylu do frak. rozpuszczalnej w kwa- sie
Aktynomycyna D	10	71,4	0
Chromanycyna A ₃	100	78,2	16,7
2-tiouracyl	10	18,2	18,0

Protoplasty inkubowane 12 godzin z 0,02 $\mu\text{C/ml}$ ^{14}C -uracylu w obecności inhibitorów.

23 S i 16 S. Wpływ niektórych antybiotyków na włączanie znakowanego uracylu przez protoplasty *N. tabacum* do RNA podano w tabeli 4. Aktynomycyna D i chromomycyna A₃ hamują w znacznym stopniu aktywność polimerazy RNA zależnej od DNA oraz syntezę RNA w chloroplastach. 2-tiouracyl hamował biosyntezę RNA jedynie w niewielkim stopniu (95).

Protoplasty znalazły również zastosowanie w badaniach działania hormonów roślinnych na biosyntezę RNA w komórkach roślin wyższych (96). Do badań stosowano protoplasty z siewek kukurydzy, w których śledzono włączanie ³H-urydyny do RNA w protoplastach z roślin kontrolnych i hodowanych na pożywce z kwasem giberelinowym. (Ryc. 6). Okazało się, że



Ryc. 6. Włączanie H³-urydyny do RNA protoplastów otrzymanych z siewek kukurydzy (96).

A. ●—● protoplasty kontrolne, ○—○ protoplasty z roślin rosnących na pożywce z GA₃.

B. ●—● protoplasty kontrolne, ○—○ GA₃ obecny tylko podczas inkubacji.

obecność tego hormonu stymulowała syntezę RNA dwukrotnie, gdy rośliny rosły na pożywce z kwasem giberelinowym, nie więcej zaś niż 50%, gdy kwas giberelinowy dodano tylko na czas inkubacji z ³H-urudyną. Wykazano, że hormon ten wpływał głównie na syntezę jądrowego RNA. Sugeruje się, że kwas giberelinowy działa na etapie transkrypcji, jednakże sprawa ta nie jest jeszcze wyjaśniona do końca (96).

Biosyntezę białka badano inkubując protoplasty z liści tytoniu z ¹⁴C-leucyną (95). Po 12 godzinach inkubacji 36% podanej radioaktywności odnajdowano w białkach protoplastów. Włączanie ¹⁴C-leucyny podlegało zahamowaniu przez cykloheksomid, blasticydynę S, enomycynę, które hamują syntezę białka także w komórkach grzybów i wyższych organizmów. Chloramfenikol użyty w stężeniu 200 μg/ml hamował włączanie ¹⁴C-leucyny do protoplastów liści tytoniu, zastosowany zaś w niższych stężeniach nie wywierał żadnego wpływu. Efekt puromycyny podobny był do efektu chloramfenikolu, podczas gdy obecność aktynomycyny D tylko nieznacz-

Tabela 5

Wpływ inhibitorów na syntezę białka w protoplastach *N. tabacum* (95).

Inhibitor	Stężenie ($\mu\text{g/ml}$)	Hamowanie (%)	
		Włączanie ^{14}C -leucyny do białka	Włączanie ^{14}C -leucyny do frakcji rozpuszczalnej w kwasie
Cykloheksomid	0,1	79,8	23,2
	1,0	96,3	49,7
Blastycydyna S	0,1	44,2	13,7
	1,0	89,5	38,7
Enomycyna	100,0	48,6	10,0
Chloramfenikol	100,0	0	0
	200,0	28,4	0
Puromycyna	100,0	3,8	3,0
	200,0	23,0	0
Aktynomycyna D	10	2,7	1,3

Protoplasty inkubowano 12 godzin z $0,02 \mu\text{C/ml}$ ^{14}C -leucyny w obecności inhibitorów.

nie wpływała na aktywność biosyntezy białka w protoplastach (Tabela 5). Podobnie jak w innym materiale roślinnym różny był wpływ cykloheksomidu i chloramfenikolu na biosyntezę białek cytoplazmatycznych i chloroplastowych. W nieobecności inhibitorów 70% włączonej ^{14}C -leucyny znajdowano w białkach cytoplazmatycznych, 25% w białkach chloroplastów i 5% w białkach jądrowych. Cykloheksomid hamował włączanie do białek cytoplazmy o 78%, a do białek chloroplastowych jedynie o 36%, podczas gdy wpływ chloramfenikolu był odwrotny. Wyniki te potwierdzają, że w protoplastach podobnie jak w glonach i liściach syntezę białka w rybosomach chloroplastowych sepcyficznie hamuje chloramfenikol, podobnie jak w organizmach prokariotycznych.

Opracowanie metody izolowania protoplastów pozwoliło na zbadanie rozmieszczenia niektórych enzymów na terenie komórki roślinnej (97). Porównywano zawartość izoenzymów peroksydazy w całych liściach oraz w protoplastach *N. tabacum*, i okazało się, że znajduje się je jedynie w preparacie z liści. Sugeruje to, że izoenzymy peroksydazy związane są ze ścianą komórkową i zostały oddzielone od protoplastów wraz ze strawioną ścianą.

Przedstawiony aktualny przegląd badań nad protoplastami roślinnymi wykazuje jak pożyteczne są badania prowadzone w tym kierunku. Szczególnie interesujące są wyniki somatycznej hybrydyzacji, która daje możliwość wyhodowania korzystnych dla człowieka odmian roślin. Również zastosowanie protoplastów do badań nad wirusami roślinnymi już w tej chwili okazało się bardzo owocne. Ogólną korzyścią dla badań metabolicznych jest możliwość uzyskania jednorodnej populacji komórek roślinnych.

Artykuł nadszedł 20.8.1975, po rewizji autorskiej otrzymano 10.2.1976.

PIŚMIENNICTWO

1. Cocking E. C., (1972), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **23**, 29—50.
2. Spizizen J., (1962), w *Methods Enzymology*, red. Colowick S. P., Kaplan N. O., t. 5, str. 122—134, Academic Press, New York and London.
3. Gregory D. W., Cocking E. C., (1965), *J. Cell Biol.*, **24**, 143—146.
4. Ruesink A. W., Thimann K. V., (1966), *Science*, **154**, 280—281.
5. Takebe I., Otsuki Y., Aoki S., (1968), *Plant Cell Physiol.*, **9**, 115—124.
6. Schilde-Rentschler L., (1972), *Z. Naturforsch.*, **27**, 208—209.
7. Uchimiya H., Murashige T., (1974), *Plant Physiol.*, **54**, 936—944.
8. Ruesink A. W., Thimann K. V., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 56—64.
9. Evans P. K., Keates A. G., Cocking E. C., (1972), *Planta*, **104**, 178—181.
10. Kanai R., Edwards G. E., (1973), *Plant Physiol.*, **52**, 484—490.
11. Davey M. R., Frearson E. M., Wither L. A., Power J. B., (1974), *Plant Sci. Let.*, **2**, 23—27.
12. Skene K. G. M., (1974), *Aust. J. Plant Physiol.*, **1**, 371—376.
13. Watts J. W., Motoyoshi F., King J. M., (1974), *Ann. Bot.*, **38**, 667—671.
14. Otsuki Y., Takebe I., (1969), *Plant Cell Physiol.*, **10**, 917—921.
15. Taiz L., Jones R. L., (1971), *Planta*, **101**, 95—100.
16. Watts J. W., King J. M., (1973), *Planta*, **113**, 271—277.
17. Davey M. R., Busch E., Power J. B., (1974), *Plant Sci. Let.*, **3**, 127—133.
18. Takebe I., Otsuki Y., (1973), *Planta*, **113**, 21—27.
19. Condeelis J. S., (1974), *Exp. Cell Res.*, **88**, 435—439.
20. Nagata T., Takebe I., (1970), *Planta*, **92**, 301—309.
21. Kawashima N., Wildman S. G., (1970), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 325—358.
22. Pile P. E., Prat R., Roland J. C., (1972), *Plant Cell Physiol.*, **13**, 297—309.
23. Burgess J., Watts J. W., Fleming E. N., King J. M., (1973), *Planta*, **110**, 291—301.
24. Pojnar E., Willison J. H. M., Cocking E. C., (1967), *Protoplasma*, **64**, 460—480.
25. Erikson T., Jonasson K., (1969), *Planta*, **89**, 85—89.
26. Upadhyaya M. D., (1975), *Potato Res.*, **18**, 438—445.
27. Messrschmidt M., (1974), *Z. Pflanzenphysiol.*, **74**, 175—178.
28. Kao N. K., Kewor W. A., Miller R. A., (1974), *Exp. Cell Res.*, **62**, 338—340.
29. Hanke D. E., Northcote D. H., (1974), *J. Cell Sci.*, **14**, 29—50.
30. Coutis R. H. A., Wood K. R., (1975), *Plant Sci. Let.*, **4**, 189—193.
31. Nagata T., Takebe I., (1971), *Planta*, **99**, 12—20.
32. Grambow H. J., Kao K. N., (1972), *Planta*, **103**, 348—355.
33. Kameya T., Uchimiya H., (1972), *Planta*, **103**, 356—360.
34. Potrykus I., Durand J., (1972), *Nature*, **237**, 286—287.
35. Binding H., (1974), *Z. Pflanzenphysiol.*, **74**, 327—356.
36. Pelcher L. E., Gamborg O. L., Kao K. N., (1974), *Plant Sci. Let.*, **3**, 107—111.
37. Bui-Dang-Ha D., MacKenzie I. A., (1973), *Protoplasma*, **78**, 215—221.
38. Kao K. N., Keller W. A., Miller R. A., (1970), *Exp. Cell Res.*, **62**, 338—340.
39. Bajaj Y. P. S., (1974), *Plant Sci. Let.*, **3**, 93—99.
40. Bhojwani S. S., Cocking E. C., (1972), *Nature, New Biology*, **239**, 29—30.
41. Takebe I., Labib G., Melchers G., (1971), *Naturwissenschaften*, **58**, 318—320.
42. Meyer Y., Abel W. O., (1975), *Planta*, **123**, 33—40.

43. Ohyama K., Nitsch J. P., (1972), *Plant Cell Physiol.*, **13**, 229—237.
44. Kao K. N., Gamborg O. L., Michayluk M., Miller R. A., (1973), *Coll. Internat. C.N.R.S.*, **212**, 207—213.
45. Durand J., Potrykus I., Donn G., (1973), *Z. Pflanzenphysiol.*, **69**, 26—34.
46. Potrykus I., (1973) w *Yeast, Mould and Plant Protoplasts*, red. Villanueva J. R., Garcia-Acha I., Goscón S., Uruburu F., str. 319—332, Academic Press, London, New York.
47. Nitsch J. P., Nitsch C., (1969), *Science*, **163**, 85—87.
48. Morel G., Bourgin J. P., Chapeau Y., (1973) w *Yeast, Mould and Plant Protoplasts*, red. Villanueva J. R., Garcia-Acha I., Gascón S., Uruburu F., str. 333—344, Academic Press, London, New York.
49. Power J. B., Commins S. E., Cocking E. C., (1970), *Nature*, **225**, 1016—1018.
50. Potrykus I., (1971), *Nature, New Biology*, **231**, 57—58.
51. Carlson P. S., Smith H. H., Dearing R., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2292—2294.
52. Giles K. L., (1972), *Plant Cell Physiol.*, **13**, 207—210.
53. Kameya T., (1973), *Planta*, **115**, 77—82.
54. Hartman J. X., Kao K. N., Gamborg O. L., Miller R. A., (1973), *Planta*, **112**, 45—57.
55. Kameya T., Takahashi N., (1972), *Jap. J. Genetics*, **47**, 215—217.
56. Withers L. A., Cocking E. C., (1972), *J. Cell Sci.*, **11**, 59—75.
57. Erikson T., (1970), *Coll. Internat. C.N.R.S.*, **193**, 297—302.
58. Reinert J., Hellmann S., (1971), *Naturwissenschaften*, **58**, 419.
59. Kao K. N., Constabel F. F., Michayluk M. R., Gamborg O. L., (1974), *Planta*, **120**, 215—227.
60. Ito M., (1973), *Plant Cell Physiol.*, **14**, 865—872.
61. Kao K. N., Michayluk M. R., (1974), *Planta*, **115**, 355—367.
62. Burgess J., Fleming E. N., (1974), *Planta*, **118**, 183—191.
63. Keller W. A., Harvey B., Gamborg O. L., Miller R. A., Eveleigh D. I., (1970), *Nature*, **226**, 280—282.
64. Wallin A., Glimelius K., Erikson T., (1974), *Z. Pflanzenphysiol.*, **74**, 64—80.
65. Constabel F., Kao K. N., (1974), *Can. J. Bot.*, **52**, 1603—1608.
66. Rennie P. J., Kirkpatrick J. W., Constabel F., (1975), *Can. J. Bot.*, **53**, 272—278.
67. Melchers G., Labib G., (1974), *Mol. Gen. Genet.*, **135**, 277—294.
68. Kartha K. K., Gamborg O. L., Constabel F., Kao K. N., (1974), *Can. J. Bot.*, **52**, 2435—2436.
69. Power J. B., Cocking E. C., (1970), *J. Exp. Bot.*, **21**, 64—70.
70. Potrykus I., (1973), *Z. Pflanzenphysiol.*, **70**, 364—366.
71. Potrykus I., Hoffman F., (1973), *Z. Pflanzenphysiol.*, **69**, 287—289.
72. Bonnett H. T., Erikson T., (1974), *Planta*, **120**, 71—79.
73. Hoffmann F., Hess D., (1973), *Z. Pflanzenphysiol.*, **69**, 81—83.
74. Ohyama K., Gamborg O. L., Miller R. A., (1972), *Can. J. Bot.*, **50**, 2077—2080.
75. Davey M. R., Cocking E. C., (1972), *Nature*, **239**, 455—456.
76. Cocking E. C., Pojnar E., (1969), *J. Gen. Virol.*, **4**, 305—313.
77. Motoyoshi F., Watts J. W., Bankroft J., (1974), *J. Gen. Virol.*, **25**, 245—256.
78. Otsuki Y., Takebe I., Honda Y., Kajita S., (1974), *J. Gen. Virol.*, **22**, 375—385.

79. Burgess J., Motoyoshi F., Fleming E. N., (1973), *Planta*, **111**, 199—209.
80. Coutts R. M. A., Cocking E. C., Kessanis B., (1972), *J. Gen. Virol.*, **17**, 289—294.
81. Motoyoshi F., Bankroft J. B., Watts I. W., Burrgeß J., (1973), *J. Gen. Virol.*, **20**, 177—193.
82. Burgess J., Motoyoshi F., Fleming E. N., (1974), *Planta*, **117**, 133—144.
83. Burgess J., Motoyoshi F., Fleming E. N., (1973), *Planta*, **112**, 323—332.
84. Sugimura Y., Ushiyama R., (1975), *J. Gen. Virol.*, **29**, 93—98.
85. Motiyoshi F., Oshima N., (1975), *J. Gen. Virol.*, **29**, 81—91.
86. Beier H., Bruening G., (1975), *Virology*, **64**, 272—276.
87. Hibi T., Rezelman G., Yan Kammen A., (1975), *Virology*, **64**, 308—318.
88. Ryser H., (1967), *Nature*, **215**, 934—936.
89. Otsuki Y., Takebe I., Honda Y., Matsui C., (1973), *Virology*, **49**, 188—194.
90. Cocking E. C., (1966), *Planta*, **68**, 206—214.
91. Wegmann K., Mühlbach H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 79—82.
92. Ku S. B., Guterres M., Kanai R., Edwards G. E., (1974), *Z. Pflanzenphysiol.*, **72**, 320—337.
93. Guterres M., Kanai R., Huber S. C., Ku S. B., Edwards G. E., (1974), *Z. Pflanzenphysiol.*, **72**, 305—319.
94. Mayne B. C., Dee A. M., Edwards G. E., (1975), *Z. Pflanzenphysiol.*, **74**, 275—292.
95. Sakai F., Takebe I., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **224**, 531—540.
96. Wasilewska L. D., Kleczkowski K., (1974), *FEBS Letters*, **44**, 164—168.
97. Mäder M., Mayer Y., Bopp M., (1975), *Planta*, **122**, 259—268.

Redakcja dwumiesięcznika „Diagnostyka Laboratoryjna” uprzejmie informuje, że w numerze 2 tomu XII 1976 ukazały się następujące prace:

1. W 60-lecie urodzin Profesora Jerzego Homolki.
2. K. Olech, J. Maruchin — Rewertaza.
3. B. Sawicka — Znaczenie diagnostyczne oznaczania protoporfiryny i ferrytyny w niedokrwistościach z niedoboru żelaza.
4. M. Uchacz, T. Borkowski — Rybonukleaza kwaśna i zasadowa w leukocytach prawidłowych i białaczkowych.
5. K. Markiewicz, W. Lutz, A. Szeszko — Badania chromatograficzne składu lipidowego soku żołądkowego ludzi zdrowych w warunkach wydzielania podstawowego.
6. M. Doleżał, B. Pawlik, A. Budak — Badania nad oceną właściwości antygenowych szczepów *Aspergillus fumigatus* w świetle ich przydatności w odczynie precypitacji w żelu.
7. W. Bolanowska, E. Szunejko — Oznaczanie digoksyny w surowicy metodą hamowania wchłaniania rubidu (^{86}Rb) przez krwinki czerwone krwi ludzkiej.
8. Z. Hertel, J. Janecki — Oznaczanie frakcji białek surowicy mikroelektroforezą na octanie celulozy.
9. H. Berbeć — Uproszczona metoda oznaczania serotoniny we krwi ludzi.
10. K. Adamkowski, I. Cichocka — Prosta i szybka metoda zagęszczania płynów biologicznych.
11. W. Lutz — Modyfikacja metody Duncome'a oznaczania wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi.
12. J. Borysiewicz — Przyrząd do mierzenia strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów przy oznaczaniu lekowrażliwości metodą krążkową.

KRZYSZTOF BAŃKOWSKI *

Dynamika cząsteczkowa związków naturalnych wyznaczana z badań relaksacji spinowo—sieciowej jąder węgla ^{13}C

Molecular Dynamics of Natural Compounds as Determined by Carbon-13 Spin—Lattice Relaxation Time Studies

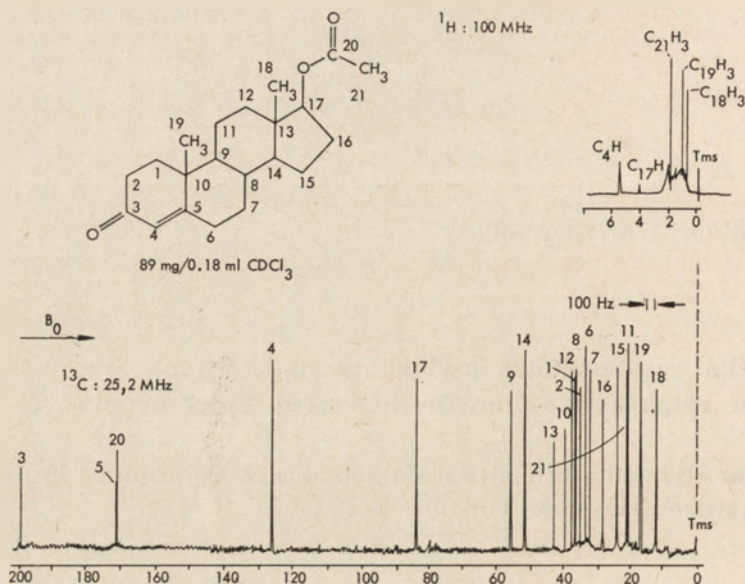
Wstęp

Niezwykłe dynamicznie rozwijająca się w ostatnich latach gałąź spektroskopii — spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego węgla ^{13}C (cmr — *carbon magnetic resonance*) — stanowi jedną z najbardziej obiecujących metod badania substancji naturalnych. Ilość informacji uzyskiwana z widm cmr odnośnie struktury związków organicznych jest znacznie większa niż z widm protonowego rezonansu magnetycznego — dotyczy to zwłaszcza dużych związków bioorganicznych. Podstawy spektroskopii cmr zostały opisane w kilku monografiach (1—3); pojawiły się również artykuły przeglądowe o zastosowaniu spektroskopii cmr w badaniach związków naturalnych (4) oraz w badaniach budowy peptydów i białek (5).

Zastosowanie spektrometrów impulsowych wyposażonych w transformację fourierowską (FT) umożliwia uzyskanie czytelnych widm złożonych związków. Dzięki dużemu zróżnicowaniu położenia sygnałów od węgla (około kilkunastu razy szerszy zakres występowania sygnałów niż dla protonów) w widmach nawet tak dużych cząsteczek jak sterydy, alkaloidy czy też peptydy każdy sygnał pochodzi na ogół od innego atomu węgla. Ponieważ widma rejestruje się zwykle w warunkach odsprzęgania od protonów linie rezonansowe węgla pojawiają się w postaci ostrych singletów. Przykładem niech będzie widmo cmr octanu kortizonu (Ryc. 1). Dla porównania w górnej części rysunku zamieszczono, w tej samej skali,

* Dr, Pracownia Peptydów Instytutu Podstawowych Problemów Chemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, Pasteura 1, 02-093 Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: Cmr — magnetyczny rezonans jądrowy węgla ^{13}C ; FT — transformacja fourierowska; T_1 — czas relaksacji spinowo-sieciowej (podłużnej).



Ryc. 1. Widmo cmr i pmr octanu kortizonu (62)

widmo protonowego rezonansu tego samego związku; jasno widać zdecydowanie większą czytelność widma cmr.

Rozszyfrowanie tak uzyskanego widma polega na przyporządkowaniu poszczególnych sygnałów odpowiednim atomom węgla w cząsteczce. Przypisać dokonuje się w oparciu o tablice korelacyjne przesunięć chemicznych podawane w monografiach (1—3) i artykułach oryginalnych, w oparciu o atlas widm cmr czy też analizując widma cmr serii podobnych związków. Z położenia sygnałów od węgli rozpatrywanej cząsteczki można wyciągnąć szereg ważnych informacji o jej budowie. Z kolei widma cmr nieznanymi związkami ułatwiają ich identyfikację. Nie jest to jednak jedyne zastosowanie spektroskopii cmr. Dzięki wprowadzeniu techniki impulsowej stało się możliwe i stosunkowo proste wyznaczenie czasów relaksacji spinowo-sieciowej (podłużnej) T_1 poszczególnych jąder węgla w cząsteczce. Parametr ten ma bardzo duże znaczenie diagnostyczne. Jak przedstawiono niżej, znajomość czasów T_1 dostarcza wielu cennych informacji o dynamice cząsteczkowej związków organicznych. Informacje te dotyczą zarówno ruchliwości cząsteczek jako całości w roztworze, jak również ruchliwości wewnątrzcząsteczkowej, tj. ruchliwości poszczególnych grup, czy też większych fragmentów cząsteczek. Często są to informacje, których nie można było dotąd uzyskać innymi metodami fizyko-chemicznymi.

Informacje te stwarzają możliwość: rozstrzygania czy cząsteczki lub ich fragmenty mają budowę zwartą czy nieuporządkowaną (w przypadku białek możliwe jest śledzenie przejść: łańcuch w stanie przypadkowego zwinięcia \rightleftharpoons heliks); oszacowywania rozmiarów cząsteczki i przewidy-

wania jej kształtu sferycznego; wnioskowania o stopniu agregacji cząsteczek. Pojawiły się również prace dotyczące wykorzystywania informacji płynących z pomiarów czasów T_1 do badania oddziaływań lipidów i białek w złożonych agregatach lipidowo-białkowych, takich jak błony biologiczne.

Spośród wszystkich związków naturalnych najobszerniejsze badania dynamiki cząsteczkowej wykonano w grupie związków peptydowych i białkowych. Widma cmr szeregu hormonów peptydowych zinterpretowano całkowicie i wyznaczono czasy relaksacji T_1 poszczególnych atomów węgla. Tak uzyskany obraz, nazwany „mapą dynamiczną cząsteczki” (4), wzbogaca w istotny sposób wiedzę o własnościach związków biologicznie czynnych.

I. Relaksacja spinowo-sięciowa (podłużna)

Istota zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego polega na absorpcji promieniowania elektromagnetycznego przez jadra atomów magnetycznych (tj. takich, których spin jądrowy $I > 0$; spin jąder ^{13}C tak jak i protonów $I = \frac{1}{2}$) umieszczonych w stałym zewnętrznym polu magnetycznym. Zjawisko rezonansu jądrowego omawiano dokładnie m.in. w *Postęпах Biochemii* (6). W wyniku zaabsorbowania energii ulega zaburzeniu wyjściowe obsadzenie poziomów energetycznych jąder opisane rozkładem Boltzmanna. Początkowy nadmiar jąder o niższym stanie energetycznym zmniejsza się dążąc do jednakowego obsadzenia obu poziomów. Szybkie wyrównanie obsadzenia obu poziomów (tzw. nasycenie) spowodowałoby zanik sygnału, a w praktyce niemożność obserwacji zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego.

Przez relaksację spinowo-sięciową (podłużną) rozumie się proces odprowadzania energii ze zbioru spinów jądrowych znajdujących się na wyższym poziomie energetycznym. Relaksacja spinowo-sięciowa jest więc procesem przeciwdziałającym wystąpieniu nasycenia i umożliwiającym rejestrację i obserwację zjawiska rezonansu jądrowego. Wyznaczany doświadczalnie czas relaksacji spinowo-sięciowej T_1 jest stałą czasową opisującą eksponentyjny powrót jąder do boltzmanowskiego obsadzenia poziomów energetycznych:

$$N = N_0 e^{-t/T_1} \quad (1)$$

gdzie: N — nadmiar jąder na wyższym poziomie energetycznym w czasie t

N_0 — nadmiar jąder na wyższym poziomie energetycznym w czasie $t = 0$

Jak widać ze wzoru (1), po czasie T_1 nadmiar jąder na wyższym poziomie spada do $1/e$ części swej wartości początkowej.

Oddawanie energii w procesie relaksacji spinowo-sieciowej odbywa się wskutek oddziaływania jąder z ich otoczeniem, tzw. siecią. Wszystkie mechanizmy oddziaływania mają jedną wspólną cechę: relaksacja związana jest z istnieniem lokalnych fluktuujących pól magnetycznych w próbce; ich obecność wynika z ruchów cząsteczkowych. Zmiana położenia cząsteczki — w skład której wchodzić przeciw jądra magnetyczne ^1H , ^{13}C — względem zewnętrznego pola magnetycznego H_0 , a więc ruch momentów magnetycznych względem pola H_0 wytwarza fluktuujące pola. Dlatego też czasy T_1 związane są z ruchliwością cząsteczki i pośrednio dostarczają informacji o jej dynamice. Relaksacja jest najbardziej efektywna, czasy T_1 najkrótsze, wówczas jeśli ruch cząsteczki wytwarza lokalne pola magnetyczne fluktuujące z częstościami bliskimi częstościom rezonansowym węgla.

Stwierdzono, że dominującym mechanizmem relaksacji spinowo-sieciowej jest mechanizm dipol-dipol ^{13}C — ^1H ; dotyczy to zwłaszcza węgla połączonych bezpośrednio z protonami. Oznacza to, że energia spinowa odbierana jest przez fluktuujące pola powstające na skutek ruchów momentu magnetycznego połączonego z węglem protonu wokół pola H_0 (7, 8). Co więcej *Allerhand* (9) wykazał, że w dużych cząsteczkach białkowych relaksacja węgla niepołączonych z atomami wodoru odbywa się również głównie wg mechanizmu dipol—dipol ^{13}C — ^1H .

I-1. Czasy relaksacji i czasy korelacji

Przechodząc do bezpośredniego wyciągania wniosków o ruchliwości cząsteczek z wyznaczonych doświadczalnie czasów relaksacji T_1 należy wprowadzić pojęcie efektywnego czasu korelacji τ_{eff} . Czas τ_{eff} jest wielkością charakteryzującą w danych warunkach ruchliwość cząsteczki i określa średni czas, w którym cząsteczka obraca się o kąt 1 radiana (1). Przy założeniu, że relaksacja ma charakter dipolowy, że cząsteczka obraca się w roztworze izotropowo i że nie występują w niej wewnątrzcząsteczkowe ruchy (lub są bardzo powolne w stosunku do ogólnych ruchów cząsteczki w roztworze) przekształcenie równania *Solomona* (10) wiąże czas relaksacji T_1 z czasem korelacji następującą zależnością (7, 11):

$$\frac{1}{T_1} = \frac{N}{10r_{\text{CH}}^6} \frac{h}{2\pi} \gamma_{\text{C}}^2 \gamma_{\text{H}}^2 \left[\frac{\tau_{\text{R}}}{1 + (\omega_{\text{C}} - \omega_{\text{H}})^2 \tau_{\text{R}}^2} + \frac{3\tau_{\text{R}}}{1 + \omega_{\text{C}}^2 \tau_{\text{R}}^2} + \frac{6\tau_{\text{R}}}{1 + (\omega_{\text{C}} + \omega_{\text{H}})^2 \tau_{\text{R}}^2} \right] \quad (2)$$

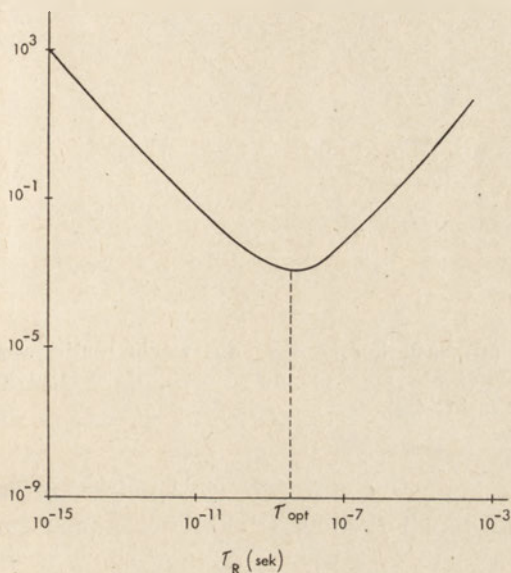
gdzie: N — liczba atomów wodoru bezpośrednio związanych z węglem

γ_{C} , γ_{H} — stosunki żyromagnetyczne węgla ^{13}C i protonu

ω_{C} , ω_{H} — częstości rezonansowe

r_{CH} — długość wiązania C—H

Ponieważ w założeniach zakłada się jako jedyny ruch reorientacje rotacyjne całych cząsteczek, efektywny czas korelacji jest tutaj tzw. czasem korelacji dla reorientacji rotacyjnych τ_R . Z równania (2) widać, że czas relaksacji T_1 jest tym krótszy im więcej protonów połączonych jest z danym węglem (N). Mechanizm przekazywania energii dipol—dipol ^{13}C — ^1H jest bowiem bardziej efektywny. Zależność T_1 od τ_R ilustruje wykres (Ryc. 2).

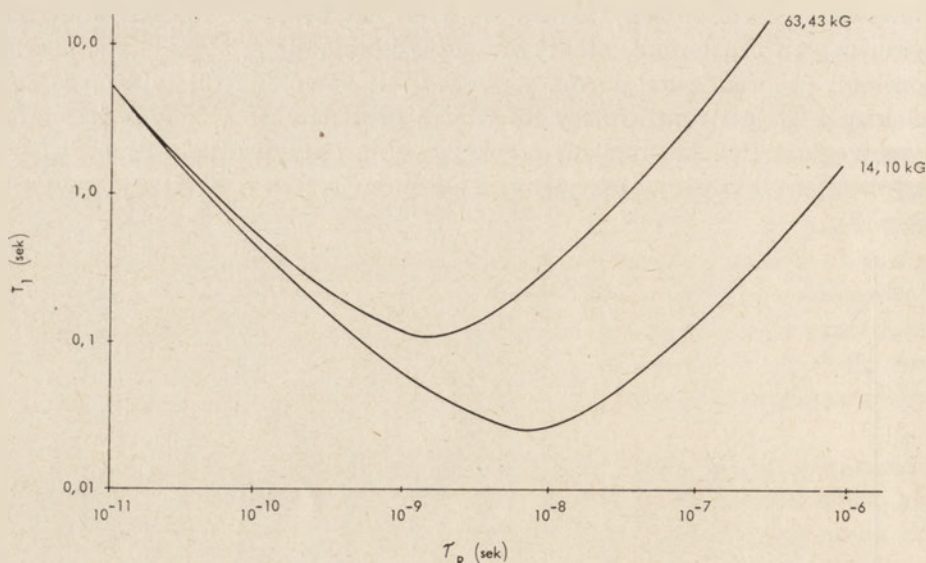


Ryc. 2. Zależność czasu relaksacji T_1 od czasu korelacji τ_R przy natężeniu zewnętrznego pola magnetycznego $H_0 = 23,5 \text{ kG}$ (1).

Z wykresu widać, że jeśli cząsteczka rotuje z szybkością odpowiadającą czasowi korelacji oznaczonemu τ_{opt} (bliskiemu częstości rezonansowej węgla), relaksacja jest najbardziej efektywna i czas T_1 najkrótszy. Szybsze ruchy cząsteczki w roztworze (skracanie czasów τ_R — lewa gałąź krzywej) oraz wolniejsze ruchy cząsteczki w roztworze (wydłużanie czasów τ_R — prawa gałąź krzywej) powodują wydłużanie się czasów relaksacji T_1 .

Zastosowanie spektrometrów dających wyższe natężenia zewnętrznego pola magnetycznego H_0 (co jest niezwykle korzystne gdyż powoduje często rozdzielanie nakładających się sygnałów) zmienia nieco przebieg krzywej T_1 od τ_R (Ryc. 3).

Jak widać, z wyznaczonej doświadczalnie wartości T_1 można bezpośrednio obliczyć (bądź odczytać z krzywej) czas korelacji ilustrujący szybkość rotacji cząsteczki. Z rycin 2,3 wynika jasno, że jednej wartości T_1 odpowiadają dwa rozwiązania na τ_R . Aby rozstrzygnąć, które z nich jest prawidłowe należałoby (12, 13) wyznaczyć czasy T_1 na dwóch różnych przyrządach o różnym natężeniu H_0 lub wielkość jądrowego efektu Overhausera (NOE) albo też czas relaksacji poprzecznej T_2 gdyż parametry te (NOE, T_2) zależą w znany sposób od τ_R .



Ryc. 3. Zależność czasu relaksacji T_1 od czasu korelacji τ_R dla węgla metinowego ($r = 1,09 \text{ \AA}$) przy dwóch wartościach natężenia pola magnetycznego, $H_0 = 14,10 \text{ kG}$ i $63,43 \text{ kG}$ (14).

Na szczęście nie zawsze jest to konieczne. Okazało się bowiem, że zazwyczaj spełniony jest warunek szybkich ruchów w skali rezonansu cmr tj.

$$(\omega_H + \omega_C)\tau_{\text{eff}} \ll 1 \quad (3)$$

Inaczej mówiąc: szybkości ruchów cząsteczkowych są na tyle duże (czasy korelacji na tyle krótkie), że w praktyce pracuje się na ogół na lewej gałęzi krzywej (nawet na spektrometrach o mocy $67,9 \text{ MHz}$ (14)). Oznacza to, że w praktyce wydłużenie się czasów relaksacji T_1 świadczy o wzroście ruchliwości cząsteczki. Jedynie w przypadkach pewnych polimerów lub polipeptydów o zwartej budowie zaobserwowano takie spowolnienie ruchów cząsteczkowych, że czasy korelacji wypadają na prawej gałęzi krzywej (patrz dalej: gramicydyna A, polipeptydy i białka).

Jeśli fragmenty cząsteczki (np. pewna grupa atomów) wykazują wzmoczoną ruchliwość np. wskutek szybkich wewnętrznych rotacji lub ruchów segmentowych, to wówczas efektywny czas korelacji dla jąder węgla występujących w tym fragmencie składa się z członu opisującego ruchliwość cząsteczki jako całości (τ_R) i członu opisującego ruchliwość wewnątrzcząsteczkową (τ_G). τ_G nosi nazwę czasu korelacji dla wewnętrznych rotacji:

$$\frac{1}{\tau_{\text{eff}}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_G} \quad (4)$$

Obserwowany czas relaksacji T_1 jest teraz następującą funkcją obu czasów korelacji τ_R i τ_G :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{N}{r_{CH}^6} \frac{h}{2\pi} \gamma_H^2 \gamma_C^2 \tau_R \left[A + B \frac{6\tau_G}{6\tau_G + \tau_R} + C \frac{3\tau_G}{3\tau_G + \tau_R} \right] \quad (5)$$

Oznaczenia jak we wzorze (2) a ponadto A , B , C — stałe związane odpowiednimi zależnościami z kątem pomiędzy wektorem C—H a osią wewnętrznej rotacji.

Jak widać w dalszym ciągu obowiązuje zależność, że wzrost ruchliwości danej grupy atomów (fragmentu cząsteczki) wydłuża czasy relaksacji T_1 jąder węgla znajdujących się w danej grupie. Porównując ruchliwość poszczególnych grup w cząsteczce należy pamiętać, że czas T_1 określonego atomu węgla jest tym krótszy im więcej protonów jest z danym atomem węgla związanych (N). Aby móc bezpośrednio porównywać ruchliwość poszczególnych węgli zazwyczaj podaje się w literaturze wartość NT_1 .

Znajomość wartości τ_R (wyznaczonej z czasów relaksacji T_1 dla węgla nie ulegających wewnętrznym rotacjom wg równania (2)) pozwala wg równań (4), (5) wyznaczyć czas korelacji dla wewnętrznych rotacji τ_G poszczególnych grup w cząsteczce. Tak więc pomiary czasów relaksacji spinowo-sieciowej T_1 pozwalają głęboko wnikać w dynamikę cząsteczkową związków organicznych: możliwe jest obliczanie szybkości rotacji cząsteczek jako całości w roztworze jak również szybkości wewnętrznych rotacji poszczególnych grup.

I-2. Pomiar i porównywanie wartości czasów T_1

W stałym polu magnetycznym H_0 spiny jądrowe niejednakowo obsadzają oba poziomy energetyczne. Niewielki nadmiar spinów jądrowych przyjmuje orientację korzystniejszą energetycznie tj. równoległą do linii sił pola H_0 . Powoduje to wystąpienie makroskopowej magnetyzacji M wzdłuż linii sił pola H_0 . Podanie impulsu (w płaszczyźnie prostopadłej do pola H_0) wywołuje wychylenie wektora M z położenia początkowego, a ponieważ spełniony jest warunek rezonansu, jego precesję wokół kierunku prostopadłego do H_0 . W efekcie zmniejsza się składowa wektora magnetyzacji wzdłuż kierunku pola. Po ustaniu działania impulsu układ wraca do stanu wyjściowego tzn. wektor magnetyzacji narasta wzdłuż kierunku pola do swej wyjściowej wartości. Ta odbudowa wektora magnetyzacji (w ujęciu kwantowym powrót do wyjściowego obsadzenia poziomów energetycznych) zachodzi w wyniku procesów relaksacji spinowo-sieciowej, stąd inna nazwa relaksacja podłużna, i odbywa się ze stałą czasową T_1 .

Pomiar czasu T_1 opiera się na podawaniu do próbki sekwencji różnych impulsów w wyniku czego można obserwować narastanie wektora

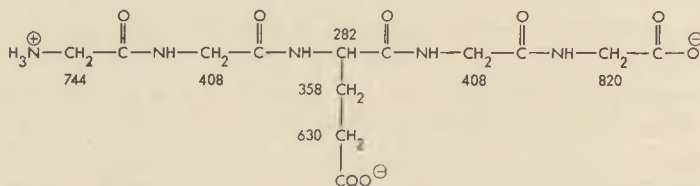
M w czasie poprzez pomiar intensywności wzrostu sygnału rezonansowego węgla. W obu stosowanych technikach pomiaru: technice stopniowego nasykania oraz technice „odwrócenia i powrotu” stosuje się inne sekwencje impulsów, lecz w obu obserwuje się wzrost intensywności sygnału w czasie i z odpowiednich równań oblicza się czas T_1 . Szczegóły można znaleźć w monografiach (1—3) i artykułach specjalistycznych (15, 16). Należy podkreślić, że dokładność wyznaczania czasów T_1 szacuje się na 10—15%. Dokładność taka pozwala jednak na poprawne wnioski o dynamice cząsteczkowej zważywszy duże zróżnicowanie czasów relaksacji T_1 .

Większe niebezpieczeństwo popełnienia błędów występuje przy automatycznym porównywaniu czasów T_1 dla różnych cząsteczek. Rzadko kiedy warunki pomiaru są identyczne a takie czynniki jak temperatura, lepkość roztworu (stężenie) wpływają na ruchliwość cząsteczki, a tym samym na wartości T_1 . Ważne jest również całkowite odgazowanie próbki. W obecności tlenu dochodzi do głosu dodatkowy dipolowy mechanizm relaksacji z niesparowanymi spinami cząsteczki tlenu i czasy T_1 ulegają znacznemu skróceniu.

II. Peptydy

II-1. Syntetyczne peptydy liniowe

Keim i wsp. opisali w cyklu prac (17—19) syntezę, widma cmr i pomiary czasów relaksacji serii pięciopeptydów o budowie: Gly—Gly—X—Gly—Gly gdzie X reszta aminokwasowa różna od Gly. Pomiary czasów T_1 dostarczyły interesujących danych o dynamice wewnątrzcząsteczkowej w liniowych łańcuchach krótkich peptydów. Okazało się, że czasy T_1 dla węgla α w łańcuchu peptydowym rosną w obie strony od centralnego aminokwasu X (Ryc. 4).



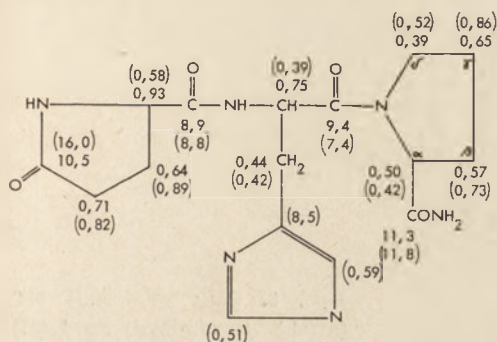
Ryc. 4. Czasy relaksacji NT_1 (msek) w pięciopeptydzie H—Gly—Gly—Glu—Gly—Gly—OH (18).

Wskazuje to na wzrost ruchów rotacyjnych i segmentowych w miarę oddalania się od środka cząsteczki w stronę N- i C-końca. Zróżnicowana ruchliwość łańcucha peptydowego jest cechą charakterystyczną labilnych konformacyjnie liniowych peptydów. W cyklicznych peptydach (patrz dalej) czasy T_1 węgla α mają zbliżone wartości. Inną ogólną cechą krótkich

cząsteczek peptydowych jest wzrost ruchliwości w łańcuchach bocznych aminokwasów w miarę oddalania się od łańcucha głównego. Na rycinie 4 wyraźnie widać wydłużanie się czasów NT_1 przy przechodzeniu od „zakotwiczonego” w łańcuchu głównym węgla α kwasu glutaminowego do węgli β i γ w łańcuchu bocznym.

II-2. Tyreoliberyna

Tyreoliberyna (TRF), czynnik uwalniający tyreotropinę był pierwszym związkiem peptydowym, dla którego wyznaczono czasy T_1 (20) (Ryc. 5).



Ryc. 5. Czasy relaksacji NT_1 (sek) w tyreoliberynie (TRF), 20, 35). W nawiasach dane wg. (21).

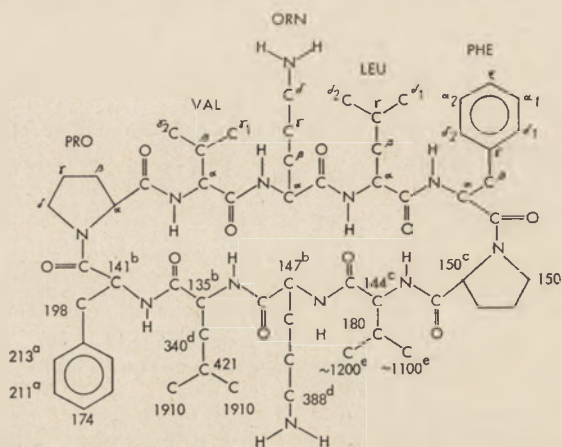
Porównanie czasów T_1 dla węgli α sugeruje, że prolinowy koniec cząsteczki jest mniej ruchliwy niż piroglutaminowy. Pomiar w innym pH (21) wskazują jednak, że ruchliwość reszty proliny i histydyny jest zbliżona. Obliczony z czasu NT_1 dla węgla α histydyny efektywny czas korelacji wynosi $\tau_{\text{eff}} = 1,2 \times 10^{-10}$ sek. Zrozumiałe, że jest on znacznie krótszy niż dla większych, wolniej poruszających się w roztworze i mniej labilnych konformacyjnie, cząsteczek peptydowych.

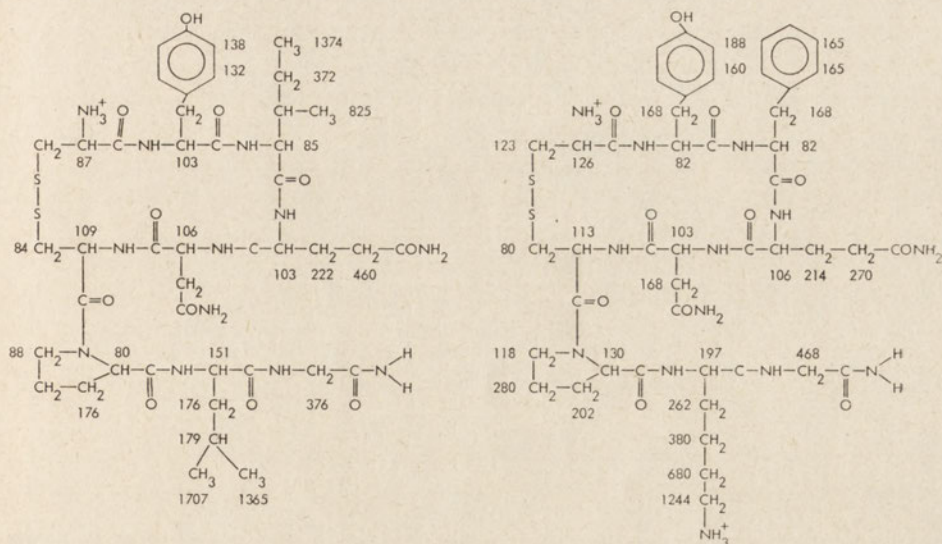
II-3. Melanostatyna

Melanostatyna (MIF), czynnik hamujący uwolnienie melanotropiny (MSH) jest amidem trópeptydu: Pro—Leu—Gly— NH_2 (22). Czasy T_1 dla MIF wyznaczono w dwóch rozpuszczalnikach: dwumetylosulfotlenku (DMSO) i wodzie (D_2O) (23). W wodzie czasy NT_1 są 1—3 razy dłuższe niż w DMSO co wskazuje, że w wodzie cząsteczka jest znacznie bardziej ruchliwa konformacyjnie. Pomiarów czasów T_1 wskazały ponadto, że dwumetyloamid Pro—Leu—Gly— $\text{N}/\text{CH}_{3/2}$ jest bardziej ruchliwy konformacyjnie niż MIF. Mniejsza ruchliwość konformacyjna MIF może wynikać z występowania w tej cząsteczce wiązania wodorowego wewnątrzcząsteczkowego pomiędzy protonem trans amidu glicyny, a grupą karbonylową proliny. Strukturę taką (β —zwój) proponowano poprzednio w oparciu o widma rezonansu protonowego (24).

II-4. Gramicydyna S

Gramicydyna S, antybiotyk będący cyklicznym dziesięciopeptydem o budowie: cyklo (D-Phe—L-Pro—L-Val—L-Orn—L-Leu)₂ jest związkiem, którego konformację badano wieloma metodami fizykochemicznymi (25). Ustalono, że w wielu rozpuszczalnikach gramicydyna S występuje w sztywnej konformacji połańdowanej kartki. Pełne rozszyfrowanie widma cmr gramicydyny S (26) pozwoliło na wyznaczenie czasów NT₁ (14, 27) (Ryc. 6).





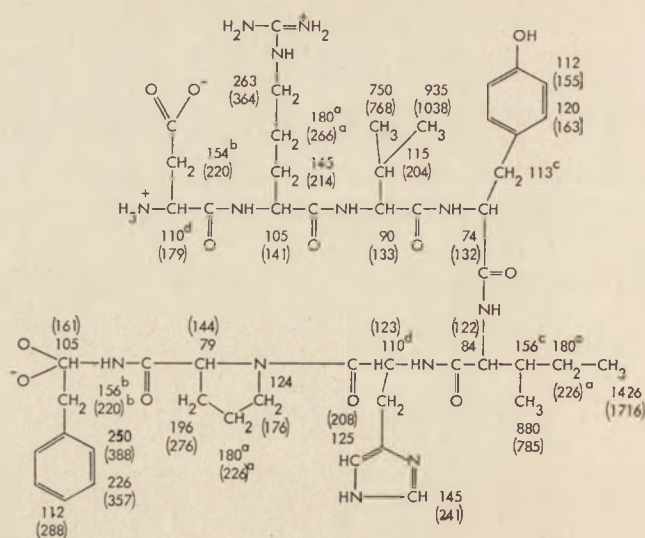
Ryc. 7. Czasy relaksacji NT_1 (msek) w oksytocynie (z lewej) i w lizyno-wazopresynie (29).

Wyznaczony z tej wartości czas korelacji dla reorientacji rotacyjnej $\tau_R = 5 \times 10^{-10}$ sek dobrze odpowiada czasom τ_R innych cząsteczek peptydowych o podobnym rozmiarze.

Interesujące jest, że czasy NT_1 węgli α w łańcuchach bocznych obu hormonów są dłuższe i wzrastają w stronę C—końca. Jest to konsekwencją wzrostu ruchliwości i większą swobodą konformacyjną C—końcowego fragmentu hormonu niż fragmentu pierścieniowego. C—końcowy fragment lizyno-wazopresyny $\sim \text{Pro—Lys—Gly—NH}_2$ jest bardziej ruchliwy niż C—końcowy fragment oksytocyny $\sim \text{Pro—Leu—Gly—HN}_2$. W aminokwasach nienaromatycznych wyraźnie widać wzrost ruchliwości węgli β , γ i dalszych w porównaniu z „zakotwiczonym” w łańcuchu peptydowym węglem α . Stosunki czasów NT_1 w łańcuchu bocznym izoleucyny w oksytocynie są takie same jak w wolnym aminokwasie. Świadczy to o tym, że łańcuch boczny izoleucyny nie oddziałuje z pozostałą częścią cząsteczki. Potwierdza to strukturę β -zwoju proponowaną dla oksytocyny, w której izoleucyna znajduje się w rogu zwoju, a jej łańcuch boczny na zewnątrz cząsteczki (30).

II-6. Angiotensyna II

Deslauriers i wsp. (31) wyznaczyli ostatnio czasy T_1 dla hormonu regulującego ciśnienie krwi (5-izoleucylo)-angiotensyny II oraz dla syntetycznego analogu (5-izoleucylo, 8-leucylo)-angiotensyny II wykazującego przeciwstawne działanie fizjologiczne (Ryc. 8).



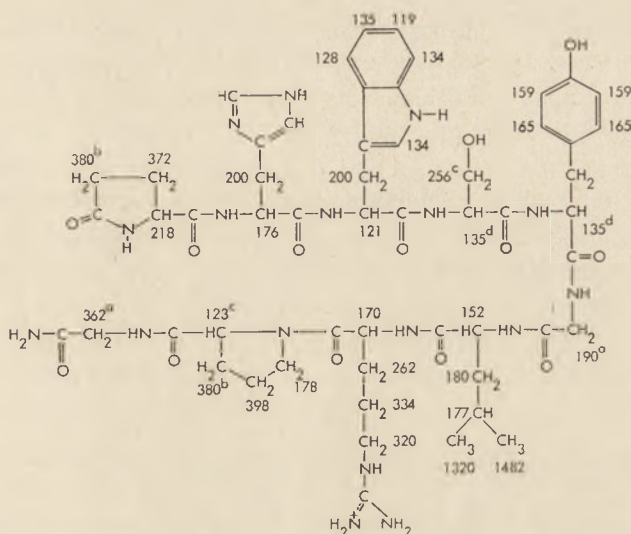
Ryc. 8. Czasy relaksacji NT₁ (msek) w angiotensynie II przy pH 4,5 oraz w nawiasach przy pH 1 (31).

Mimo, że (5-Ile)—angiotensyna II jest liniowym ośmiopeptydem: Asp—Arg—Val—Tyr—Ile—His—Pro—Phe czasy T₁ wskazują na określoną zwartą konformację głównego łańcucha peptydowego. Wszystkie czasy NT₁ węgli α mają zbliżoną wartość 74—110 msek wskazując na brak gradacji w ruchach segmentowych typowej dla konformacyjnie swobodnych liniowych peptydów. Zakładając izotropowy ruch cząsteczki można obliczyć czas korelacji dla rotacyjnej reorientacji $\tau_R = 5,3 \times 10^{-10}$ sek zbliżony do czasów τ_R sztywnego pierścienia oksytocyny i lizyno-wazopresyny.

Zaproponowano szereg modeli opisujących konformację angiotensyny II m.in. sfaldowaną strukturę — β (32). Według Deslauriers (31) hipotezę tę należy odrzucić gdyż takiej strukturze odpowiadałby czas τ_R około $1-2 \times 10^{-9}$ sek. Obserwowany czas τ_R odpowiada modelowi przedstawiającemu angiotensynę II jako upakowaną pseudo-kulistą cząsteczkę. Nie można narazie ustalić czy w cząsteczce występuje konformacja β-zwoju, γ — zwoju lub też jeszcze inna czy też ma miejsce (jak to proponowano (33)) szybka równowaga między różnymi konformacjami. W (5-Ile, 8-Leu)-angiotensynie II czasy NT₁ dla C^α węgli są nieco dłuższe co może wskazywać na pewne rozluźnienie konformacji łańcucha głównego.

II-7. Luliberyna

Budowa luliberyny (LH—RF) została ustalona (34) i potwierdzona przez syntezę chemiczną stosunkowo niedawno. Związek ten jest amide dziesięciopeptydu o sekwencji: pGlu—His—Trp—Ser—Tyr—Gly—Leu—Arg—Pro—Gly—NH₂. Widmo cmr hormonu zarejestrowano już



Ryc. 9. Czasy relaksacji NT_1 (msek) w luliberynie (LH-RF) (36).

dawniej (35), a ostatnio wyznaczono dla poszczególnych węgli cząsteczki czasy T_1 (36) (Ryc. 9).

Jak widać z przytoczonych danych, czasy NT_1 dla węgli łańcucha głównego są zróżnicowane i najdłuższe dla aminokwasów na końcu łańcucha. Są one ponadto dłuższe od czasów NT_1 węgli łańcucha głównego w mniejszych lecz sztywnych cząsteczkach (oksytocyna, gramicydyna S). Wskazuje to na znaczny wzrost ruchów segmentowych w łańcuchu peptydowym. Ponieważ ponadto daje się zaobserwować wzrost ruchliwości w łańcuchach bocznych aminokwasów niearomatycznych cząsteczkę luliberyny należy uznać za bardzo ruchliwą konformacyjnie. Niełatwo więc będzie proponowanie konformacji odpowiedzialnej za oddziaływanie z receptorem.

II-8. Gramicydyna A

Antybiotyk gramicydyna A jest liniowym peptydem o następującej sekwencji: formylo-L-Val—Gly—L-Ala—D-Leu—L-Ala—D-Val—(L-Trp—D-Leu)₃—L-Trp—etanoloamid (37). Ułatwia on przenikanie kationów metali alkalicznych oraz kationu wodorowego przez naturalne i sztuczne błony lipidowe. Istnieją dowody, że gramicydyna A tworzy tunel w poprzek błony i że w tworzeniu tunelu uczestniczą dwie cząsteczki gramicydyny A (38). W cyklu prac Veatcha i Blouta (39—41) ustalono, że w roztworze DMSO gramicydyna A występuje jako monomer w formie przypadkowego zwinięcia podczas gdy w metanolu tworzy uporządkowaną formę podwójnego heliksu.

Pomiary czasów relaksacji (41) w pełni potwierdziły te ustalenia. Mimo, że czasy NT_1 węgli α gramicydyny A w obu rozpuszczalnikach są

zbliżone, to czasy korelacji są zasadniczo różne. Okazało się bowiem, że czasy T_1 węgla α w DMSO leżą na lewej gałęzi krzywej (Ryc. 2) natomiast w metanolu na prawej co oznacza, że w metanolu cząsteczka jest mniej ruchliwa. Wprowadzając poprawkę na różną lepkość obu rozpuszczalników wyznaczono, że czas τ_R węgla α gramicydyny A w DMSO waha się w przedziale 0,35—1 nsek. Odpowiada to dobrze czasom korelacji wyznaczonym dla syntetycznych kopoliptydów występujących w formie przypadkowego zwinięcia. W roztworze metanolowym następuje uporządkowanie struktury w formę podwójnego heliksu co wskutek zmniejszenia ruchliwości łańcucha peptydowego powoduje wydłużenie czasów τ_R . Dla węgla α gramicydyny A w metanolu τ_R wynosi około 25 nsek.

II-9. Konformacyjna ruchliwość pierścienia prolinowego w peptydach

Z przytoczonych danych widać, że czasy NT_1 różnych węgli pierścienia prolinowego w hormonach peptydowych są różne. Ich różna ruchliwość wyjaśniona jest szybkimi zmianami konformacyjnymi pomiędzy różnymi formami pofałdowanego pierścienia pirolidynowego (42).

W TRF czasy T_1 są najdłuższe dla β - i γ -węgli pierścienia proliny (oznaczenia atomów w pierścieniu zaznaczono na rycinie 5). Wskazuje to na interkonwersję pierścienia i na to, że dominujące konformery mają budowę „półkrzesła”. Podobne i znacznie krótsze czasy T_1 β - i δ -węgli w TRF, oksytocynie, lizyno-wazopresynie, (Ile⁵)—angiotensynie II i LH—RF wskazują na zahamowanie ruchliwości tych węgli wywołane bliskim sąsiedztwem głównego łańcucha peptydowego. Podobny efekt obserwowano w gramicydynie S (27) i modelowych liniowych peptydach (19).

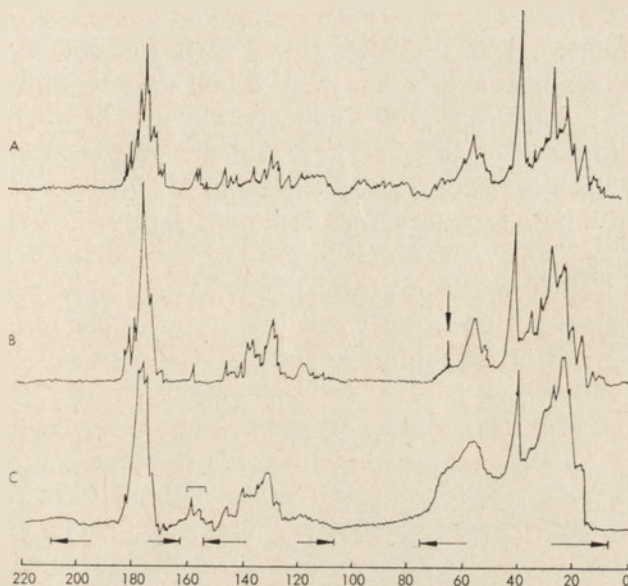
W czynniku MIF najdłuższy czas T_1 posiada γ -węgiel. Tłumaczy się to interkonwersją pierścienia i szybkim przemieszczaniem się grupy γ -CH₂ z położenia exo w endo (i odwrotnie) względem grupy karbonylowej (23, 42).

III. Polipeptydy i białka

Widma cmr białek są zbyt skomplikowane, aby była możliwa pełna ich interpretacja w sensie dokładnego przyporządkowania sygnałów atomom węgla w tym a nie innym miejscu łańcucha polipeptydowego. Typowy obraz widma cmr białka przedstawia rycina 10.

Jak widać w odpowiednich przedziałach pojawiają się sygnały rezonansowe od węgli alifatycznych (dają się wyodrębnić sygnały od węgla α łańcucha głównego), od węgli aromatycznych oraz karbonylowych. Pomiar czasu relaksacji można więc przeprowadzać bądź na grupie sygnałów, bądź dla niektórych dających się łatwo wyłowić z widma pojedyn-

czych sygnałów np. dla nie połączonych z protonami węgli aromatycznych (9). Innym podejściem do badania dynamiki układów białkowych są pomiary czasów T_1 w poliaminokwasach i polipeptydach o powtarzającej się sekwencji aminokwasów. W tych modelowych związkach ilość różnych atomów węgla jest nieduża i ich widma łatwo jest zinterpretować.



Ryc. 10. Widma cmr białek: A—ferrocytochromu c z serca konia, B—mioglobiny konia + CO, C—ludzkiej hemoglobiny + CO (9).

Jeszcze inne podejście polega na wprowadzaniu w określone położenie cząsteczki białka grupy zawierającej atomy węgla ^{13}C .

W jednej z wczesnych prac Allerhand i wsp. (43) wyznaczyli czasy T_1 dla natywnej i zdenaturowanej formy rybonukleazy I (E.C. 3.1.4.22). Czasy T_1 były znacznie krótsze (czasy korelacji około 100 razy dłuższe) dla natywnego enzymu. Wskazuje to na bardziej zwartą strukturę formy natywnej. Szczególnie przydatne do badania zmian konformacyjnych jest rozpatrzenie czasów T_1 węgli α . W natywnym białku trzeciorzędowa struktura warunkuje konformację wszystkich węgli łańcucha głównego. Ruchy segmentowe są niewielkie; czasy T_1 wszystkich węgli α mają zbliżoną wartość (dla rybonukleazy I—35msek (8)). Po zdenaturowaniu, rozluźnieniu struktury wzmagają się ruchy rotacyjne i segmentowe i są one różne w różnych częściach cząsteczki; czasy T_1 są dłuższe i bardziej zróżnicowane (dla rybonukleazy I 82—107msek). Zróżnicowanie czasów T_1 węgli α i ich długość (50—100msek) stanowi dowód na występowanie białka w postaci przypadkowego zwinięcia. Przykładem może być żelatyna: w białku tym czasy T_1 węgli α wahają się od 55—120 msek (44).

Przejdzie z formy łańcucha w stanie przypadkowego zwinięcia w zawar-

tą formę heliksu prowadzi zazwyczaj do wyraźnego skrócenia czasów T_1 . Przykładem niech będzie skracanie się czasów T_1 wszystkich węgli w poli-L-lizynie przy pH 11 (przy tej wartości pH ma miejsce przemiana łańcuch zwinięty przypadkowo \rightarrow heliks). Efektu tego nie obserwuje się dla (L-Liz)₁₂, co świadczy o tym, że ten oligopeptyd nie tworzy struktury heliksu (35, 45).

Wnioskowanie oparte jedynie na porównaniu czasów T_1 może być zawodne. Wykazano, że czasy T_1 węgli α poli (L-glutaminianu γ -benzylowego, w formie łańcucha o przypadkowym zwinięciu i heliksu są zbliżone. Wynika to z faktu, że czasy korelacji dla obu form znajdują się na różnych gałęziach krzywej (Ryc. 2). Dlatego też dopiero porównanie czasów korelacji daje właściwy obraz dynamiki cząsteczkowej białka. Efektywny czas korelacji wynosi dla węgla α w formie łańcucha o przypadkowym zwinięciu 0,8nsek, a dla formy heliksu 24—32 nsek (13). Czasy korelacji rzędu 0,1—1nsek dla węgli α są typowe dla formy łańcucha o przypadkowym zwinięciu: gramicydyna A 0,35—1nsek (41), poli(L-Pro) i poli(L-Pro—Gly) 0,3—0,6nsek (46), 36-aminokwasowy fragment kolagenu 0,14—0,45nsek (47). Ponieważ w strukturach uporządkowanych (natywne formy białek) ruchy segmentowe nie występują lub są niewielkie efektywny czas korelacji jest tutaj czasem korelacji dla reorientacji rotacyjnych $\tau_{\text{eff}} = \tau_R$ i odzwierciedla ruchy cząsteczki białka w roztworze. Są one oczywiście wolniejsze (czasy τ_R dłuższe) dla dużych białek, np. dla hemoglobiny ludzkiej (c. częst. 64500) $\tau_R = 47$ nsek, a dla cytochromu c, lizozymu, mioglobiny, cyjanoferrimioglobiny (c. częst. 12 000—18 000) τ_R wynosi odpowiednio 17, 20, 19, 22nsek (9, 48). Wyniki te dobrze zgadzają się z czasami korelacji wyznaczonymi dla kilku białek techniką fluorescencji polaryzacyjnej (49).

Łatwo obserwowalnym sygnałem w widmie cmr białek jest sygnał pochodzący od węgla grupy guanidylowej reszty argininy. Pomiar czasu T_1 dla tego węgla wskazuje na brak lub udział ruchów wewnętrznych w łańcuchu bocznym argininy w białku. Brak ruchów rotacyjnych zaobserwowano np. dla reszty argininy w cyjanoferricytochromie c (9). W kilku pracach doniesiono o pomiarach czasów T_1 dla aromatycznych atomów węgla i wskazano na ich małą ruchliwość w cząsteczce białka. W parwalbuminie białku, któremu przypisuje się funkcję kontroli procesów regulowanych stężeniem jonów Ca^{2+} zaobserwowano wyraźne zmiany w części aromatycznej widma po usunięciu jonów Ca^{2+} z kompleksu białko— Ca^{2+} . Największe zmiany przesunięć chemicznych i czasów relaksacji wystąpiły na węglu γ fenyloalaniny. Usunięcie jonów Ca^{2+} zaburza helikalną strukturę białka co jest najbardziej widoczne na najbliższym w stosunku do łańcucha głównego atomie węgla γ . Dalsze węgle pierścienia aromatycznego pozostają ściśle upakowane w hydrofobowym rdzeniu białka i ich czasy relaksacji nie ulegają zmianie.

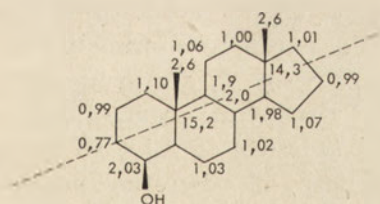
Brown e i wsp. (51) wprowadzili na drodze biosyntezy znaczoną

węglem ^{13}C w położeniu 2 histydynę do α -podjednostki syntetazy tryptofanu. Pomiary czasów relaksacji wskazały, że wszystkie cztery reszty histydyny występujące w białku mają ten sam czas korelacji. Jego wielkość (27nsek) zbliżona do czasów korelacji dla reorientacji rotacyjnych całych cząsteczek białkowych wskazuje na to, że wszystkie reszty histydyny są ściśle ulokowane w białku i nie wykazują większej swobody rotacji niż cała cząsteczka. Analogicznie pomiary czasów relaksacji dla węgla ^{13}C w położeniu 2 histydyny w alkalicznej proteazie z *Mycobacterium sorangium*, E.C.3.4.99.13. (ang. α -lytic protease) wskazały na sztywne umiejscowienie histydyny w katalitycznej triadzie —Asp—His—Ser— w całym przedziale pH w którym białko wykazuje aktywność enzymatyczną (52).

IV. Steroidy

Mimo, że wykonano już widma cmr dla wielu steroidów czasy T_1 wyznaczono sporadycznie i jedynie w celu ułatwienia dokonania pełnej identyfikacji sygnałów. Allerhand i wsp. (7) wykazali, że czasy NT_1 dla wszystkich węgli grup CH_2 i CH w pierścieniach w chlorku cholesterolu mają zbliżoną wartość. Wg autorów świadczy to o izotropowym ruchu całej cząsteczki. Wyznaczony z tej wartości NT_1 czas korelacji (wg równania (2)) powinien być „czystym” czasem korelacji dla rotacyjnej reorientacji cząsteczki.

Wynik ten zakwestionowali ApSimon i wsp. (53). Wyznaczyli oni czasy NT_1 dla serii pochodnych androstanu i cholestanu i stwierdzili, że w wielu związkach (szczególnie w serii androstanu) czas NT_1 węgla C—3 jest wyraźnie krótszy niż dla pozostałych sztywnych węgli pierścieniowych (Ryc. 11).



Ryc. 11. Czasy relaksacji NT_1 (sek) w 4- β -androstanolu z zaznaczoną główną osią obrotu cząsteczki (53).

Wynik ten można wyjaśnić anizotropowością ruchów cząsteczek steroidowych w roztworze. Wiadomo bowiem, że jeśli cząsteczka obraca się w roztworze anizotropowo tj. jeśli istnieją preferowane osie obrotu cząsteczki, to czasy NT_1 dla węgli leżących na tych osiach lub w ich pobliżu są krótsze niż dla węgli oddalonych od osi (1). W steroidach główna oś obrotu przechodzi przez węgiel C—3 (Ryc. 11) i dlatego czas T_1 dla węgla C—3 ulega skróceniu.

Mimo tego z czasów relaksacji pozostałych sztywno ulokowanych w

pierścieniach węgla można wyznaczyć czas korelacji dla rotacyjnej reorientacji (τ_R) cząsteczek steroidowych. Znajomość τ_R umożliwia wyznaczenie, np. dla swobodnie rotujących grup metylowych, czasów korelacji dla wewnętrznych rotacji τ_G (wg równania (5)). Wartość τ_G dostarcza informacji o szybkościach rotacji grup, barierach rotacji oraz subtelnych oddziaływaniach konformacyjnych wewnątrz cząsteczki. Ponadto wydłużanie się czasów NT_1 w łańcuchu bocznym C—24 — C—27 można wytłumaczyć rosnącym udziałem ruchów segmentowych (53, 54).

V. Lipidy

Pomiary czasów relaksacji T_1 określonych atomów węgla cząsteczek lipidowych wchodzących w skład lipoproteidów i błon komórkowych są pomocne w rozważaniach dotyczących oddziaływań lipid—lipid, lipid—białko oraz przy wnioskowaniu odnośnie molekularnej organizacji tych struktur.

Stoffel i wsp. (55) otrzymali znaczone węglem ^{13}C fosfolipidy: fosfatydylocholinę i sfingomielinę. Znaczone atomy znajdowały się w hydrofilowej części cząsteczki (węgiel grupy N-metylowej cholicy) i w części hydrofobowej (określone atomy węgla w łańcuchu kwasu olejowego i linolowego). Stwierdzono, że czasy T_1 dla węgla C—3, C—8, C—11 kwasu olejowego i C—1, C—3, C—14 kwasu linolowego gwałtownie maleją po wprowadzeniu tych kwasów do lecytyny w położeniu 2, lub jako grupy N-acylowej do sfingomieliny. Świadczy to o zahamowaniu ruchów wewnętrznych w całym łańcuchu węglowodorowym. Inaczej jest jeśli kwasy te przyłączają się estrowo do cholesterolu. Zmniejsza się wówczas tylko ruchliwość węgla położonych w bezpośrednim sąsiedztwie cholesterolu. Pomiary czasów T_1 w fosfolipidach rozpuszczonych w chloroformie i zawieszonych w wodzie (struktury liposomalne) dostarczyły informacji o budowie micelli fosfolipidowych. Stwierdzono, że czasy T_1 dla grupy CH_3 -cholicy w fosfolipidach są znacznie krótsze dla roztworu organicznego — $CHCl_3$ (196msek) niż w wodzie (428msek). Potwierdza to fakt, że fosfolipidowe micelle mają w rozpuszczalniku organicznym „odwrotną” budowę w porównaniu do roztworu wodnego. W rozpuszczalniku organicznym grupy jonowe skierowane są do wewnątrz micelli, a hydrofobowe na zewnątrz. Silne oddziaływanie jonowych grup metyloamoniowych ze sobą hamuje ich ruchy swobodne a to prowadzi do skrócenia czasu T_1 (55). Badania relaksacyjne potwierdziły również wywnioskowany z badań metodą znaczników spinowych obraz uporządkowanej i nieuporządkowanej struktury łańcuchów węglowodorowych w dwuwarstwie lipidowej. Stwierdzono (56) liniowe zmniejszanie się parametru uporządkowania od grupy kwasowej kwasu tłuszczowego przyłączonego do gliceryny (w fosfo-

glicerydach) do końcowej grupy metylowej. Ponadto stwierdzono, że ruchliwość konformacyjna w końcowych częściach różnych kwasów tłuszczowych w lipidach jest różna, np. w kwasie linolowym jest ona większa niż w olejowym (55).

Bardzo ciekawych informacji dostarczyły pomiary czasów T_1 węgla w fosfolipidach wolnych i po ich rekombinacji z białkami. Badania prowadzono na frakcji lipoproteinowej izolowanej z ludzkiej surowicy (HDL-high density lipoprotein (57)). Stwierdzono, że czas T_1 grupy metylowej cholicy nie zmienia się zasadniczo po rekombinacji fosfolipidów z białkami. Oznacza to, że w kompleksie lipid—białko nie występują oddziaływania części hydrofilowej lipidu z białkiem. Przeciwnie, czasy T_1 dla węgla C—14 kwasu linolowego i C—11 kwasu olejowego znacznie skracają się po rekombinacji fosfolipidów z białkiem, co świadczy o udziale tych segmentów kwasów w hydrofobowym oddziaływaniu lipid—białko.

Ostatnio (58), podobnie badano otoczkę lipidową wirionu (*vesicular stomatis virus*). Wprowadzając do takiej otoczki fosfolipidy zawierające atomy węgla ^{13}C można było wyznaczyć dla tych atomów czasy T_1 . Czasy te ulegają wyraźnemu skróceniu w porównaniu do wolnych fosfolipidów zawieszonych w wodzie (liposomy) lub rozpuszczalnych w rozpuszczalniku organicznym. Głównym wynikiem tych badań jest stwierdzenie bardzo sztywnej struktury otoczki lipidowej wirionu wywołanej silnymi oddziaływaniami lipid—lipid. To silne oddziaływanie można wiązać z dużą zawartością cholesterolu w otoczce. Poprzednie badania na modelowych fosfolipidach wskazały bowiem, że dodawanie cholesterolu skraca czasy T_1 węgla w fosfolipidzie (55).

Ilość ukazujących się prac poświęconych badaniom dynamiki cząsteczkowej związków naturalnych metodą spektroskopii cmr szybko rośnie. Obok badań w grupie związków peptydowych, sterydowych i lipidowych prowadzone są prace nad wykorzystaniem pomiarów czasów relaksacji w określaniu konformacji i dynamiki korrinoidów (59), czy też w badaniach oddziaływań cukrów z enzymami (60). W niniejszym artykule omówiono jedynie wycinek zagadnień badanych przy użyciu spektroskopii cmr. Należy podkreślić, że ta stosunkowo młoda metoda fizykochemiczna znajduje ponadto ogromne zastosowanie w badaniach strukturalnych związków naturalnych jak również w badaniach biosyntezy (artykuł przeglądowy (61)).

Artykuł nadszedł 17.1.1976, po rewizji autorskiej otrzymano 10.2.1976.

PIŚMIENNICTWO

1. Levy G. C., Nelson G. L., (1972), Carbon 13 nuclear magnetic resonance for organic chemists, Wiley-Interscience, New York.
2. Stothers J. B., (1972), Carbon-13 NMR Spectroscopy, Academic Press, New York.

3. Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy, red. Levy G. C., wyd. Wiley-Interscience, New York; t. 1, 1974; t. 2, 1975.
4. Smith I. C. P., Jennings H. J., Deslauriers R., (1975), *Accounts Chem Res.*, **8**, 306—313.
5. Bańkowski K., (1976), *Wiad. Chem.* (w druku).
6. Dobek A., Jędrzejczak K., Patkowski A., Szyfter K., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 149—174.
7. Allerhand A., Doddrell D., Komoroski R., (1971), *J. Chem. Phys.*, **15**, 189—198.
8. Glushko V., Lawson P. J., Gurd F. R. N., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3176—3185.
9. Oldfield E., Norton R. S., Allerhand A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6368—6380.
10. Solomon I., (1955), *Phys. Rev.*, **99**, 559—565.
11. Levy G. C., (1973), *Accounts Chem. Res.*, **6**, 161—169.
12. Doddrell D., Glushko V., Allerhand A., (1972), *J. Chem. Phys.*, **56**, 3683—3689.
13. Allerhand A., Oldfield E., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3428—3433.
14. Komoroski R. A., Peat I. R., Levy G. C., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 272—275.
15. Canet D., Levy G. C., Peat I. R., (1975), *J. Magn. Res.*, **18**, 199—204.
16. Levy G. C., Peat I. R., (1975), *J. Magn. Res.*, **18**, 500—521.
17. Keim P., Vigna R. A., Marshall R. C., Gurd F. R. N., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6104—6113.
18. Keim P., Vigna R. A., Morrow J. S., Marshall R. C., Gurd F. R. N., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7811—7818.
19. Keim P., Vigna R. A., Nigen A. M., Morrow J. S., Gurd F. R. N., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4149—4156.
20. Deslauriers R., Garrigou-Lagrange C., Bellocq A. M., Smith I. C. P., (1973), *FEBS Letters*, **31**, 59—66.
21. Deslauriers R., McGregor W. H., Sarantakis D., Smith I. C. P., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3443—3448.
22. Cellis M. E., Taleisnik S., Walter R., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1428—1433.
23. Deslauriers R., Walter R., Smith I. C. P., (1973), *FEBS Letters*, **37**, 27—32.
24. Walter R., Bernal I., Johnson R. F., (1972), *Chemistry and Biology of Peptides*, Wyd. J. Meienhofer, Ann. Arbor Science Publishers, str. 131.
25. Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., (1975), *Tetrahedron*, **31**, 2177—2209.
26. Sogn J. A., Craig L. C., Gibbons W. A., (1974), *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 3306—3309.
27. Allerhand A., Komoroski R. A., (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 8228—8231.
28. Doddrell D., Allerhand A., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1083—1089.
29. Deslauriers R., Smith I. C. P., Walter R., (1974), *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 2289—2291.
30. Urry D. W., Walter R., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 956—958.
31. Deslauriers R., Paiva A. C. M., Schaumburg K., Smith I. C. P., (1975), *Biochemistry*, **14**, 878—886.
32. Fernandjian S., Fromageot P., Tistchenko A., Leickman J., Leitz M., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **28**, 174—182.

33. Glickson J. D., Cunningham W. D., Marshall G. R., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3684—3692.
34. Schally A. V., Arimura A., Kastin A. J., Matsuo H., Baba Y., Redding T. W., Nair R. M. G., Debeljuk L., (1971), *Science*, **193**, 1036—1038.
35. Smith I. C. P., Deslauriers R., Saito H., Walter R., Garrigou-Lagrange C., McGregor H., Sarantakis D., (1973), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **222**, 597—627.
36. Deslauriers R., Levy G. C., McGregor H., Sarantakis D., Smith I. C. P., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4335—4343.
37. Sarges R., Witkop B., (1965), *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2011—2020.
38. Bamberg E., Lugger P., (1973), *J. Membrane Biol.*, **11**, 177—194.
39. Veatch W. R., Fossel E. T., Blout E. R., (1974), *Biochemistry*, **13**, 5249—5257.
40. Veatch W. R., Blout E. R., (1974), *Biochemistry*, **13**, 5257—5264.
41. Fossel E. T., Veatch W. R., Ovchinnikov Yu. A., Blout E. R., (1974), *Biochemistry*, **13**, 5264—5274.
42. Deslauriers R., Smith I. C. P., Walter R., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7006—7010.
43. Allerhand A., Doddrell D., Glushko V., Cochran D. W., Wenkert E., Lawson P. J., Gurd F. R. N., (1971), *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 544—546.
44. Chien J. C. W., Wise W. B., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3418—3424.
45. Saito H., Smith I. C. P., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 154—163.
46. Torchia D. A., Lyerla J. R., (1974), *Biopolymers*, **13**, 97—114.
47. Torchia D. A., Lyerla J. R., Quattrone A. J., (1975), *Biochemistry*, **14**, 887—900.
48. Wisscher R. B., Gurd R. F. N., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2238—2242.
49. Yguerabide J., Epstein H. F., Stryer L., (1970), *J. Mol. Biol.*, **51**, 573—590.
50. Opella S. J., Nelson D. J., Jardetzky O., (1974), *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7157—7159.
51. Browne D. T., Kenyon G. L., Packer E. L., Sternlich H., Wilson D. M., (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1316—1323.
52. Hunkapiller M. W., Smallcombe S. H., Whitaker D. R., Richards J. H., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4732—4743.
53. Apsimon J. W., Beierbeck H., Saunders J. K., (1975), *Can. J. Chem.*, **53**, 338—342.
54. Leibfritz D., Roberts J. D., (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4996—5003.
55. Stoffel W., Zierenberg O., Tungall B., Schreiber E., (1974), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 1367—1380.
56. Levine Y. K., Partington P., Roberts G. C. K., Birdsall N. J. M., Lee A. G., Metcalfe J. C., (1972), *FEBS Letters*, **23**, 203—207.
57. Stoffel W., Tungall B., Zierenberg O., Schreiber O., Bin-
czek O., (1974), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 1381—1389.
58. Stoffel W., Bister K., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2841—2847.
59. Hogenkamp H. P. C., Tkachuck R. D., Grant M. E., Fuentes R.,
Matwiyoff N. A., (1975), *Biochemistry*, **14**, 3707—3714.
60. Villafranca J. J., Viola R. E., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 465—
61. McInnes A. G., Wright L. C., (1975), *Accounts Chem. Res.*, **8**, 313—320.
62. Wehrli F. W., (1974), *NMR Spectroscopy of Nuclei Other than Proton*, John Wiley and Sons, Inc. str. 157, New York.

Redakcja kwartalnika „Postępy Mikrobiologii” uprzejmie informuje, że w numerze 3/4 1976 ukazać się następujące artykuły:

1. Mirosław M. Bobrowski, Małgorzata Lachmajer-Lutosławska — Pozachromosomalne dziedziczenie oporności na antybiotyki u Gram-ujemnych pałeczek jelitowych.
2. Bohdan J. Starościak — Aktualny stan wiedzy o dezoksyrybonukleazach bakteryjnych.
3. Władysław T. Dobrzański — Znaczenie dezoksyrybonukleaz w nieodwracalnym wiązaniu DNA przez komórki bakteryjne w genetycznej transformacji.
4. Kazimierz B. Jastrzemski — Mechanizm lizy bakterii zakażonych fagami.

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT *

Transport i metabolizm folianu w komórkach zwierząt i drobnoustrojów

Transport and Metabolism of Folate in Animal Cells and Microorganisms

Pochodne folianu stanowią liczebną grupę związków, które uczestniczą, jako koenzymy, w wielu komórkowych procesach metabolicznych.

Pierścień pyrazynowy w cząsteczce folianu (Ryc. 1) może charakteryzować się co najmniej trzema stopniami utlenienia a jeden z pięciu różnych fragmentów jednowęglowych może przyłączać się do atomu azotu w pozycji 5, 10 lub 5 i 10. Zakładano, że liczba reszt kwasu glutaminowego w cząsteczce pochodnych folianowych nie przekracza sześciu, i wówczas liczba różnych pochodnych folianowych sięgać mogłaby blisko 150 (1). W rzeczywistości liczba pochodnych jest znacznie większa, gdyż w materiale biologicznym wykryto siedmioglutaminianowe pochodne folianowe. Okazało się ponadto, że oprócz kwasu glutaminowego niektóre inne aminokwasy mogą także wchodzić w skład polipeptydu cząsteczki pochodnych folianu (2) (patrz Tabela 1).

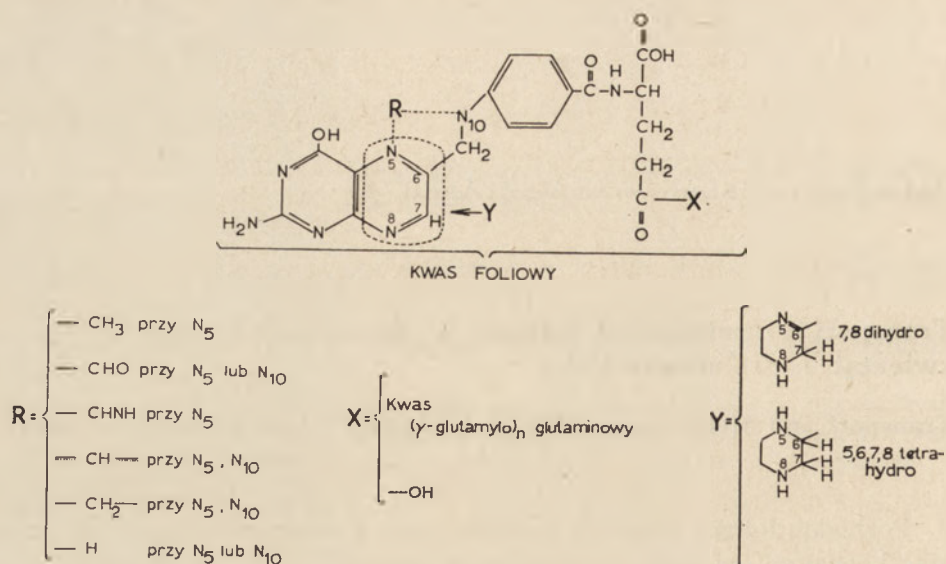
I. Występowanie w materiale biologicznym oraz biosynteza i rozkład poliglutaminianów folianowych

I-1. Występowanie

Przykłady różnych pochodnych folianu znajdujących w materiale biologicznym zebrano w Tabeli 1. Jak widać pochodne folianu występują w materiale biologicznym przede wszystkim w formie poliglutaminianów.

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

Wykaz stosowanych skrótów: PteGlu — folian; H_2 PteGlu — dihydrofolian; H_4 PteGlu — tetrahydrofolian; CH_3-H_4 PteGlu — metylotetrahydrofolian; $CH-NH=H_4$ PteGlu — formiminotetrahydrofolian; $CHO-H_4$ PteGlu — formylotetrahydrofolian; CH_2-H_4 PteGlu — metylenotetrahydrofolian; $CH=H_4$ PteGlu — metylenotetrahydrofolian; PteGlu_n — poliglutaminiany różnych pochodnych folianowych o różnej liczbie (n) reszt glutaminowych; MTX — ametoptyryna (4-amino-4-deoksy-10-metylo-folian).



Ryc. 1. Schemat cząsteczki folianu (1, zmodyfikowany)

R — oznacza różnego rodzaju podstawniki jednowęglowe przyłączone bądź to do atomu azotu w pozycji 5 lub 10 lub też tworzące „mostek” pomiędzy tymi atomami. Linia ciągła oznacza wiązanie pojedyncze, linie przerywane oscylujące wiązanie podwójne. Y — oznacza dwie formy uwodorowanego rdzenia pterydynowego, a X — fragment poliglutaminianowy cząsteczki folianu.

Badano pod tym względem wiele organizmów, tkanek i płynów ustrojowych. Jak dotąd, poliglutaminianów folianu nie wykryto tylko w tkankach owadów i w surowicy krwi ludzkiej, a ilość ich np. w mleku krowim czy też w nasionach soi jest rzędu około 50% ogólnej ilości pochodnych folianowych. Powszechność występowania w materiale biologicznym różnych poliglutaminianowych pochodnych folianowych nasunęła przypuszczenie, że są one nie tylko formą „magazynowania” tych pochodnych w komórkach, lecz formami czynnymi metabolicznie.

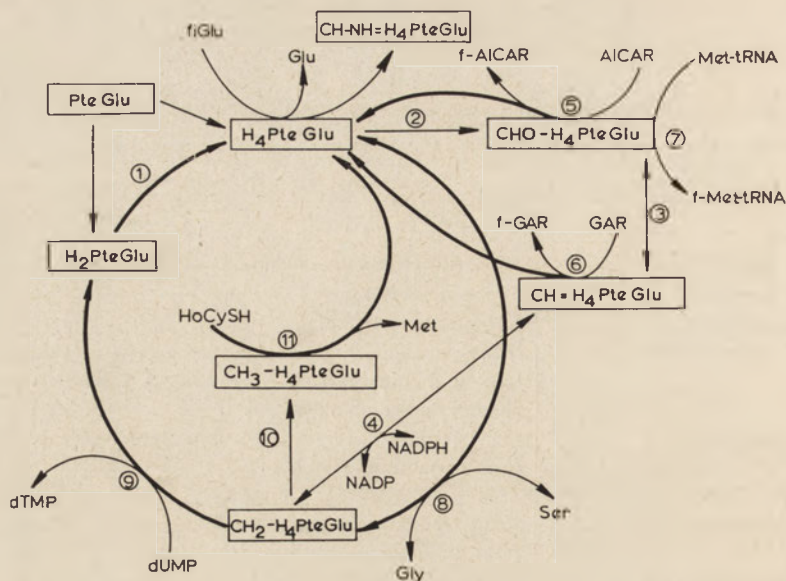
I-2. Interkonwersja koenzymatycznych pochodnych folianowych

Właściwości niemal wszystkich enzymów katalizujących interkonwersję pochodnych folianowych (Ryc. 2) opisano w szeregu artykułach przeglądowych (36—46). Zaktywowane przez połączenie z tetrahydrofolianem fragmenty jednowęglowe, o różnym stopniu utlenienia, uczestniczą w biosyntezie rdzenia purynowego, tymidyny, niektórych aminokwasów a także w inicjacji syntezy polipeptydów. Przemiany różnych fragmentów jednowęglowych podlegają różnorodnym mechanizmom kontrolnym i to zarówno na poziomie enzymatycznym (47—61), jak i na poziomie procesów pobierania pochodnych folianowych przez komórki (patrz rozdział III).

Tabela 1

Pochodne folianu występujące w materiale biologicznym

Źródło	Pochodne folianu
Bakterie	
<i>B. subtilis</i> (3, 4)	5-formylo- $H_4PteGlu_2$, 5-formylo- $H_4PteGlu_3$
<i>S. faecalis</i> (5)	5-formylo- $PteGlu_3$
<i>C. acidi-urici</i> (6)	5,10-metenilo- $H_4PteGlu_3$
<i>C. cylindrosporum</i> (2)	różne pochodne folianowe zawierające w cząsteczce od 2-7 reszt glutaminianowych oraz związki z innymi niż kwas glutaminowy aminokwasami
<i>L. casei</i> (7, 8)	różne zredukowane pochodne folianowe zawierające od 3—9 reszt glutaminianowych
Grzyby	
<i>S. cerevisiae</i> (9, 10)	różne zredukowane pochodne folianowe zawierające od 2—7 reszt glutaminianowych
<i>Cand. utilis</i> (11)	5-formylo- $H_4PteGlu_{n(1-3)}$
Owady	
<i>M. domestica</i> (12)	5-formylo- $H_4PteGlu$
Ssaki	
wątroba (13—22)	różne zredukowane pochodne folianowe zawierające od 3—7 reszt glutaminianowych. Przewaga zawartości 5-metylo- $H_4PteGlu_n$
nerki (22—25)	Poliglutaminiany $H_4PteGlu$
erytrocyty (25—27)	5-metylo- $H_4PteGlu_{3-6}$, $H_4PteGlu_n$
surowica krwi (15, 28)	5-metylo- $H_4PteGlu$, $H_4PteGlu$. Brak poliglutaminianów folianowych
komórki L1210(29)	Poliglutaminiany różnych pochodnych folianowych
komórki L (30)	Mono- i poliglutaminiany różnych pochodnych folianowych
mleko krowie (31, 32)	Różne zredukowane pochodne folianowe w formie mono (60%) i poliglutaminianów zawierających od 2—7 reszt glutaminianowych. Przewaga zawartości 5-metylo- $H_4PteGlu_n$
Rośliny	
soja (31)	Różne zredukowane pochodne folianowe w formie mono- (50%) i poliglutaminianów zawierających od 2—6 reszt glutaminianowych. Przewaga zawartości 5-formylo- $H_4PteGlu_n$.
groch (33)	Różne zredukowane pochodne folianowe w formie mono- (65%) i poliglutaminianów; 5-metylo- $H_4PteGlu$ stanowi 60% wszystkich monoglutaminianów
kapusta (34)	Różne zredukowane pochodne folianowe w formie mono- (10%) i poliglutaminianów. Niemal 90% wszystkich poliglutaminianów zawiera powyżej pięciu reszt glutaminianowych. Przewaga zawartości 5-metylo- $H_4PteGlu_n$
sałata (35)	Różne zredukowane pochodne folianowe w formie mono- (33%) i poliglutaminianów. Przewaga zawartości 5-metylo- $H_4PteGlu$



Ryc. 2. Schemat przemian pochodnych folianowych i ich udział w biosyntezie niektórych aminokwasów i nukleotydów

Grubą linią oznaczono te przemiany, które doprowadzają do powstawania wolnego tetrahydrofolianu. Liczby oznaczają enzymy przeprowadzające poszczególne przemiany: 1 — oksydoreduktaza 5,6,7,8-tetrahydrofolian: NAD(P)/ (E.C. 1.5.1.4.); 2 — ligaza (ADP) tetrahydrofolian: mrówczan, (E.C. 6.3.4.3); 3 — cykloligaza 5-formyltetrahydrofolianu (ADP) (E.C. 6.3.3.2); 4 — oksydoreduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolian:NADP (E.C. 1.5.1.5); 5 — formylotransferaza 10-formyltetrahydrofolian: 5-fosforybozyl-5'-amino-4-imidazolo-karboksamid (E.C. 2.1.1.3); 6 — formylotransferaza 10-formyltetrahydrofolian: 5-fosforybozylglicynamid (E.C. 2.1.2.2); 7 — transformylaza 10-formyltetrahydrofolian: L-metionyl-tRNA (E.C. 2.1.2.9); 8 — hydroksymetylotransferaza tetrahydrofolian: L-seryna (E.C. 2.1.2.1); 9 — metylotransferaza 5,10-metylenotetrahydrofolian: deoksurydyno-5'-monofosforan (E.C. 2.1.1.6); 10 — oksydoreduktaza 5-metylotetrahydrofolian: NAD (E.C. 1.1.1.68); 11 — metylotransferaza 5-metylotetrahydrofolian: homocysteina (E.C. 2.1.1.13); 12 — formiminotransferaza 5-formiminotetrahydrofolian: L-glutaminian (E.C. 2.1.2.5).

I-3. Biosynteza PteGlu_n

Syntezę rdzenia pterydynowego wchodzącego w skład cząsteczki folianu, jak również biosyntezę dihydrofolianu wykazano w licznych układach bakteryjnych (62, 64) i tkankach owadów (65—68). Ostatnio pojawiają się doniesienia wskazujące na możliwość syntezy złożonych pterydyn także w komórkach ssaków (69—73). Pomimo, że poliglutaminiany folianowe występują powszechnie w materiale biologicznym, to wiadomości o układach enzymatycznych katalizujących biosyntezę poliglutaminianowych pochodnych folianu jest dotychczas bardzo niewiele. Enzymy uczestniczące w syntezie PteGlu_n wykazano w wątrobie owcy (74) a wyizolowano i częściowo oczyszczono je tylko z komórek *Escherichia coli* (75—77) i *Neurospora crassa* (78).

Właściwym substratem syntezy dwuglutaminianów folianowych z *E. coli* okazał się 10-formylo- H_4 PteGlu. Tetrahydrofolian oraz metyleno-

-H₄PteGlu uczestniczyły w tym procesie z mniejszą intensywnością. Syntetaza dwuglutaminianów z *E. coli* nie katalizowała jednakże powstawania dwuglutaminianów H₂PteGlu i metylo-H₄PteGlu, a co więcej związki te zastosowane w stężeniu ekwimolarnym ze stężeniem właściwego substratu, hamowały w znacznym stopniu aktywność badanego enzymu. Enzymy natomiast z *N. crassa* oraz z wątroby owcy odznaczały się niższą specyficznością substratową niż enzym z *E. coli* i katalizowały syntezę dwuglutaminianów H₄PteGlu, H₂PteGlu, metylo-H₄PteGlu oraz formylo-H₄PteGlu ze zbliżoną wydajnością.

Frakcjonowanie ekstraktów komórek *N. crassa* siarczanem amonu pozwoliło na ustalenie, że syntezę poliglutaminianów zawierających więcej niż 2 reszty glutaminianowe w cząsteczce przeprowadza w tym organizmie odrębny układ enzymatyczny (79). W wątrobie owcy zaś występuje, jak się wydaje, tylko jedna syntetaza poliglutaminianowa odpowiedzialna za kolejne dołączanie reszt glutaminianowych do PteGlu_n (74).

I-4. Rozkład PteGlu_n

Znacznie więcej niż o biosyntezie poliglutaminianów folianowych wiadomo na temat ich enzymatycznej degradacji. Jako źródło enzymów, odszczepiających końcowe reszty glutaminianowe od PteGlu_n, zwanych dalej peptydazami glutaminianowymi, stosowano na przykład wyciągi z trzustki kurczęcia (79, 80), nerek wieprza (81) czy też surowicę krwi (82). Jednakże badania właściwości peptydaz poliglutaminianowych oraz mechanizmów reakcji przez nie katalizowanych rozpoczęły się dopiero w ostatnich kilku latach po opracowaniu metod chemicznej syntezy różnych poliglutaminianów folianowych i zastosowaniu czulej radioaktywnej metody oznaczania aktywności enzymatycznej (83).

Peptydazy poliglutaminianowe występują bardzo powszechnie w materiale biologicznym (1, 84, 85). Stwierdzono ich obecność we frakcji lizosomalnej komórek śluzówki jelita świnki morskiej (86) oraz komórek wątroby (1, 87). Enzymy te wykazują absolutną specyficzność w stosunku do wiązania γ łańcucha peptydowego, które łączy skrajny kwas glutaminowy z cząsteczką PteGlu_n (1, 87—89), są zatem γ -glutamylkarboksypeptydazami.

Glutamylkarboksypeptydazy z wątroby ssaków katalizują odszczepianie reszt glutaminianowych zarówno od cząsteczki utlenionych, jak i od zredukowanych pochodnych folianowych, niezależnie od obecności podstawników w rdzeniu pterydynowym (15, 87); co więcej karboksypeptydaza z nerek wieprza może wykorzystać jako substraty także poliglutaminiany ametopertyny, 4-amino-10-metylo-analogu folianu (90). Glutamylkarboksypeptydaza oczyszczona z wątroby ludzkiej wykazywała najwyższą aktywność wobec PteGlu₃; katalizowała ona także, chociaż ze słab-

szą wydajnością, rozkład analogów trójglutaminianu folianu typu PteGluGlu-Ser, PteGluGlu-Ala, PteGluGlu-Pro itp. (88). Odszczepienie skrajnego aminokwasu miało jednak miejsce tylko wówczas, gdy połączony on był wiązaniem γ -peptydowym z pozostałym fragmentem cząsteczki. Jak wykazano przy badaniu γ -glutamylokarboksypeptydaz z różnych źródeł, rozkład pteroilopoliglutaminianów następował na drodze sukcesywnego odszczepiania reszt glutaminianowych a proces ten katalizowała jedna lub kilka karboksypeptydaz. Wydaje się, że w wątrobie wołu (87), jak też w wątrobie ludzkiej (1) za odszczepienie reszt glutaminianowych odpowiada tylko jedna karboksypeptydaza o wyższej specyficzności w stosunku do długo- niż krótko—łańcuchowych pteroilopoliglutaminianów. Hydrolizę PteGlu₇ w jelicie kurczęcia katalizują zaś aż trzy karboksypeptydazy (91). W pierwszym etapie hydrolizy następuje odszczepienie od PteGlu₇ pięcioglutaminianu, w dalszych zaś rozkład PteGlu₂. Enzym katalizujący rozkład PteGlu₇ do PteGlu₂ i nazwany pteroiło- γ -oligoglutamylo-endopeptydazą, oczyszczono 1200-krotnie przy zastosowaniu chromatografii powinowactwa, częściowo też zbadano jego właściwości (92). Pierwszy raz występowanie różnych form molekularnych glutamylokarboksypeptydaz w tym samym organizmie stwierdzono wykazując w surowicy krwi ludzkiej obecność termolabilnej formy enzymu o ciężarze cząsteczkowym 40 000, a w komórkach jelita formy termostabilnej o ciężarze cząsteczkowym 83 000 (93).

Glutamylokarboksydazy poliglutaminianów folianowych uczestniczą także w wykorzystywaniu przez organizmy wyższe poliglutaminianów pochodnych folianowych zawartych w pokarmach (94—97). Znacznie wyższy wzrost poziomu pochodnych folianowych w surowicy krwi po podaniu różnych monoglutaminianów folianowych (94, 98—104), ale nie poliglutaminianów tych związków. sugerował, że monoglutaminiany są efektywniej wchłaniane w jelicie niż PteGlu_n. Za intensywną absorpcją w jelicie niezhydrolizowanych PteGlu_n przemawiają jednak wyniki analiz komórek śluzówki jelita psa, w których po inkubacji z PteGlu lub PteGlu₇, stwierdzono duże ilości PteGlu₇ oraz poliglutaminianów o mniejszej liczbie reszt glutaminianowych (105). Można zatem przypuszczać, że poliglutaminiany folianu o krótszym łańcuchu peptydowym pojawiły się w komórkach w wyniku działania glutamylokarboksypeptydaz. Przypuszcza się także, że w jelicie ssaków absorpcja PteGlu oraz jego poliglutaminianów może zachodzić odrębnymi drogami (105).

II. Metody izolowania i identyfikacji pochodnych folianowych

Przystępując do izolowania pochodnych folianowych z materiału biologicznego trzeba zastosować takie postępowanie, aby je ochronić od rozkładu przez endogenne glutamylokarboksypeptydazy i zachować labilną

strukturę w ich rdzeniu pterydynowym. Najczęściej ekstrahuje się obecne w materiale biologicznym pochodne folianowe różnymi buforami z dodatkiem środków redukujących w wysokiej temperaturze lub autoklawując (1, 106) bądź też szybko rozбивa komórki 8M mocznikiem (107) często z dodatkiem chloroformu lub TCA (1, 7). Chloroform, a zwłaszcza TCA powoduje szybką inaktywację endogennych glutamylokarboksypeptydaz, jak również ułatwienie rozбивa kompleksów pochodnych folianu z białkami komórkowymi. Następnie pochodne folianowe z ekstraktów poddaje się analizie chromatograficznej przy zastosowaniu chromatografii bibułowej (3, 5) lub chromatografii cienkowarstwowej (4, 108, 109), ale najczęściej analizie na kolumnach z DEAE-celulozy (15, 110), Sephadex G-15, G-25 lub QAE (8, 23, 24, 74), DEAE-Sephadex (111) lub Biogel-P-2 (112). Identyfikację pochodnych folianu w produktach rozdzielu kolumnowego wyciągów tkankowych przeprowadza się bądź to na drodze kochromatografii ze znanymi pochodnymi folianu bądź też stosując próby mikrobiologiczne (15, 113). Do tego celu stosuje się testowe szczepy bakteryjne wymagające obecności w podłożu hodowlanym określonych pochodnych folianowych jako czynników wzrostowych (Tabela 2). Najwyższą specyficznością w stosunku do pochodnych folianowych odznacza się *Pediococcus cerevisiae*, który rośnie jedynie w obecności tetrahydrofolianu i jego formylowych pochodnych, najniższą zaś *Lactobacillus casei*, który wykorzystuje wszystkie mono- i diglutaminowe pochodne folianowe. W typowych warunkach eksperymentalnych żadna z testowych bakterii nie rośnie w pożywce zawierającej pochodne folianowe z więcej niż dwiema dodatkowymi resztami glutaminianowymi w cząsteczce. Ostatnio wykazano jednak, że można uzyskać pewną odpowiedź wzrostową *L. casei* na poliglutaminiany folianu, przy znacznym zwiększeniu ich stężenia w środowisku (~ 50 razy) i wydłużeniu czasu inkubacji (114). Niemniej nie wydaje się, aby fakt ten mógł rzutować na prawidłowość wyników otrzymywanych rutynowo przy użyciu *L. casei*.

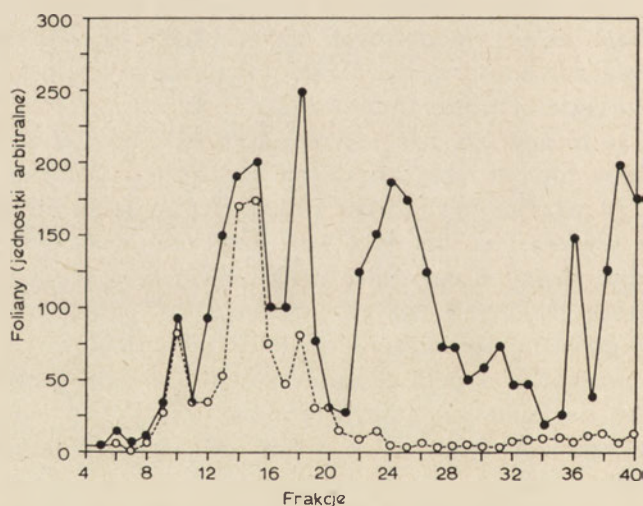
Brak wzrostu badanych bakterii w obecności poliglutaminianów folianu stanowi poważne ograniczenie metody, gdyż dopiero trawienie próbek glutamylo- γ -karboksypeptydazami ujawnia ich aktywność biologiczną w stosunku do badanych mikroorganizmów (Ryc. 3), co jest równoznaczne z wykazaniem obecności w badanym materiale szeregu poliglutaminianów folianowych.

Precyzyjna analiza występujących w materiale biologicznym poliglutaminianów pochodnych folianowych stała się możliwa dopiero ostatnio po opracowaniu metod syntezy chemicznej poliglutaminianów folianu (115—117) oraz chemicznych metod rozszczepienia wiązania pomiędzy C—9 a N—10 w cząsteczce tego typu związków (7, 118). W wyniku rozszczepienia wiązania pomiędzy C—9 a N—10 w cząsteczce pochodnych folianowych otrzymuje się homologiczny szereg p-aminobenzoilglutamylo-poli- γ -glutaminianów, które znacznie lepiej niż związki zawierające

Tabela 2

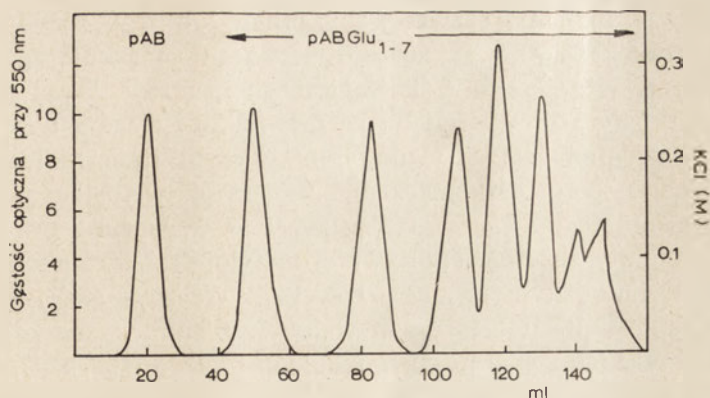
Odpowiedź wzrostowa testowych szczepów bakteryjnych na różne pochodne folianu obecne w środowisku hodowanym (1)

Pochodne folianu	<i>L. casei</i> ATTCC No 7469	<i>D. faecalis</i> ATTCC No 8043	<i>P. cerevisiae</i> ATTCC No 8081
Kwas pterojowy	—	+	—
Kwas 10-formylo-pterojowy	—	+	—
Kwas 5-formylo-pterojowy	—	+	—
PteGlu	+	+	—
PteGlu ₃	+	—	—
H ₂ PteGlu	+	+	—
H ₄ PteGlu	+	+	+
10-formylo-PteGlu	+	+	—
10-formylo-H ₄ PteGlu	+	+	+
10-formylo-H ₄ PteGlu ₃	+	—	—
10-formylo-H ₄ PteGlu _{n>3}	—	—	—
5-formylo-H ₄ PteGlu	+	+	+
5-formylo-H ₄ PteGlu ₃	+	—	±
5-metylo-H ₄ PteGlu	+	—	—
5-metylo-H ₄ PteGlu _{n>3}	—	—	—
5,10-metenylo-H ₄ PteGlu	+	+	—



Ryc. 3. Mikrobiologiczne oznaczanie stężenia pochodnych folianu we frakcjach otrzymanych w wyniku chromatografowania na kolumnie z DEAE-celulozy wyciągów z wątroby szczura przed (O—O—O) i po (●—●—●) traktowaniu frakcji glutamyl- γ -karboksypeptydazą (15, zmodyfikowany).

Ilość pochodnych folianu we frakcji obliczano z intensywności wzrostu bakterii testowej, *L. casei*.



Ryc. 4. Rozdział chromatograficzny na kolumnie z DEAE-celulozy mieszaniny kwasu p-aminobenzoesowego (pAB) i p-aminobenzoilopoliglutaminianów (pABGlu₁₋₇) (118).

fragment pterydynowy rozdzielają się podczas chromatografii na kolumnie z DEAE-celulozy (Ryc. 4). Pozwala to zatem na dokładne oznaczenie liczby reszt glutaminianowych w badanych pochodnych folianowych.

Pomimo stosunkowo dobrze rozwiniętych metod izolowania pochodnych folianowych otrzymanie ich z materiału biologicznego w ilościach umożliwiających stosowanie do badań jest nadal trudne. Dotychczas, z dużą wydajnością otrzymano jedynie trójglutaminian metenylotetrahydrofolianu (6) z *Clostridium acidi urici*, gdzie związek ten występuje w ilościach 25 mg na 100 g świeżej masy bakterii.

III. Pobieranie oraz przemiany folianu i jego pochodnych

Zarówno pobieranie jak i usuwanie pochodnych folianowych z komórek ssaków i bakterii, zachodzi, jak się obecnie wydaje, w drodze aktywnego transportu przy udziale hipotetycznych nośników umiejscowionych w błonach komórkowych. Szereg odmiennych cech transportu folianu i jego pochodnych do komórek zwierzęcych i bakterii upoważnia by zjawiska te w dalszej części artykułu omówić osobno. Podobnie, oddzielnie zostaną potraktowane przemiany folianu i jego pochodnych, między innymi ze względu na różnorodność podejść eksperymentalnych.

III-1. Pobieranie folianu i jego pochodnych przez komórki zwierzęce hodowane in vitro

Dane na ten temat uzyskano przede wszystkim przy badaniu mysich leukemicznych komórek L1210 (119—124), L5178Y (125), HeLa (126), L (127) oraz niektórych elementów morfotycznych krwi (126, 128—132). Ko-

mórki zwierzęce pobierają znakowany folian lub jego różne pochodne z intensywnością zależną od rodzaju podanego związku, jego stężenia w środowisku, a także stanu fizjologicznego komórek. Ilości pobranych przez komórki pochodnych folianu są niewielkie i sięgają najwyżej kilka procent podanej radioaktywności, przy czym ilość radioaktywnego folianu pobieranego przez komórki obniżała się ze wzrostem pozakomórkowego stężenia tego związku (127, 128, 130). Wykazano przy tym, że komórki pobierały znacznie efektywniej metylotetrahydrofolian i formylotetrahydrofolian niż folian (120, 124, 126). Wartości stałej Michaelisa metylotetrahydrofolianu i formylotetrahydrofolianu, wyznaczone w badaniach kinetyki ich pobierania przez komórki L1210 (120, 121), były rzędu $1-2\mu\text{M}$, podczas gdy stała Michaelisa folianu okazała się stukrotnie wyższa. Dane te sugerują ponadto, że prawdopodobnie *in vivo* komórki L1210 wykorzystują folian także z bardzo niewielką wydajnością.

Postuluje się, że w transporcie folianu i jego koenzymatycznych form do komórek zwierzęcych uczestniczą dwa odrębne układy nośnikowe. Nie stwierdzono bowiem hamowania pobierania folianu przez komórki ani przez metylową czy formylową pochodną H_4PteGlu , ani też przez analog folianu — ametoptyrynę (120, 127, 128). Ametoptyryna natomiast w znacznym stopniu hamowała pobieranie przez komórki koenzymatycznych pochodnych folianowych. Co więcej czynniki, blokujące grupy $-\text{SH}$ nie wpływały na intensywność transportu folianu do komórek, silnie hamowały natomiast pobieranie metylotetrahydrofolianu przez komórki L1210 (123, 124, 129, 133). Merkaptoetanol dodany do mieszaniny inkubacyjnej przed związkiem blokującym grupy $-\text{SH}$ zapobiegał hamowaniu pobierania metylotetrahydrofolianu, a dodany po zablokowaniu grup $-\text{SH}$ częściowo przywracał aktywne pobieranie tego związku (123). Ostatnio doniesiono także o hamującym wpływie cAMP na pobieranie przez limfoblasty ludzkie metylo- H_4PteGlu oraz ametoptyryny (134, 135) przy braku oddziaływania na efektywność pobierania folianu. Powyższe dane wskazują, że pobieranie folianu przez komórki zachodzi przy udziale innego układu transportującego niż pobieranie jego koenzymatycznych pochodnych. Wydaje się także, że transport ametoptyryny do komórek odbywa się przy udziale tego samego układu nośnikowego, który transportuje koenzymatyczne formy folianu (123). Biologiczne potwierdzenie tego przypuszczenia stanowić może obserwacja, że odporne na ametoptyrynę komórki wyprowadzone z linii L1210, charakteryzują się niższą zdolnością pobierania ametoptyryny niż wrażliwe komórki macierzyste, nie różnią się zaś intensywnością pobierania folianu (124).

Nie wykazano dotychczas aby komórki ssaków, e.g. komórki szpiku kostnego pobierały *in vitro* syntetyczny trójglutaminian folianu, użyty nawet w stężeniu 10^{-4}M (136). Można zatem przypuszczać, że i inne komórki, a zwłaszcza elementy morfotyczne krwi są niezdolne do pobiera-

nia pochodnych folianowych o większej liczbie reszt glutaminianowych w cząsteczce.

Stwierdzono wyraźne różnice w intensywności pobierania folianu przez niedzielące się limfocyty i limfocyty stymulowane do podziałów komórkowych działaniem fitohemaglutyniny (128), jak również przez dzielące się retikulocyty i niezdolne do podziałów erytrocyty (130). Obserwacja ta nasunęła przypuszczenie o możliwej zależności pomiędzy intensywnością pobierania folianu a szybkością syntezy w komórkach RNA i DNA. Narażenie nie potwierdzono eksperymentalnie tego przypuszczenia w przypadku ludzkich limfocytów (128). Niemniej jednak badając mysie komórki L wykazano pewne obniżenie intensywności pobierania folianu, gdy komórki preinkubowano z cykloheksomidem lub aktynomycyną D przed dodaniem radioaktywnego folianu (127). Wydaje się więc, że przynajmniej w niektórych układach komórkowych transport folianu do komórek zależy od właściwego przebiegu komórkowych przemian metabolicznych.

Stan fizjologiczny komórek, a w szczególności wysycenie ich witaminą B_{12} czy też folianem wpływa na intensywność pobierania pochodnych folianowych, a zwłaszcza metylo- H_4 PteGlu. Wykazano na przykład, że komórki szpiku kostnego (137) jak też limfocyty (128, 138) pobrane od pacjentów chorych na anemię złośliwą, którzy wykazywali symptomy niedoboru witaminy B_{12} znacznie słabiej, niż odpowiednie komórki prawidłowe, pobierały ze środowiska metylo- H_4 PteGlu przy niezmienionej intensywności pobierania folianu. Dodanie do środowiska inkubacyjnego witaminy B_{12} podwyższało pobieranie metylo- H_4 PteGlu przez komórki z niedoborem witaminy B_{12} w odróżnieniu od komórek prawidłowych (137, 138). Również w organizmach zwierzęcych znaleziono mniej intensywne wykorzystanie metylo- H_4 PteGlu z krwi osób z objawami złośliwej anemii, czemu też towarzyszyło zwiększone wydalenie metylotetrahydrofolianu w moczu (139). Tak więc zdolność pobierania metylotetrahydrofolianu przez komórki zależy w dużym stopniu od obecności w nich witaminy B_{12} . Obecnie wydaje się jednak, że może to być zależność pozorna wynikająca w istocie z upośledzenia, przy niedoborze witaminy B_{12} , zuzycia metylotetrahydrofolianu w syntezie metioniny (125, 138).

Eksperymentalne wywołanie niedoboru folianu w komórkach (Hela, limfocyty) przez hodowanie ich w środowisku pozbawionym tego związku, powoduje kilkukrotne podwyższenie intensywności pobierania folianu i metylotetrahydrofolianu przez komórki (126). Wysłunięto przypuszczenie, że komórkowe białka wiążące folian (porównaj rozdział V), których ilość zależy w pewnym stopniu od wysycenia komórek folianem, mogą odgrywać jakąś rolę w transporcie pochodnych folianu do komórek (140). Przemawia za tym szereg danych doświadczalnych, a mianowicie: — podwyższenie poziomu białek wiążących folian w surowicy oraz w komórkach szpiku kostnego pacjentów z objawami niedoboru folianu (141), — hamowanie przez surowicę, obecną w środowisku inkubacyjnym, pobierania

folianu przez komórki HeLa (126), komórki szpiku kostnego (132) czy też mysie komórki L (142), — obniżone pobieranie folianu i metylotetrahydrofolianu przez komórki HeLa, jeśli badane związki występowały w kompleksie z białkami wiążącymi folian (126, 143).

III-2. Pobieranie folianu i jego pochodnych przez bakterie

Badania prowadzono głównie przy użyciu *L. casei*, bakterii wykorzystującej jako czynniki wzrostowe niemal wszystkie znane pochodne folianu (8, 144—148) oraz *Streptococcus faecalis* i *P. cerevisiae* (8, 149—153), charakteryzujące się większą wybiórczością w stosunku do pochodnych folianowych niż *L. casei*.

Najwyższą intensywnością pobierania pochodnych folianowych odznaczają się bakterie z hodowli w końcowej fazie wzrostu logarytmicznego (144, 146), oraz z hodowli prowadzonej w środowisku nie zawierającym pochodnych folianowych, lecz za to wzbogaconym w tymidynę (152).

Poszczególne szczepy bakteryjne pobierają od 30 do 90% dodanej do środowiska radioaktywności (8, 152), przy czym podobnie jak w przypadku komórek zwierzęcych ze wzrostem stężenia folianu w środowisku obniżała się wydajność jego pobierania. W odróżnieniu od komórek zwierzęcych bakterie pobierają ze środowiska folian i jego pochodne za podobną intensywnością (8, 144). Wartości takich parametrów kinetycznych jak K_m i V_{max} wyznaczone dla metylotetrahydrofolianu i folianu były również zbliżone i wynosiły od 0,35 do 0,90 μM . Przedstawiono ostatnio wyniki wskazujące, że komórki *L. casei* mogą pobierać również i poliglutaminiany folianowe (o liczbie reszt glutaminianowych nie przekraczającej pięciu) bez ich uprzedniej hydrolizy do monoglutaminianów (114, 146). Jednakże zarówno szybkość transportu poliglutaminianów folianowych jak i ich powinowactwo do układu transportującego obniżało się wraz ze wzrostem liczby reszt glutaminianowych w cząsteczce. Tak np. pięcioglutaminian folianu wykazuje wartość K_m 130-krotnie wyższą niż folian, przy dwukrotnie niższej szybkości maksymalnej. Oznacza to konieczność dodawania PteGlu₅ do pożywki w pięciokrotnie wyższym stężeniu niż folian dla osiągnięcia tego samego efektu wzrostowego (146).

Pobieranie folianu przez bakterie w bardzo znacznym stopniu zależy od obecności w środowisku glukozy oraz innych cukrów (144, 145, 150, 152). W nieobecności cukrów w środowisku inkubacyjnym ilości pobranych przez komórki związków folianowych zmniejszały się kilkakrotnie. Co więcej również mono- i dwufosforany cukrów prostych oraz fosforan gliceroaldehydu stymulowały pobieranie folianu przez *L. casei*, lecz jedynie w komórkach traktowanych lizozymem, co zwiększało przepuszczalność ich błon (145). Znaleziono ponadto bardzo zbliżoną równoległość zahamowania pobierania folianu i glikolizy przez takie związki jak fluo-

rek, hydroksylamina czy też jodoacetamid, co potwierdza zależność pomiędzy intensywnością pobierania folianu a efektywnością glikolizy (145). Związki redukujące, takie jak 2-merkaptotetanol, cysteina lub ditiotretitol (lecz nie askorbinian) stymulowały pobieranie folianu i jego pochodnych przez komórki *L. casei*, a zwłaszcza przechowywane przez kilka dni w temp. 4°C, podczas gdy jodoacetamid hamował pobieranie folianu oraz metylotetrahydrofolianu i ametoptyryny (144). Powyższe dane, jak również kompetytywne hamowanie przez dihydrofolian, tetrahydrofolian, metylo- i formylotetrahydrofolian pobierania folianu przez komórki *L. casei* przemawiają za obecnością w komórkach bakteryjnych jednego systemu odpowiedzialnego za transport pochodnych folianu (145).

W pracowni Huennekensa podjęto przeto badania w tym zakresie i w 1975 roku doniesiono o pierwszych próbach wyizolowania białkowych składników błony komórkowej *L. casei* uczestniczących w transporcie folianu (145). Traktując komórki *L. casei* lizozymem w obecności Tritonu X-100 i radioaktywnego folianu wydzielono białkowy składnik i oczyszczono go do homogenności. Charakteryzuje się on ciężarem cząsteczkowym 250 000 i składa prawdopodobnie z kilku podjednostek o ciężarze cząsteczkowym 28 000. Oczyszczone preparaty tego białka wiążą trwałe folian w ilości 34nmoli folianu/mg, zależnie od zmian pH, temperatury i siły jonowej buforu. Szereg danych doświadczalnych przemawia pośrednio za tym, że błonowe białko wiążące folian rzeczywiście uczestniczy w transporcie folianu do komórek. Obserwuje się na przykład maksimum pobierania folianu przez komórki, jak i maksimum wiązania folianu przez oczyszczone białko przy tym samym stężeniu folianu. Bezpośrednim potwierdzeniem hipotezy o nośnikowej roli białka błon komórek bakteryjnych w transporcie folianu byłaby jednak tylko rekonstrukcja układu czynnego w pobieraniu folianu z oczyszczonego białka wiążącego folian i układu komórkowego pozbawionego tego białka.

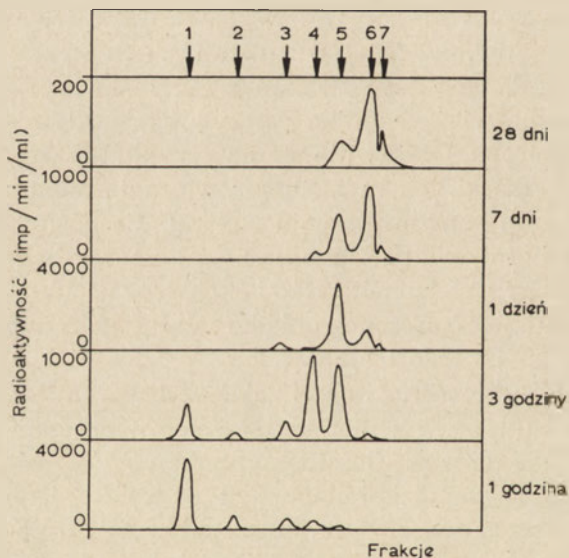
Ilość białka wiążącego folian w błonach *L. casei* zależy od warunków, w jakich prowadzi się hodowlę bakterii. Z komórek rosnących w obecności dużych stężeń folianu izoluje się mniejsze ilości tego białka niż z komórek rosnących w pożywce z niższą zawartością folianu. Jak już wspomniano powyżej, komórki bakteryjne rosnące w pożywce zubożonej w folian pobierają ten związek ze środowiska znacznie efektywniej niż komórki z hodowli kontrolnych. Można zatem mówić o pewnej odwrotnej równoległości pomiędzy intensywnością pobierania folianu przez komórki a ilością w błonach komórek *L. casei* białka wiążącego folian (145). Współzależność ta niewątpliwie stanowi jeden z komórkowych mechanizmów regulujących.

Za inną możliwością metabolicznej kontroli pobierania folianu wskazują wyniki uzyskane przy badaniu tego procesu w komórkach *P. cerevisiae* 8041 oraz w komórkach mutanta, 8041/S zdolnego do wzrostu w obecności 1000 krotnie niższych stężeń folianu ($2,2 \times 10^{-6} \text{M}$) niż szczep wyjś-

ciowy (149, 152). Okazało się mianowicie, że podczas preinkubacji tych komórek w temperaturze 37°C następuje uwalnianie od środowiska inkubacyjnego inhibitora, który w sposób kompetytywny hamuje pobieranie folianu przez niepreinkubowane komórki *P. cerevisiae* 8041/S. Byłby to mechanizm analogiczny do mechanizmu hamowania wbudowywania radioaktywnych prekursorów białek, RNA i DNA przez inhibitory uwalniane w podobnych warunkach przez niektóre komórki nowotworowe (154—156).

III-3. Przemiany folianu w tkankach ssaków

W efekcie podania zwierzętom folianu jego pochodne nagromadzają się w różnych narządach. Najwyższą akumulację podanego dootrzewnowo folianu stwierdzano w wątrobie (14, 23, 115, 157) obserwując przy tym znaczne różnice w wykorzystaniu podanej ilości folianu przez zwierzęta różnych gatunków (157). W mniejszych ilościach niż w wątrobie odnajdywano pochodne radioaktywnego folianu w nerkach, mięśniach szkieletowych czy w mięśniu sercowym oraz w nabłonku śluzówki jelita (23).



Ryc. 5. Poliglutaminiany folianowe z wątroby szczura oznaczane w różnym czasie po iniekcji radioaktywnego folianu (16, zmodyfikowany). W wyizolowanych pochodnych folianu rozszczepiano reduktywnie wiązanie pomiędzy C-9 a N-10, a następnie oddzielone radioaktywne poliglutaminiany chromatografowano na kolumnie z DEAE-celulozy. Cyfry 1 do 7 oznaczają liczbę reszt kwasu glutaminowego w cząsteczce.

Stosując folian znakowany węglem w reszcie kwasu glutaminowego prześledzono przebieg syntezy poliglutaminianów folianowych w wątrobie szczura w okresie 4 tygodni od momentu iniekcji radioaktywnego związku (16). W doświadczeniach tych zajęto się prześledzeniem etapów syntezy fragmentu poliglutaminianowego cząsteczki folianu, nie badano natomiast przemian fragmentu pterydynowego.

Ilość radioaktywnych poliglutaminianów pochodnych folianowych w wątrobie nie przewyższająca 24 godziny po iniekcji folianu 50% podanej

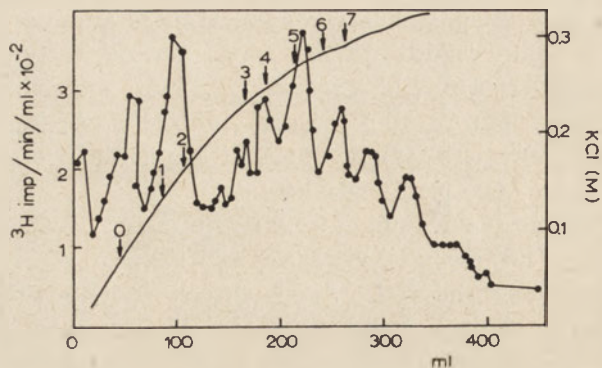
ilości spadała w miarę upływu czasu, a pewną radioaktywność znajdowano w poliglutaminianach folianowych wątroby nawet po upływie 4 tygodni. Jak przedstawiono na rycinie 5 monoglutaminiany folianowe wykrywa się tylko w pierwszych godzinach po iniekcji folianu. Później zaś radioaktywność stwierdza się przede wszystkim w pięcio- i sześcioglutaminianach folianowych. Po 4 tygodniach znakowane siedmioglutaminiany folianu stanowią 25% ogólnej sumy radioaktywności znajdowanej w tym dniu. Stopniowy i długotrwały wzrost piętna w siedmioglutaminianach folianowych, przy jednoczesnym spadku ogólnej radioaktywności w pochodnych folianowych w wątrobie, ilustruje jak wolno w organizmie postępuje synteza i nagromadzanie się tego typu związków.

Stopniową syntezę poliglutaminianów folianu wykazano także w badaniach wątroby świnki morskiej (17), owcy (19) oraz małpy (22).

Wykazano ponadto, że poziom oraz rodzaj pochodnych folianowych znajdujących w wątrobie po iniekcjach radioaktywnego folianu zmienia się w zależności od stanu fizjologicznego zwierzęcia (158), co szczególnie wyraźnie zaznacza się w warunkach niedoboru witaminy B₁₂ (159—162, biotyny (163—166), ryboflawiny (167) lub pod wpływem takich hormonów jak testosteron (168), czy tyroksyna (169) oraz po podaniu większych ilości metioniny (162, 170, 171). Tak na przykład w wątrobie owiec, które wykazywały typowe symptomy niedoboru witaminy B₁₂, znaleziono mniejsze ilości tetrahydrofolianu i formylotetrahydrofolianu przy niezmiennych ilościach metylotetrahydrofolianu, niż w wątrobie zwierząt kontrolnych (159, 170). Co więcej, że w miarę pogłębiania się objawów niedoboru witaminy B₁₂, wykrywano w wątrobie coraz mniejsze ilości poliglutaminianów o dużej liczbie reszt glutaminianowych w cząsteczce. Niejednokrotnie stwierdzane zmiany w ilościach poszczególnych pochodnych folianowych w wątrobie zwierząt eksperymentalnych interpretuje się jako wynik obniżania, na skutek niedoboru witamin czy też działania hormonów, aktywności określonych enzymów uczestniczących w biosyntezie pochodnych folianowych. W odróżnieniu od powyżej omówionych efektów, podanie zwierzętom metioniny, bądź to w iniekcjach (159), bądź też w zwiększonych ilościach w pokarmie (162) powodowało bardzo wyraźny wzrost ilości poliglutaminianów folianowych, podwyższając jednocześnie stężenie tetrahydrofolianu i formylotetrahydrofolianu w komórkach wątrobowych.

Ostatnio wykazano, że analog folianu, ametoptyryna, wstrzyknięta szczurom czy też świnkom morskim na kilka godzin przed radioaktywnym folianem, w znacznym stopniu obniża wbudowywanie tego związku do komórek wątroby, a zwiększa bardzo wydatnie ilość niezmetabolizowanego folianu w moczu (147, 172). Ponadto wbrew temu, co można było oczekiwać mający hamujący efekt ametoptyryny na aktywność reduktazy dihydrofolianowej, po podaniu ametoptyryny wykrywa się w wątrobie szczurów poliglutaminiany zredukowanych pochodnych folianowych

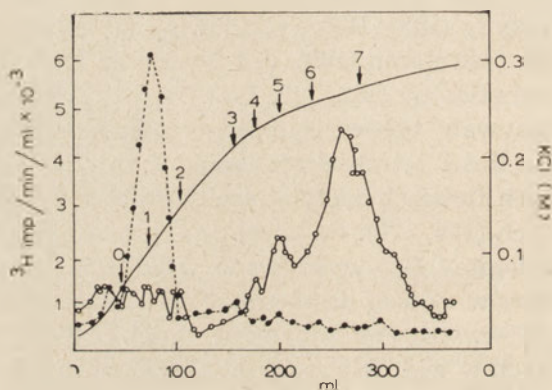
o krótszym, niż w warunkach normalnych, łańcuchu peptydowym, a nie znajduje poliglutaminianów niezredukowanych pochodnych folianu (147, 173). Można zatem sądzić, że syntetaza poliglutaminianowa wykorzystuje jako substrat przede wszystkim zredukowane pochodne folianowe.



Ryc. 6. Poliglutaminiany folianowe z komórek śluzówki jelita mały, *Cynamolgus* sp., oznaczane 72 godziny po iniekcji radioaktywnego folianu (23)

W wyizolowanych pochodnych folianu wiązanie pomiędzy C—9 a N—10 rozszczepiano przy użyciu KMnO_4 , a oddzielone poliglutaminiany chromatografowano na kolumnie z DEAE-celulozy. Cyfry 1 do 7 oznaczają liczbę reszt kwasu glutaminowego w cząsteczce.

Ryc. 7. Poliglutaminiany folianowe z nerek mały, *Cynamolgus* sp., oznaczane 24 h (●—●—●) i 72 godziny (○—○—○) po iniekcji radioaktywnego folianu (23). Postępowanie i oznaczenia jak na rycinie 6.



Obecność poliglutaminianów pochodnych folianowych wykazano także w komórkach śluzówki jelita mały (23) (Ryc. 6). W świetle dotychczasowych poglądów na temat absorpcji w jelicie różnych związków folianowych było to obserwacją zaskakującą. Sądzono bowiem, że przede wszystkim w komórkach śluzówki zachodzi hydroliza poliglutaminianów pochodnych folianowych a nie procesy ich biosyntezy (23).

W odróżnieniu od wątroby ssaków, w której znaczne ilości poliglutaminianów folianu pojawiały się wkrótce po iniekcji radioaktywnego związku, w nerkach mały przemiany folianu przebiegały bardzo powoli, tak że nawet po upływie doby wykrywano praktycznie tylko folian, a jego poliglutaminianowe pochodne pojawiały się dopiero po upływie 72 godzin (Ryc. 7). Wydaje się zatem, że w nerkach albo aktywność syntetazy poliglutaminianów folianu jest bardzo niska, albo, że w komórkach nerkowych zbyt wolno następuje konwersja folianu do tetrahydrofolianu, właściwego substratu tego enzymu (23).

III-4. Przemiany folianu w hodowanych *in vitro* komórkach ssaków

Komórki hodowane *in vitro* stanowią prostszy i bardziej jednorodny niż zwierzęta model doświadczalny do badania metabolizmu komórkowego. Komórkowe pochodne folianowe, podobnie jak pochodne te znajdowane w różnych narządach zwierząt wyższych, występują w formie mono- i poliglutaminianów (30, 131, 174—176). Ilość ich w przeliczeniu na 10^9 komórek jest na ogół rzędu kilku lub kilkunastu nmoli. Niektóre linie komórkowe, np. komórki wątrobiaka Yoshida odznaczają się wysokim poziomem pochodnych folianu, podczas gdy inne np. komórki L czy L5178Y zawierają te związki w ilościach kilkakrotnie mniejszych (Tabela 3). Komórki leukemiczne L1210 oraz komórki mutanta (L1210/R6), charakteryzującego się podwyższonym poziomem reduktazy dihydrofolianowej i opornością na działanie ametoptyryny, zawierały jednak pochodne folianowe w podobnych ilościach.

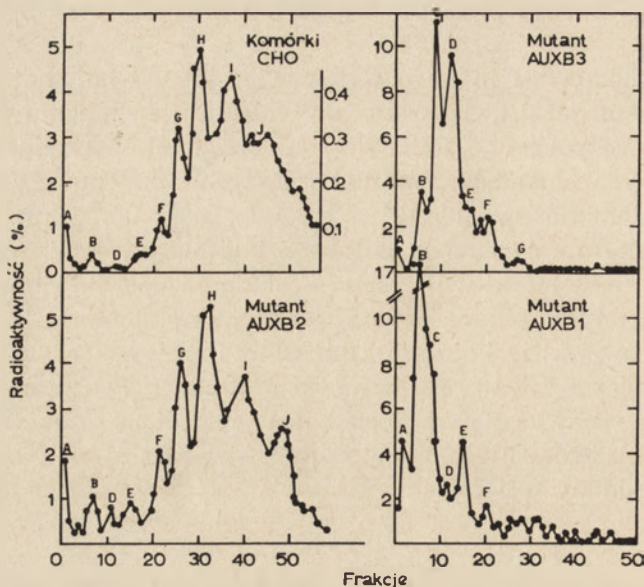
Tabela 3

Poziom pochodnych folianu w niektórych liniach komórkowych
(z danych 30)

Komórki	Pochodne folianu (nmole/ 10^9 komórek)	
	przed traktowaniem	po traktowaniu glutamylo- γ -karboksypeptydazą
Yoshida	16,2	35,2
L5178Y	6,7	15,2
L	4,0	8,7
L1210	8,4	23,7
L1210/R6	8,1	30,0

Poziom pochodnych folianu oznaczany mikrobiologicznie przy zastosowaniu *L.casei*. L1210/R6 jest mutantem komórek L1210, oporony na działanie ametoptyryny i charakteryzującym się podwyższonym poziomem reduktazy dihydrofolianowej.

Szczególnie dużo informacji na temat mechanizmów syntezy poliglutaminianów folianowych uzyskano badając komórki linii wyhodowanej z jajnika chomika chińskiego (CHO) oraz kilku mutantów będących autotrofami jednocześnie w stosunku do glicyny (AUXB₂), do glicyny i adenozyiny (AUXB₃) oraz glicyny, adenozyiny i tymidyny (AUXB₁) (174). Pochodne folianowe występowały w komórkach tych mutantów w mniejszych ilościach niż w komórkach CHO (10 i 40% odpowiednio w komórkach AUXB₁ i AUXB₃), różne też były rodzaje pochodnych folianowych znajdowane w poszczególnych typach komórek (Ryc. 8). W komórkach linii wyjściowej przeważały poliglutaminiany różnych zredukowanych pochodnych folianowych, dwu- a zwłaszcza monoglutaminiany folianowe zaś występowały w tych komórkach tylko w ilościach śladowych. Jak widać na rycinie 8 jedynie profil pochodnych folianowych z komórek mutanta au-



Ryc. 8. Pochodne folianowe z komórek wyizolowanych z jajnika chomika chińskiego (CHO) oraz z komórek jego trzech mutantów (174).

Po 48 godzinach hodowli w obecności radioaktywnego folianu i po 24 godzinach hodowli w środowisku niezawierającym folianu, ekstrahowano komórkowe pochodne folianowe i rozdzielono je na kolumnie z DEAE-celulozy. Litery oznaczają poszczególne pochodne folianowe: A — produkty rozkładu PteGlu; B — 10-formylo- H_4 PteGlu; C — 5-formylo- H_4 PteGlu i 10-formylo- H_4 PteGlu; D — 5-metylo- H_4 PteGlu, 5-formylo- H_4 PteGlu, i 10-formylo- H_4 PteGlu; E — H_4 PteGlu; F — 5-metylo- H_4 PteGlu, i 5-formylo- H_4 PteGlu; G — 10-formylo- H_4 PteGlu, 5-metylo- H_4 PteGlu, H_4 PteGlu; H — 5-formylo- H_4 PteGlu; I — 5-metylo- H_4 PteGlu; J — H_4 PteGlu.

ksotroficzny w stosunku do glicyny (AUXB₂) był zbliżony do profilu pochodnych folianowych z macierzystych komórek linii CHO, podczas gdy pozostałe mutanty charakteryzowała obecność niemal wyłącznie monoglutaminianów folianowych i bardzo niewielkich ilości dwu- i trójglutaminianów. Wydaje się zatem, że auksotrofia badanych mutantów, przede wszystkim w stosunku do adenozyiny i tymidyny, wynika z upośledzenia w nich aktywności syntetazy poliglutaminowej. Przemawia za tym przypuszczeniem fenotypowa rewersja mutantów AUXB₁ i AUXB₃ do pełnej prototrofii wobec badanych związków, gdy hoduje się je w środowisku zawierającym zwiększone ilości folianu lub formylotetrahydrofolianu. Szczegółowe badania mutantu AUXB₁, a zwłaszcza jego termowrażliwego klonu — tsAUXB₁, przyczyniły się znacznie do częściowego wyjaśnienia właściwości syntetazy poliglutaminianów w tych komórkach (175). Komórki klonu tsAUXB₁ wymagają obecności w pożywce glicyny, adenozyiny i tymidyny, aby mogły rosnąć w temperaturze 38,5°C, podczas gdy w temperaturze 34°C zachowują się jak typowe komórki prototroficzne. Co więcej w komórkach hodowanych w temperaturze 34°C znajdowano dwu- i trójglutaminiany folianowe, a ogólna ilość pochodnych folianowych była pięciokrotnie wyższa, niż ilość tych pochodnych w komórkach

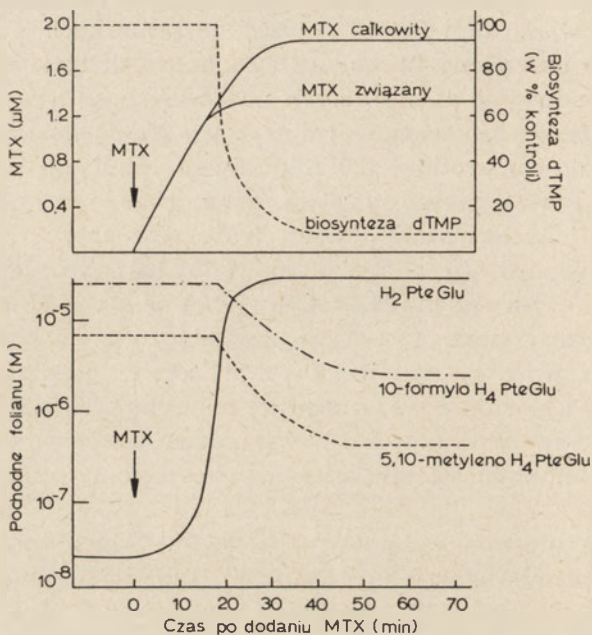
hodowanych w 38°C. Pochodne dwu- i trójskładaminianowe pojawiały się również w komórkach przeniesionych z 38,5°C do 34°C, lecz tylko przy niezakłóconym przebiegu biosyntezy białka w komórkach. Tak więc wydaje się, że w komórkach klonu tsAUXB₁ enzym syntetyzujący poliglutaminiany folianu jest wysoce termolabilny i ulega inaktywacji już w temperaturze 38,5°C, co stanowić może bezpośrednią przyczynę niewielkiej i mało zróżnicowanej puli folianowej w tych komórkach.

Komórkowe przemiany pochodnych folianowych bada się często przy zastosowaniu podwójnie znakowanych pochodnych, w których ¹⁴C występował w jednostce jednowęglowej a tryt we fragmencie pterydynowym (121, 122). I tak, po krótkiej (20 minutowej) inkubacji komórek L1210 z 5-formylo-H₄PteGlu piętno ¹⁴C stwierdzono przede wszystkim w metenilo-H₄PteGlu i 10-formylo-H₄PteGlu (95% radioaktywności) (121). Radioaktywność pochodząca z ³H znajdowano zaś głównie w 5-metylo-H₄PteGlu lub 5,10-metyleno-H₄PteGlu (70%) oraz w 5,10-metenilo i 10-formylotetrahydrofolianie (25%). Ta niemal całkowita konwersja 5-formylo-H₄PteGlu w inne jednowęgłowe pochodne tetrahydrofolianu ilustruje szybkość i kierunek jego przemian w komórkach L1210. Nie wiadomo jednak nic, czy w omawianych warunkach eksperymentalnych tworzyły się w komórkach poliglutaminiany koenzymatycznych form folianu.

Komórkowe przemiany 5-metylo-H₄PteGlu będąc innym torem niż przemiany 5-formylo-H₄PteGlu (122). W rezultacie inkubacji komórek L5178Y z 5-metylo-H₄PteGlu podwójnie znakowanym ¹⁴C i trytem już po 5 minutach 85% radioaktywności pochodzącej z ¹⁴C jednostki jednowęglowej wykrywano w metioninie, a po godzinie we frakcjach białkowych. Natomiast, nawet po godzinnej inkubacji komórek L5178Y z 5-metylo-H₄PteGlu blisko 90% radioaktywnego trytu tetrahydrofolianu pozostawało w 5-metylo-H₄PteGlu. Wyniki powyższe wskazują, że w tym czasie tetrahydrofolian uwalniany z 5-metylo-H₄PteGlu został wykorzystany przede wszystkim do utrzymania wewnątrzkomórkowej puli właśnie 5-metylo-H₄PteGlu. Zwraca uwagę brak obecności w komórkach L5178Y znakowanych poliglutaminianów metylo-H₄PteGlu. Nie wydaje się jednak, ażeby stosunkowo krótka (1 godzinna) inkubacja komórek z metylo-H₄PteGlu, jak i też i niezastosowanie podczas ekstrakcji pochodnych folianowych środków inaktywujących wewnątrzkomórkowe glutamylokarboksypeptydazy mogły być odpowiedzialne za ten stan rzeczy (122). Podobnie bowiem po inkubacji z 5-metylo-H₄PteGlu z ludzkimi limfocytami nie wykazano w nich obecności poliglutaminianów tej pochodnej tetrahydrofolianu (138), które wykrywa się w komórkach ssaków *in vivo* w znacznych ilościach. Pozostaje zatem do wyjaśnienia jaki jest mechanizm powstawania poliglutaminianów metylo-H₄PteGlu w organizmie zwierzęcym.

Dane na temat wielkości puli pochodnych folianowych w komórkach

L1210, wewnątrzkomórkowego stężenia związków, w przemianach których uczestniczą pochodne folianowe, oraz szereg danych kinetycznych uzyskanych przy badaniu właściwości enzymów folianowych posłużyły Jacksonowi i Harrapowi (177) do opracowania matematycznego modelu metabolizmu folianu. Model ten okazał się bardzo przydatny

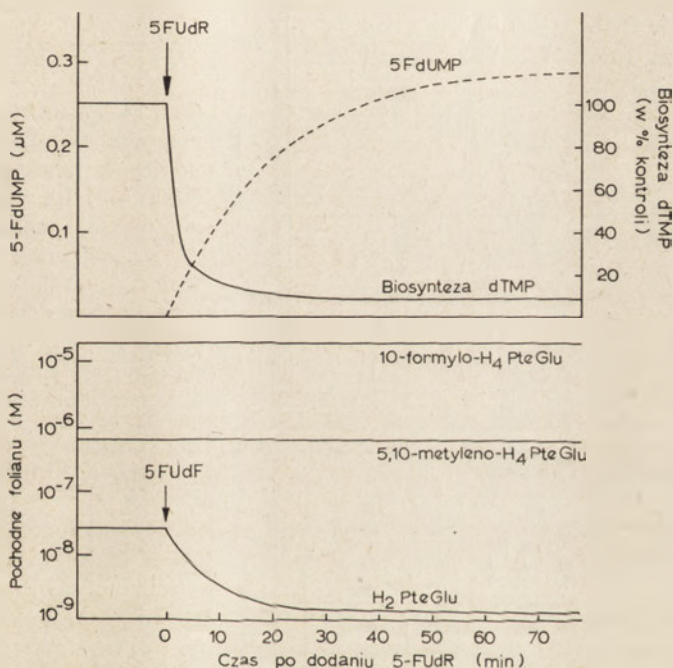


Ryc. 9. Hipotetyczny model wpływu ametoptyryny dodanej do środowiska hodowlanego (w st. 10^{-6} M) na intensywność biosyntezy tymidyny oraz poziom pochodnych folianowych w komórkach L1210 (177).

W górnym fragmencie ryciny ciągłymi liniami oznaczono całkowity wewnątrzkomórkowy poziom ametoptyryny (MTX) oraz poziom ametoptyryny związanej prawdopodobnie z reduktazą dihydrofolianową.

do porównawczych badań wpływu ametoptyryny i fluorodezoksyurydyny na metabolizm folianu w komórkach L1210 (Ryc. 9 i 10). Przyjawszy założenie, że ametoptyryna pobrana przez komórki powoduje przede wszystkim zahamowanie aktywności reduktazy dihydrofolianowej, opracowano model wpływu tych związków zarówno na wewnątrzkomórkowe stężenie różnych pochodnych folianowych, jak też na efektywność biosyntezy tymidyny w tych komórkach. Według tego modelu zarówno ametoptyryna, jak i FUDR, hamują niemal całkowicie syntezę tymidylanu, chociaż po różnym okresie czasu od dodania do ich pożywki. Różny natomiast miałby być efekt tych związków na wewnątrzkomórkowy poziom pochodnych folianowych. Ametoptyryna miałaby powodować nagromadzenie się w komórkach dihydrofolianu oraz zmniejszenie poziomu 10-formylo- oraz 5,10-metyleno- H_4 PteGlu, podczas gdy FUDR obniżając stężenie dihydrofolianu miałby nie zmieniać poziomu innych pochodnych folianowych.

Niektóre wyliczone i podane na rycinach 9 i 10 wartości uzyskały już potwierdzenie eksperymentalne (177). W komórkach CHO jednakże nie udało się dotąd wykazać wewnątrzkomórkowej akumulacji dihydrofolianu pod wpływem ametoptyeryny (176). Tak więc hipoteza zakładająca, że zawsze przyczyną wszystkich efektów biologicznych ametoptyeryny, w tym zahamowania syntezy tymidyny, puryn czy pewnych aminokwasów, jest zahamowanie przez ten analog aktywności reduktazy dihydrofolianowej, nie znalazła pełnego potwierdzenia. Mc Burney i Whitmore wysuwają przypuszczenie, że w badanym przez nich układzie komórkowym obserwowane efekty biologiczne ametoptyeryny wywodzą się także z bezpośredniego zahamowania aktywności syntetazy tymidylanowej i enzymu(ów) folianowych uczestniczących w biosyntezie puryn (176).



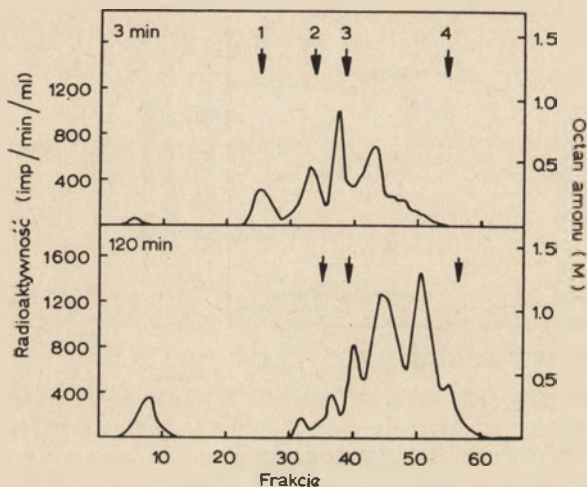
Ryc. 10. Hipotetyczny model wpływu 5-fluorodezoksyurydyny dodanej do środowiska (w st. $5 \times 10^{-7} \text{M}$) na intensywność biosyntezy tymidyny oraz poziom pochodnych folianowych w komórkach L1210 (177).

W górnym fragmencie ryciny linią przerywaną oznaczono przyrost wewnątrzkomórkowego stężenia 5-fluorodezoksyurydynomonosfosforanu.

Chociaż model matematyczny Jacksona i Harrapa nie jest modelem kompletnym i nie uwzględnia wszystkich możliwych powiązań metabolicznych pochodnych folianowych, to jednak wydaje się, że może on znaleźć pewne zastosowanie w próbach zbadania mechanizmu oporności komórek na analogi folianu.

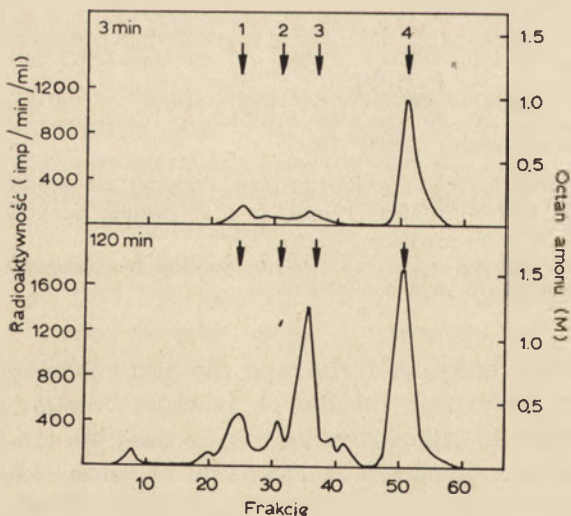
III-5. Przemiany folianu w bakteriach

W badaniach z zastosowaniem *L. casei*, *S. faecalis* czy też *P. cerevisiae* stwierdzono bardzo wyraźny wpływ stężenia egzogenego folianu nie tylko na ilość, ale przede wszystkim na rodzaj pochodnych folianowych obecnych w komórkach (8, 146, 152). Tak na przykład w komórkach *P. cerevisiae* (8081/S), inkubowanych przez 3 minuty z folianem w stężeniu $0,22\mu\text{M}$ (Ryc. 11), wykrywano metyleno- H_4PteGlu , 5-formylo- H_4PteGlu i 10-formylo- H_4PteGlu oraz ślady poliglutaminianów, nie znaleziono natomiast niezmetabolizowanego folianu (152). Po dłuższej, trwającej 120 minut inkubacji większość radioaktywności wykrywano we frakcjach zidentyfikowanych wstępnie jako poliglutaminiany, o różnej liczbie reszt glutaminianowych, metylenotetrahydrofolianu. Wynik odmienny, a mia-



Ryc. 11. Pochodne folianowe z komórek *P. cerevisiae* 8081/S po ich 3 minutowej lub 120 minutowej inkubacji z radioaktywnym folianem w st. $0,22\mu\text{M}$ (52).

Wyekstrahowanie z komórek foliany chromatografowano na kolumnie z DEAE-celulozy. Cyfry oznaczają poszczególne pochodne folianu: 1 — 10-formylo- H_4PteGlu ; 2 — 5-formylo- H_4PteGlu lub 5-metylo- H_4PteGlu ; 3 — 5,10-metyleno- H_4PteGlu lub H_4PteGlu ; 4 — PteGlu .



Ryc. 12. Pochodne folianowe z komórek *P. cerevisiae* 8081/S po 3 minutowej lub 120 minutowej inkubacji z radioaktywnym folianem w st. $80,2\mu\text{M}$ (152).

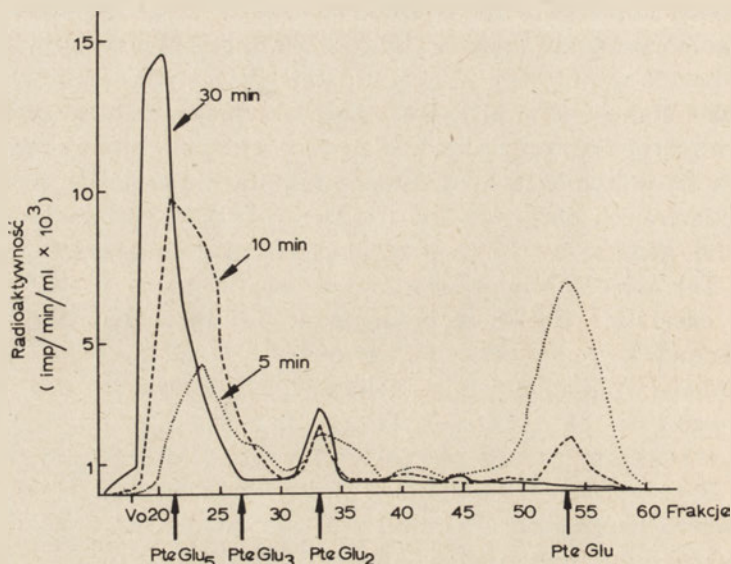
Postępowanie i oznaczenia jak na rycinie 11.

nowicie bardzo wyraźne zahamowanie formowania poliglutaminianów jak również tworzenia różnych uwodorowanych pochodnych folianu stwierdzono w komórkach *P. cerevisiae* 8081/S w wyniku ich inkubacji z egzogennym folianem w wyższym stężeniu (80,8 μM ; Ryc. 12). Po 3 minutowej inkubacji komórek z folianem w tym stężeniu aż 70% radioaktywności w komórkach związanych było z niezmetabolizowanym folianem, a dopiero po 120 minutowej inkubacji pojawiały się w komórkach *P. cerevisiae* obok folianu (40%) niektóre jego pochodne, przede wszystkim metylenotetrahydrofolian oraz niewielkie ilości jego poliglutaminianów. Brak pojawiania się w komórkach badanego mutantu *P. cerevisiae* poliglutaminianów folianowych obserwowano również wówczas, gdy bakterie te preinkubowano godzinę w 37°C przed dodaniem radioaktywnego folianu (0,22 μM). Tak więc inhibitor uwalniający się w czasie preinkubacji komórek *P. cerevisiae* 8081/S wpływa na ilość a także na rodzaj pochodnych folianowych znajdujących w komórkach (152).

Inną intensywnością przemian folianu niż *P. cerevisiae* 8081/S odznacza się *L. casei* (8, 146, 148). W wyniku 5-cio a nawet dziesięciominutowej inkubacji z folianem w stężeniu 10-krotnie niższym (0,025 μM) niż stosowano dla *P. cerevisiae*, w komórkach wykrywano niezmetabolizowany folian, a dopiero po upływie 30 minut radioaktywność znajdowano wyłącznie we frakcji poliglutaminianów folianu o liczbie reszt glutaminianowych powyżej 5 (Ryc. 13). W innej serii doświadczeń z *L. casei* wykazano brak formowania poliglutaminianów folianowych także i wówczas, gdy stężenie egzogenego folianu wynosiło zaledwie 0,5 μM (146). Pewne wzmożenie intensywności przemian nagromadzonego w tych warunkach w komórkach *L. casei* folianu następowało dopiero po ich inkubacji w środowisku bez folianu. Po upływie godziny w komórkach występowały już obok folianu jego różne poliglutaminiany (Ryc. 14). Podobnie wyglądało rozmieszczenie radioaktywności w pochodnych folianowych, gdy reinkubację komórek *L. casei* prowadzono w środowisku zawierającym nadmiar nieznakowanego folianu (50 μM), jednakże całkowity poziom radioaktywności w komórkach był wówczas niższy. Gdy natomiast reinkubacja komórek *L. casei* miała miejsce w obecności kwasu jodooctowego i azydku sodu podwyższeniu ogólnej ilości radioaktywności w komórkach (najprawdopodobniej na skutek zahamowania wypływu pochodnych folianu z komórek) towarzyszyło między innymi wybiórcze nagromadzanie się w nich 10-formyloPteGlu₂ a obniżenie ilości wyższych poliglutaminianów (Ryc. 14). Analiza radioaktywnych folianów w środowisku, w którym przeprowadzano reinkubację komórek, wykazała obecność w nim folianu, formylofolianu oraz formyloPteGlu₂, a więc związków znajdujących w komórkach.

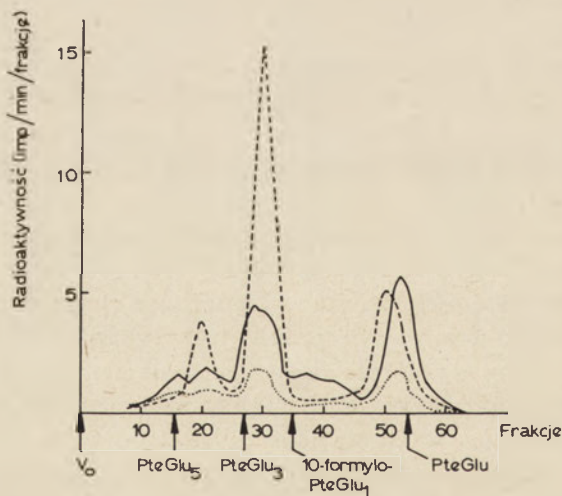
Zwraca uwagę obserwacja, że przy zastosowaniu folianu w stężeniu 0,5 μM tworzyły się w komórkach *L. casei* jedynie bardzo niewielkie ilości poliglutaminianów o większej niż 3 liczbie reszt glutaminianowych

w cząsteczce. Wnioskowano zatem, że synteza trójglutaminianów stanowi w komórkach *L. casei* etap ograniczający wewnątrzkomórkowe przemiany folianu. Gdy jednak egzogeny folian zastosowano w stężeniu 70 krotnie niższym (7nM), w komórkach *L. casei* wykrywano poliglutaminiany o dłu-



Ryc. 13. Pochodne folianowe z komórek *L. casei* oznaczane po 5, 10 i 30 minutowej inkubacji z radioaktywnym folianem w stężeniu $0,025\mu\text{M}$ (8).

Wyekstrahowane pochodne folianowe chromatografowano na kolumnie Sephadex G-15.



Ryc. 14. Pochodne folianowe z komórek *L. casei* inkubowanych przez 5 minut z radioaktywnym folianem, a następnie przeniesione na godzinę do środowiska bez folianu (—), z radioaktywnym folianem ($50\mu\text{M}$,), oraz z kwasem jodooctowym (20mM) i azydkiem sodu (50mM) (— — —) (146).

Wyekstrahowane pochodne folianowe chromatografowano na kolumnie Sephadex G-25.

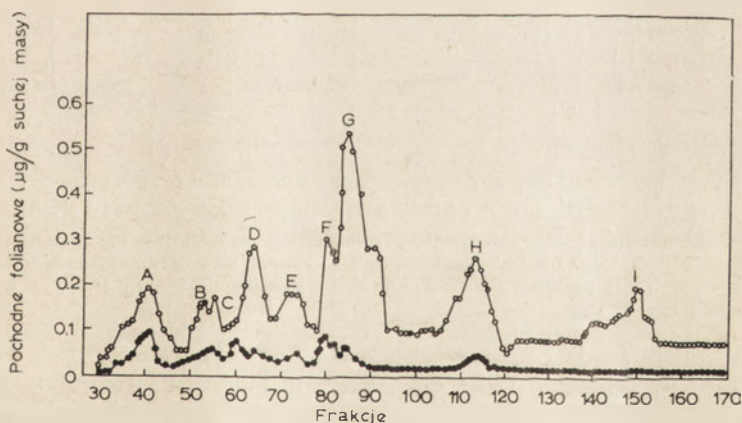
gim łańcuchu (o liczbie reszt glutaminianowych powyżej 3). Reinkubacja tych komórek w środowisku bez folianu prowadziła do pojawienia się w nich jeszcze dłuższych poliglutaminianów pochodnych folianowych, które nie uwalniały się do środowiska inkubacyjnego.

Podobnie, jak wykazano to w badaniach komórkowego metabolizmu folianu zwierząt wyższych, ametoptyryna zakłócała przemiany folianu także w bakteriach (147, 148, 153). Tak na przykład w komórkach *L. casei* po ich preinkubacji z ametoptyryną ($0,025\mu\text{M}$) stwierdzano podwyższenie ilości niezmetabolizowanego folianu oraz poliglutaminianów o krótszych łańcuchach, przy spadku ilości bardziej złożonych poliglutaminianów. Zahamowanie przez ametoptyrynę syntezy dłuższych poliglutaminianów folianu obserwowano także i wówczas, gdy komórki inkubowano z 5-formylotetrahydrofolianem, lecz efekt ten zaznaczał się słabiej niż w przypadku folianu.

III-6. Przemiany folianu w komórkach grzybów

Stosując ten układ doświadczalny badano przede wszystkim mechanizmy przemian pochodnych folianowych pod wpływem niektórych aminokwasów.

Wykazano, że w wyniku wzrostu *Saccharomyces cerevisiae* w środowisku zawierającym zwiększone ilości metioniny ($2,5\mu\text{mola/ml}$) wielkość wewnątrzkomórkowej puli folianów ulegała dwukrotnemu obniżeniu w porównaniu z pulą folianów wykrywaną w komórkach rosnących w pożywce kontrolnej (9). Zmniejszenie ilości folianów komórkowych w tych warunkach wiąże się przede wszystkim z drastycznym zmniejszeniem ilości mono-, dwu- i trójglutaminianów 5-metylotetrahydrofolianu jak również,

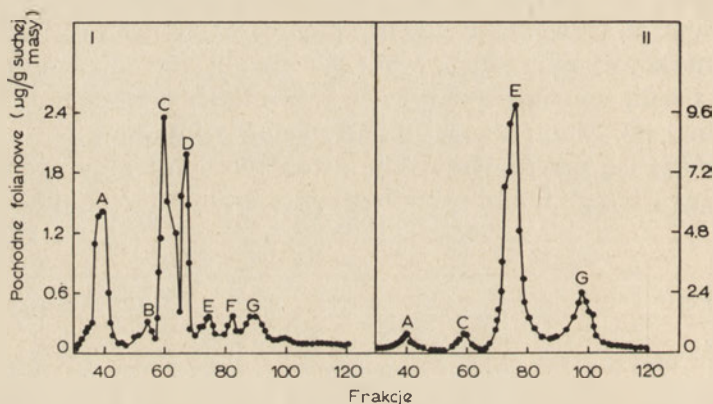


Ryc. 15. Pochodne folianowe z komórek *Saccharomyces cerevisiae* hodowanych w środowisku kontrolnym (O) oraz w środowisku z dodatkiem metioniny ($2,5\mu\text{mola/ml}$; ●) (9)

Ekstrakty komórkowe po traktowaniu glutamyl- γ -karboksypeptydazą chromatografowano na kolumnie z DEAE-celulozy. Ilości pochodnych folianu oznaczano mikrobiologicznie. Litery oznaczają poszczególne pochodne folianowe: A — 10-formylo- H_4PteGlu ; B — 10-formylo- $\text{H}_4\text{PteGlu}_2$; C — 5-formylo- H_4PteGlu ; D — 5-metylo- H_4PteGlu ; E — H_4PteGlu ; F — 5-formylo- $\text{H}_4\text{PteGlu}_2$; D — 5-metylo- $\text{H}_4\text{PteGlu}_2$; H — 5-metylo- $\text{H}_4\text{PteGlu}_3$; I — niezidentyfikowane poliglutaminiany folianowe.

choć w niższym stopniu, i innych pochodnych folianu (Ryc. 15). Przypuszczano, że interkonwersja pochodnych folianowych w komórkach *S. cerevisiae* pod wpływem metioniny może być efektem zmian aktywności niektórych enzymów folianowych (9, 178). Okazało się, że rzeczywiście komórki *S. cerevisiae* rosnące tylko przez kilka godzin w obecności wyższych niż normalnie ilości metioniny wykazują niższą aktywność oksydoreduktazy metylenotetrahydrofolianu (Ryc. 2, reakcja 4) (9) oraz syntetazy metioninowej (178). Wydaje się przeto, że metionina reguluje wielkość puli folianowej w komórkach *S. cerevisiae* poprzez wpływ na biogenezę grup metylowych oraz ich wykorzystanie w metabolizmie komórkowym.

Inny wpływ na metabolizm folianu w komórkach *N. crassa* wywierała glicyna (179), prekursor jednostek jednowęglowych o stopniu utlenienia mrówczanu. W przeciwieństwie do metioniny, po dodaniu do środowiska hodowlanego *N. crassa* glicyny następował kilkakrotny wzrost zawartości pochodnych folianów w komórkach, przy czym bardzo wyraźnym zmianom ulegały stosunki ilościowe pomiędzy poszczególnymi pochodnymi (Ryc. 16). Tak więc gdy komórki *N. crassa* rosły w obecności dodatko-



Ryc. 16. Pochodne folianowe z komórek *Neurospora crassa* hodowanych w środowisku bez (I) lub z dodatkiem glicyny (1 µmol/ml; II) (179)

Po traktowaniu glutamyl- γ -karboksypeptydazą ekstrakty komórkowe chromatografowano na kolumnie z DEAE-celulozy. Ilość pochodnych folianu oznaczano mikrobiologicznie. Litery oznaczają poszczególne pochodne folianowe jak na rycinie 15.

wych ilości glicyny najwyższą radioaktywność wykrywano w tetrahydrofolianie oraz w 5-metylo- H_4 PteGlu. Frakcja zidentyfikowana jako H_4 PteGlu mogła jednak zawierać w rzeczywistości metylenotetrahydrofolian, który uległ rozkładowi w zastosowanych warunkach ekstrakcji i chromatografii. Komórki *N. crassa* rosnące przez 22 godziny w obecności glicyny o wyższym stężeniu charakteryzowało także podwyższenie poziomu aktywności enzymów folianowych uczestniczących w przemianach metylenotetrahydrofolianu (50, 173). Ponadto komórki *N. crassa* rosnące w środowisku wzbogaconym w glicynę pobierają ze środowiska ten aminokwas i me-

tabolizują go bardziej efektywnie niż komórki rosnące w środowisku kontrolnym. Można zatem przypuszczać, że intensyfikacja komórkowych przemian glicyny bezpośrednio, a pośrednio wzrost aktywności enzymów folianowych, powodują wybiórcze nagromadzenie się w komórkach *N. crassa* określonej pochodnej folianowej.

IV. Poliglutaminiany folianowe jako związki metabolicznie czynne

W rozdziale tym zostaną przedstawione dane wskazujące, że poliglutaminiany folianowe uczestniczą w metabolizmie komórkowym. Pochodne te mogą być substratami pewnych enzymów folianowych takich jak syntetaza formylotetrahydrofolianowa (180), cyklodeaminaza formiminotetrahydrofolianu (181), hydroksymetylotransferaza serynowa (4, 182, 183), reduktaza dihydrofolianowa (184—186), enzymy uczestniczące w syntezie metioniny (11, 187—192) oraz syntetaza tymidylanowa (193—196). Ponadto, poliglutaminiany koenzymatycznych form folianu mogą także działać jak naturalne inhibitory syntetazy tymidylanowej (193—195) oraz reduktazy dihydrofolianowej (195).

IV-1. PteGlu_n jako substraty reduktazy dihydrofolianowej

Pierwsze doniesienia, że poliglutaminiany folianowe obok dihydrofolianu stanowią substraty reduktazy dihydrofolianowej pochodzą już z lat sześćdziesiątych a uzyskano je badając właściwości oczyszczonej reduktazy dihydrofolianowej z grasicy cielęcej (185) oraz wątroby owcy (184). Dokładniejsze jednak wyniki pochodzą z badań ostatnich prowadzonych już przy użyciu syntetycznych poliglutaminianów dihydrofolianu. W tabeli 4 zebrano wyniki doświadczeń, w których porównywano efektywność substratową dihydrofolianu i kilku jego poliglutaminianów (186). W przypadku reduktazy dihydrofolianowej niemal ze wszystkich badanych komórek wartości stałych Michaelisa poliglutaminianów dihydrofolianu były bądź to zbliżone bądź też kilkakrotnie niższe niż wartości K_m dihydrofolianu. Podobnie, trzy z badanych reduktaz charakteryzowały wyższe wartości V_{max} przy użyciu, jako substratów, poliglutaminianów dihydrofolianu w porównaniu z samym dihydrofolianem. Widać zatem, że poliglutaminiany H_2PteGlu są również dobrymi, jeśli nawet nie właściwszymi niż H_2PteGlu substratami reduktazy dihydrofolianowej z wielu badanych komórek.

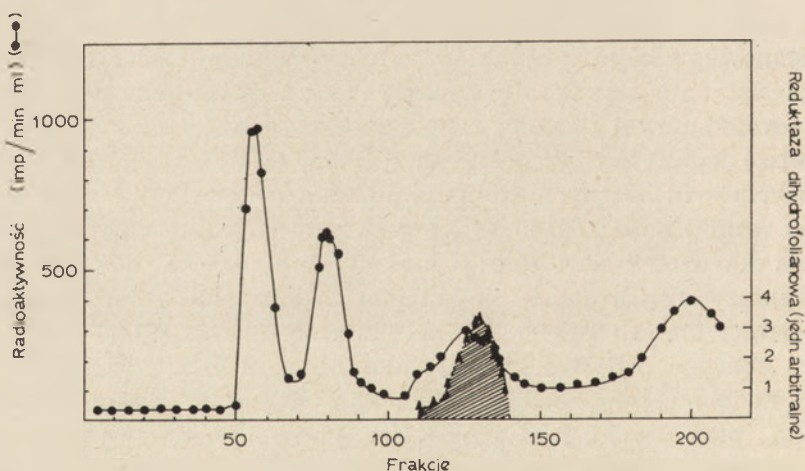
Wykazano ponadto, że poliglutaminiany folianowe występują często w kompleksach z pewnymi frakcjami białek komórkowych o różnym ciężarze cząsteczkowym (197—200), między innymi z reduktazą dihydrofolianową. Kompleks poliglutaminianów folianowych z reduktazą dihydrofolianową stwierdzono na przykład w komórkach wątroby szczura (199) (Ryc. 17) oraz opornych na ametoptyrynę komórkach Sarkomy-180 (200).

Tabela 4

7,8-dihydrofoliany jako substraty reduktaz dihydrofolianowych
(z danych 186)

Źródło enzymu	H ₂ PteGlu		H ₂ PteGlu ₃		H ₂ PteGlu ₅		H ₂ PteGlu ₇	
	K _m (μM)	V _{max} μmole/ godz./ mg białka	K _m (μM)	V _{max} μmole/ godz./ mg białka	K _m (μM)	V _{max} μmole/ godz./ mg białka	K _m (μM)	V _{max} μmole/ godz./ mg białka
L1210/MTX	1,4	190	1,2	170	0,8	403	1,3	496
Erytrocyty	5,9	285	4,2	202	1,3	145	1,3	153
AML	3,6	60	10,0	146	1,5	56	0,6	65
ALL	3,5	480	1,8	447	9,3	953	0,8	386

Stanowi to pewne potwierdzenie przypuszczenia, że w komórkach zwierzęcych naturalnymi substratami tego enzymu mogłyby być poliglutaminy dihydrofolianu. Ponieważ nie znaleziono dotąd różnic w efektywności dihydrofolianu oraz jego trój- i sześcioglutaminianu, użytych jako substratów reduktazy dihydrofolianowej z *L. casei* (196), nie można jeszcze rozstrzygnąć, czy poliglutaminy dihydrofolianu są zawsze właściwymi substratami reduktaz dihydrofolianowych.



Ryc. 17. Białka wiążące folian z supernatantu komórek wątroby szczura izolowane 24 godziny po iniekcji radioaktywnego folianu (199, zmodyfikowany) Białka supernatantu chromatografowano na kolumnie Sephadex G-150. Obszar zakreskowany oznacza frakcje wykazujące aktywność reduktazy dihydrofolianowej.

IV-2. PteGlu_n jako substraty reduktazy metylenotetrahydrofolianu i syntetaz metioninowych

Reduktaza metylenotetrahydrofolianu jak również zależna od witaminy B₁₂ syntetaza metioninowa wykorzystują jako substraty metylo-H₄PteGlu oraz metylo-H₄PteGlu₅ (11, 187, 191, 192). Podobnie, jak w przypadku

reduktazy dihydrofolianowej, metylo- H_4 PteGlu, zastosowany jako substrat enzymów uczestniczących w syntezie metioniny, wykazywał niższe wartości stałych Michaelisa (Tabela 5) niż metylo- H_4 PteGlu. Jak dotąd znana jest tylko jedna synteza metioninowa (wyizolowana z *B. megaterium*) zależna od witaminy B_{12} , która katalizuje metylację homocysteiny wykorzystując wyłącznie poliglutaminiany metylo- H_4 PteGlu (11). Należy podkreślić, że bakterie te syntetyzują witaminę B_{12} , a ich endogenna pula folianowa składa się tylko z pochodnych poliglutaminowych.

Tabela 5

Mono- i pięcioglutaminian 5-metylotetrahydrofolianu jako substraty syntetazy metioninowej i reduktazy metylenotetrahydrofolianu (z danych 191 i 192)

Enzym	Źródło enzymu	metylo- H_4 PteGlu		metylo- H_4 PteGlu ₅	
		K _m (μ M)	V _{max} μ mole/godz./ mg białka	K _m (μ M)	V _{max} μ mole/godz. mg białka
Syntetaza metioninowa	wątroba szczura (191)	25,1	560	7,8	350
	mózg wołu (192)	73,1	5,8	27,7	10,1
Reduktaza metyleno- H_4 PteGlu*	wątroba szczura (191)	45,2	890	6,4	170

* Przebieg reakcji badano w kierunku odwrotnym

Syntetaza metioninowa nie wymagająca witaminy B_{12} do syntezy metioniny z homocysteiny (E.C. 2.1.1.14) wykazuje absolutną specyficzność w stosunku do poliglutaminianów metylo- H_4 PteGlu jako substratów (11, 187, 188—190). Przypuszcza się też, że tylko poliglutaminianowa reszta wiąże substrat folianowy z cząsteczką enzymu z utworzeniem stereospecyficznego kompleksu (188, 189). Endogenna pula folianów w grzybach *Candida utilis* i *Coprinus lagopus*, w których synteza metioniny przebiega bez udziału witaminy B_{12} składa się jedynie z poliglutaminianowych pochodnych folianu (11). Tak więc wydaje się, że specyficzność enzymu wobec poliglutaminianów pochodnych folianowych może mieć związek ze składem komórkowej puli folianów.

IV-3. PteGlu_n jako inhibitory syntetazy tymidylanowej i reduktazy dihydrofolianowej

Pierwsze sugestie co do obecności w komórkach *E. coli* pterydynowe- go inhibitora syntetazy tymidylanowej oraz reduktazy dihydrofolianowej uzyskano w roku 1962 (193). Dopiero jednak ostatnio doniesiono o wyizolowaniu z *E. coli* i zidentyfikowaniu inhibitora syntetazy tymidylanowej jako 5-formylo- H_4 PteGlu₅, a inhibitora reduktazy dihydrofolianowej jako

10-formyloPteGlu₅ (194, 195). W pracowni Friedkina zsyntetyzowano szereg poliglutaminianów 5-formylo-H₄PteGlu oraz innych związków folianowych i przebadano ich aktywność jako inhibitorów powyższych enzymów (Tabela 6). Wyraźnie hamowały aktywność syntetazy tymidylanowej związki zawierające w cząsteczce od 3—6 reszt glutaminianowych. Efekt inhibitora wyizolowanego z *E. coli* był tego samego rzędu co efekt pochodnych syntetycznych z 5 lub 6 resztami glutaminianowymi. Inne pochodne folianu, posiadające jako podstawnik grupę formiminową, metenylową lub też grupę formylową (usytuowaną w pozycji 10), tylko w niewielkim stopniu hamowały aktywność syntetazy tymidylanowej. Jak widać z danych zebranych w tabeli 6 tylko pochodne folianowe z grupą formylową przyłączoną do atomu azotu w pozycji 5 hamowały aktywność tego enzymu z *E. coli*, przy czym ich efektywność wzrastała z liczbą reszt glutaminianowych w cząsteczce. Podobnie, analogiczny wzrost efektywności inhibitorowej poliglutaminianów PteGlu, H₂PteGlu i H₄PteGlu z wydłużaniem łańcucha glutaminianowego zaobserwowano w stosunku do syntetazy tymidylanowej z *L. casei* (196). Występujący w komórkach *E. coli* formylo-H₄PteGlu₅ z łatwością ulega deformylacji do H₄PteGlu₅ pod wpływem transformylaz komórkowych (195). Tak więc można wnioskować, że obniżeniu wewnątrzkomórkowego stężenia inhibitora syntetazy tymidylanowej może towarzyszyć pojawienie się dodatkowych ilości pochodnej fo-

Tabela 6

Pochodne folianowe jako inhibitory syntetazy tymidylanowej i reduktazy dihydrofolianowej (z danych 195)

Enzym		Pochodne	I ₅₀ (μM)	Względna aktywność inhibitorowa
Syntetaza tymidylanowa (z <i>E. coli</i>)		5-formylo-H ₄ PteGlu	200	1
		5-formylo-H ₄ PteGlu ₂	20	10
		5-formylo-H ₄ PteGlu ₃	3	67
		5-formylo-H ₄ PteGlu ₄	3	67
		5-formylo-H ₄ PteGlu ₅	2	100
		5-formylo-H ₄ PteGlu ₆	1	200
		Inhibitor oczyszczony z <i>E. coli</i>	1,3	154
		10-formylo-H ₄ PteGlu ₃	400	0,5
		5-formimino-H ₄ PteGlu ₃	70	2,9
		5-10-metenilo-H ₄ PteGlu ₆	20	10
Redukta- za di- hydrofo- lianowa	Mysie komórki leuke- miczne	10-formylo-PteGlu ₁	0,1	1
		10-formylo-PteGlu ₅	0,015	6,7
	<i>E. coli</i>	10-formylo-PteGlu	96	1
		10-formylo-PteGlu ₅	66	1,45

lianowej, która pośrednio może stanowić jeden z substratów tego enzymu. Wskazuje to zatem na możliwość udziału formylo- H_4 PteGlu w regulacji syntezy DNA (patrz Ryc. 2).

Efektywność 10-formylo-PteGlu₅ (związku obecnego w ekstraktach *E. coli*) oraz formylo-PteGlu jako inhibitorów reduktaz dihydrofolianowych badano przy użyciu enzymów z *E. coli* i z mysich komórek leukemicznych (Tabela 6). W odróżnieniu od syntetazy tymidylanowej stopień inhibicji reduktaz dihydrofolianowych tylko w niewielkim stopniu zależał od liczby reszt glutaminianowych w cząsteczce inhibitora folianowego. Uderzające były natomiast różnice wrażliwości reduktaz dihydrofolianowych na działanie 10-formylo-PteGlu₅. Do uzyskania 50% zahamowania aktywności enzymu z mysich komórek leukemicznych wystarczyło już zastosować inhibitor w 4400-krotnie niższym stężeniu niż w przypadku z *E. coli*. Ta bardzo wysoka wrażliwość reduktazy komórek leukemicznych na formylo-PteGlu₅ sugeruje możliwość stosowania tej pochodnej folianowej w chemoterapii. Wykazano, że 10-formylo-PteGlu tworzy się również w komórkach wątrobowych inkubowanych z radioaktywnym folianem (201). Można się zatem zastanawiać, czy związek ten nie może hamować reduktazy dihydrofolianowej z komórek wątrobowych.

V. Białka wiążące folian

V-1. Występowanie i charakterystyka

Białka wiążące folian znaleziono w surowicy krwi (141, 202—211) i innych płynach ustrojowych zwierząt wyższych (212—215), a także w leukocytach pacjentów z objawami chronicznej białaczki szpikowej (198, 216, 217) i w komórkach wielu tkanek ssaków (199, 218—220). Ilości białek wiążących folian w materiale biologicznym są bardzo niewielkie. Próby usunięcia folianu z kompleksu z białkami występującymi w surowicy lub mleku prowadzą często do otrzymania preparatów białkowych niezdolnych do wiązania folianu (221). Ostatnio dopiero doniesiono o otrzymaniu aktywnego preparatu białek wiążących folian z surowicy krwi ludzkiej po oddysocjowaniu od nich folianu (209, 222). Zastosowana procedura może zatem pozwolić na jednoczesne oznaczenie w badanym materiale całkowitej ilości białek już wysyconych folianem oraz białek zdolnych do wiązania dodanego do mieszaniny folianu. W badaniach białek wysyconych endogennym folianem stosuje się najczęściej rozdział chromatograficzny białek na kolumnach z DEAE-celulozy, a następnie oznacza ilość folianu związanego z białkami w poszczególnych frakcjach uzyskanych z kolumny. W surowicy krwi różnych zwierząt aktywność folianową odnajdywano w połączeniu z trzema frakcjami białkowymi, a mianowicie α_2 -makro-

globuliną, transferyną i albuminą, przy czym ilość folianu związanego z α_2 -makroglobuliną stanowiła do 45% całkowitej ilości związanego folianu (202, 203, 223, 224, 225). Ilości białek wiążących folian ulegają znacznym wahaniom w zależności od stanu fizjologicznego dawcy. Szczególnie wyraźne odchylenia w stosunku do stanu prawidłowego, obserwuje się badając próbki krwi kobiet w ciąży (205, 226) oraz krwi osób z różnymi schorzeniami (141, 227, 229).

Więcej danych, niż o białkach wysyconych endogennym folianem jest na temat białek, które wiążą dodany do próby znakowany folian (141). Białka tego typu wyizolowano z surowicy krwi ludzkiej (207), z mleka szeregu gatunków ssaków (212, 214, 215, 221) oraz komórek leukemicznych (198) czy też nerek wieprza (220). Cechuje je szereg zbliżonych właściwości, a zwłaszcza bardzo szybkie i trwałe wiązanie radioaktywnego folianu oraz preferencja w stosunku do niezredukowanych mono- i poliglutaminianów folianu. Kwas pterojowy oraz 5-formylo- H_4 PteGlu hamowały wiązanie folianu z białkami, natomiast kwas pterydino-6-karboksylowy i glutaminowy nie miały żadnego wpływu na ten proces. W badaniach współzawodnictwa różnych pochodnych folianu o wiązanie z białkami wiążącymi folian okazało się, że spośród wielu pochodnych folianowych folian wykazuje najwyższe powinowactwo do tych białek. Można więc przypuszczać, że w interakcji pochodnych folianu z białkami wiążącymi folian uczestniczy niezredukowany rdzeń pterydynowy jak również kwas p-aminobenzoesowy.

Białka zdolne do wiązania folianu tracą tę właściwość po zagotowaniu, a także w wyniku przechowywania w temp. -70°C , traktowania trypsyną, mocznikiem (8M) lub chlorowodorkiem guanidyny. Samo wiązanie białek z folianem jest jednak stosunkowo trwałe, a dysocjacja kompleksu białka z folianem następuje dopiero przy wartościach pH poniżej 3 oraz po zadziałaniu detergentów (221).

W badanym dotychczas materiale białko wiążące folian występuje w dwu frakcjach białkowych o ciężarze cząsteczkowym 30—50 000 i powyżej 200 000 (140). Stosunki ilościowe tych frakcji mogą się bardzo znacznie różnić. Frakcja o ciężarze cząsteczkowym powyżej 200 000 sedymentująca w wyniku wirowania przy 200 000 g i zawsze znajdowana w mleku oraz błonach limfocytów, zanika po dodaniu do niej 8M mocznika, a więc przypuszcza się, że być może frakcja ta przedstawia sobą kompleks z błonami komórkowymi frakcji o ciężarze cząsteczkowym 30 000 (140). Frakcja 30—50 000 daltonów eluuje się podobnie jak β -globulina oraz migruje podobnie jak transferyna podczas elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (207), a więc pod tym względem zachowuje się jak niektóre frakcje białkowe powiązane z endogennym folianem.

Oczyszczanie białek wiążących folian prowadzi się najczęściej z zastosowaniem metody chromatografii powinowactwa, używając nośnika (Agarose lub Sepharose) z folianem (213, 215), lub z ametoptyryną (230)

jako ligandami. W dalszych etapach oczyszczania i badania właściwości tych białek stosuje się także ultrawiórowanie w gradiencie sacharozy, chromatografię na DEAE-celulozie oraz izoelektroogniskowanie. Otrzymane z mleka ludzkiego preparaty tych białek, oczyszczone kilka tysięcy razy w stosunku do preparatu wyjściowego, stanowią mieszaninę dwóch lub kilku składników glikoproteidowych, o ciężarze cząsteczkowym rzędu 30 000 (231). Białko wiążące folian z mleka koziego jest natomiast po oczyszczeniu jednorodnym immunologicznie glikoproteidem (215).

Białko wysyczone endogennym folianem i oczyszczone z surowicy krwi noworodka ludzkiego (209) wykazuje szereg podobnych właściwości do białek omawianych poprzednio. Jednakże w odróżnieniu od nich wiąże ono efektywniej 5-metylotetrahydrofolian niż folian. Fakt ten, jak również kilkukrotnie większe ilości tego białka w krwi płodu niż matki pozwalają przypuszczać, że płodowe białko wiążące folian odgrywa znaczną rolę w wychwytywaniu pochodnych folianowych z krążenia matki.

V-2. Przypuszczalna rola regulacyjna białek wiążących folian

Występowanie białek wiążących folian w komórkach oraz w płynach ustrojowych, jak również zmienność poziomu tych białek w zależności od stanu fizjologicznego zwierzęcia pozwalają na wysuwanie przypuszczeń co do ich roli fizjologicznej. Obecnie uważa się, że białka wiążące folian występują w komórkach w powiązaniu z błonami (140). Chociaż nie wykazano dotychczas bezpośrednio, że białka te mogą stanowić nośnik w transporcie pochodnych folianowych do komórek, to przypuszcza się, że ich ilość w komórkach może regulować intensywność pobierania pochodnych folianowych. A mianowicie, zwiększony poziom wewnątrzkomórkowych białek wiążących folian tłumaczy według Waxmana i Schreiber, intensywniejsze pobieranie folianu przez komórki HeLa, w których wywołano eksperymentalnie stan niedoboru folianu, niż komórki HeLa z hodowli kontrolnych (126).

Komórkowy poziom białek wiążących folian nie tylko wydaje się wpływać na ilość pochodnych folianu pobieranych przez komórki i ich wewnątrzkomórkowe nagromadzenie (porównaj rozdział II-1), lecz także na intensywność przemian różnych pochodnych folianowych. Niezredukowane pochodne folianowe powiązane z tymi białkami nie stanowią bowiem substratów ani reduktazy dihydrofolianowej (198, 140) ani też glutamyl- γ -karboksypeptydazy, (221) a więc (dzięki związaniu z tymi białkami), zostają jakgdyby wyłączone z przemian ogólnokomórkowej puli pochodnych folianowych. Chociaż doniesiono o obecności w mleku czynnika obniżającego efektywność wiązania folianu z niektórymi komórkowymi białkami wiążącymi ten związek (211) to dane na temat mechanizmów powodujących rozbieżność tego kompleksu są nadal nieliczne. Można jednak spe-

kulować, że zakłócenia w uwalnianiu folianu z tego kompleksu mogłyby prowadzić do pojawiania się objawów pozornego niedoboru folianu (pomimo prawidłowego ich poziomu w komórkach i w surowicy), a w następstwie wyraźnych konsekwencji metabolicznych. Tak np. w komórkach leukemicznych CML (pobraných od pacjentów z chroniczną białaczką szpikową), charakteryzujących się podwyższonym, w stosunku do prawidłowych komórek szpiku kostnego, poziomem białek wiążących folian, stwierdzono znaczne upośledzenie metylacji dUMP do tymidyny (232). Co więcej, w tych komórkach leukemicznych folian i dihydrofolian dodane do mieszaniny inkubacyjnej, słabiej niż w komórkach prawidłowych stymulowały przebieg syntezy tymidyny, prawdopodobnie na skutek wychwytywania ich przez białka wiążące folian.

Komórkowe białka wiążące folian wykazują ponadto pewne powinowactwo do ametoptyryny, chociaż słabsze niż w stosunku do folianu (221). Można więc przypuszczać, że ta część ametoptyryny, która została pobrana przez komórki i uległa związaniu z białkiem wiążącym folian, nie może już hamować aktywności reduktazy dihydrofolianowej. A więc przy związaniu przez białka ametoptyryny następowałby efekt odwrotny niż przy związaniu dihydrofolianu, a mianowicie odblokowanie drogi prowadzącej do zwiększenia wewnątrzkomórkowej puli tetrahydrofolianu. Zdaniem Waxmana (224) formowanie kompleksu ametoptyryny z białkiem wiążącym folian może stanowić jeden z mechanizmów oporności komórek na analogi folianu.

Artykuł nadszedł 28.2.1976.

PIŚMIENNICTWO

1. Baugh C. M., Krumdieck C. L., (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **186**, 7—28.
2. Wright B. E., (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 3930—3932.
3. Hakala M. T., Welch A. D., (1955), *Fed. Proc.*, **14**, 222.
4. Salem A. R., Pattison J. R., Foster M. A., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 993—1004.
5. Zakrzewski S. F., Nichol Ch. A., (1955), *Fed. Proc.*, **14**, 311.
6. Curthoys N. P., Scott J. M., Rabinowitz J. C., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1959—1964.
7. Baugh C. M., Braverman E., Nair M. G., (1974), *Biochemistry*, **13**, 4952—4957.
8. Buehring K. U., Tamura T., Stokstad E. L. R., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1081—1089.
9. Combepine G., Cossins E. A., Lor K. L., (1971), *FEBS Letters*, **14**, 49—53.
10. Schertel M. E., Boehme J. W., Libby D. A., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 3154—3158.
11. Salem A. R., Foster M. A., (1972), *Biochem. J.*, **127**, 845—853.
12. Miller S., Perry A. S., (1965), *Life Sci.*, **4**, 1573—1580.

13. Houlihan C. M., Davidson G. E., Scott J. M., Brown J. P., (1974), *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 297—299.
14. Shin Y. S., Williams M. A., Stokstad E. L. R., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 35—43.
15. Bird O. D., McGlohon V. M., Vaithus J. W., (1965), *Anal. Biochem.*, **12**, 18—35.
16. Leslie G. I., Baugh C. M., (1974), *Biochemistry* **13**, 4957—4961.
17. Corrocher R., Bhuyan B. K., Hoffbrand A. V., (1972), *Clin. Sci.*, **43**, 799—813.
18. Smith R. M., Osborne-White W. S., Gawthorne J. M., (1974), *Biochem. J.*, **142**, 105—117.
19. Osborne-White W. S., Smith R. M., (1973), *Biochem. J.*, **136**, 265—278.
20. Whitehead V. M., (1973), *Lancet*, 743—745.
21. Thenen S. V., Shin Y. S., Stokstad E. L. R., (1973), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **142**, 638—641.
22. Davidson G. E., Brown J. P., Scott J. M., (1973), *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 1192—1184.
23. Brown J. P., Davidson G. E., Scott J. M., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **343**, 78—88.
24. Shin Y. S., Buehring K. U., Stokstad E. L. R., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7266—7269.
25. Shin Y. S., Buehring K. U., Stokstad E. L. R., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 211—224.
26. Usdin E., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 2373—2376.
27. Noronha J. M., Aboobaker V. S., (1963), *Arch. Biochem. Biophys.*, **101**, 445—447.
28. Herbert V., Larrabee A. R., Buchanan J. M., (1962), *J. Clin. Invest.*, **41**, 1134—1138.
29. Moran R. G., Domin B. A., Zakrzewski S. F., (1975), *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **16**, 49.
30. Tattersall M. H. N., Jackson R. C., Jackson S. T. M., Har-rap K. R., (1974), *Eur. J. Cancer*, **10**, 819—826.
31. Shin Y. S., Kim E. S., Watson J. E., Stokstad E. L. R., (1975), *Can. J. Biochem.*, **53**, 338—343.
32. Dong F. M., Oace S. M., (1975), *Agricul. Food Chem.*, **23**, 534—538.
33. Roos A. J., Cossins E. A., (1971), *Biochem. J.*, **125**, 17—26.
34. Chang C., Shin Y. S., Stokstad E. L. R., (1973), *Can. J. Biochem.* **51**, 1617—1623.
35. Batra K. K., Wagner J. R., Stokstad E. L. R., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 928.
36. Zielińska Z., Grzelakowska B., (1962), *Post. Biochem.*, **8**, 453—473.
37. Grzelakowska B., (1963), *Post. Biochem.*, **9**, 311—327.
38. Zielińska Z. M., Grzelakowska B., (1964), *Chem. Listy*, **58**, 782—807.
39. Grzelakowska B., (1966), *Chem. Listy*, **60**, 499—522.
40. Silber R., Mansouri A., (1964), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **112**, 55—89.
41. Stokstad E. L. R., Koch J., (1967), *Physiol. Rev.*, **47**, 83—116.
42. Huennekens F. M., (1968), w *Biological Oxidations*, red. Singer T. P., str. 439—513, Interscience, New York.
43. Rowe P. B., Lewis G. P., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1962—1969.
44. Röder J. J., Huennekens F. M., (1973), w *The Enzymes* red. Boyer P. D. t. 9, str. 197—223, Academic Press, New York, London.

45. Dickerman H. V., (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **186**, 70—81.
46. Grzelakowska-Sztabert B., (1968), *Post. Biochem.*, **14**, 509—522.
47. Albrecht A. M., Pearce F. K., Hutchison D. J., (1968), *J. Bacteriol.*, **95**, 1779—1789.
48. Mansouri A., Decter J. B., Silber R., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 348—352.
49. Greene R. C., Williams R. D., Kung H. F., Spears C., Weisbach H., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 249—256.
50. Cossins E. E., Combepine G., Turian G., (1973), *Experientia*, **29**, 1203—1206.
51. Dalal F. R., Gots J. S., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 3636—3640.
52. Kamely D., Littlefield J. W., Erbe R. W., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2585—2589.
53. Taylor R. T., Hanna M. L., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**, 507—520.
54. Meiren D. V., Belousova A. K., (1971), *Biochimija*, **36**, 1210—1216.
55. Hillcoat B. L., Marshall L., Gauldie J., Hiebert M., (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **186**, 187—205.
56. Kawai M., Hillcoat B. L., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 1619—1626.
57. Trombe M. C., Sicard M. A. M., (1973), *C. R. Acad. Sc. Paris*, **276**, 3495—3498.
58. Hakala M., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **102**, 198—209.
59. Raunio T., Hakala M. T., (1968), *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 1744—1747.
60. Hakala M. T., Zakrzewski S. F., Nichol W., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 952—958.
61. Hakala M. T., (1973) w *Drug Resistance and Sensitivity, Biochemical and Cellular Basis*, 263—298.
62. Brown G. M., (1971), *Adv. Enzymol.*, **35**, 35—76.
63. Brown G. M., Yim J., Suzuki Y., Heine M. C., Foor F., (1975) w *Chemistry and Biology of Pteridines*, red. Pfeleiderer W. str. 219—245, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
64. Grzelakowska-Sztabert B. (1967), *Post. Biochem.*, **13**, 3—18.
65. Goto M., Sugiura K., (1971), *Methods in Enzymology*, **183**, 746—761.
66. Ziegler I., Harmsen R., (1969), *Adv. Insect Physiol.*, **6**, 139—203.
67. Brown G. M., Fan C. L., (1975), w *Chemistry and Biology of Pteridines*, red. Pfeleiderer W., str. 265—272, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
68. Shiota T., (1971), *Comp. Biochem.*, **21**, 111—152.
69. Sugiura K., Goto M., (1973), *Experientia*, **29**, 1481—1482.
70. Fukushima T., Shiota T., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4445—4451.
71. Fukushima K., Eto I., Mayumi T., Richter W., Goodson S., Shiota T., (1975) w *Chemistry and Biology of Pteridines*, red. Pfeleiderer W., str. 247—263, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
72. Buff K., Dairman W., (1975), *Mol. Pharmacol.*, **11**, 87—93.
73. Buff K., Dairman W., (1975), w *Chemistry and Biology of Pteridines*, red. Pfeleiderer W., str. 273—283, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
74. Gawthorne J. M., Smith R. M., (1973), *Biochem. J.*, **136**, 295—301.
75. Griffin M. J., Brown G. M., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 310—316.
76. Nair C. P. P., Noronha J. M., (1974), *J. Nutr. Sci. Vitam.*, **20**, 1—7.
77. Masurekar M., Brown G. M., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2424—2430.
78. Sakami W., Ritari S. J., Black C. W., Rzepka J., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 471.
79. Mims V., Laskowski M. (1945), *J. Biol. Chem.*, **155**, 401—405.

80. Dąbrowska W., Kazenko A., Laskowski M., (1949), *Science*, **110**, 95.
81. Bird O. D., Robbins M., Vanderbelt J. M., Pfiffner J. J., (1946), *J. Biol. Chem.*, **163**, 649—659.
82. Wolff R., Drouet L., Karlin L., (1949), *Science*, **109**, 612—613.
83. Krumdieck C. L., Baugh C. M. (1970), *Anal. Biochem.*, **35**, 123—129.
84. Blakley R. L., (1969) w *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*, str. 25—49, North Holland Publishing Co., Amsterdam.
85. Tamura T., Buehring K. U., Stokstad E. L. R., (1972), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **141**, 1022—1025.
86. Hoffbrand A. V., Peters T. J., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **192**, 479—485.
87. Rowe P. B., Silink M., Reddel R., (1975) w *Chemistry and Biology of Pteridines*, red, Pfeleidered W., str. 85—92, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
88. Baugh C. M., Stevens J. C., Krumdieck C. L., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 116—125.
89. Käferstein H., Jaenicke L., (1972), *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 1153—1158.
90. Nair M. G., Baugh C. M., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3923—3927.
91. Rosenberg J. H., Neumann H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5126—5130.
92. Saini P. K., Rosenberg J. H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5131—5134.
93. Lavoie A., Tripp E., Hoffbrand A. V., (1975), *Biochem. Med.*, **13**, 1—6.
94. Rosenberg I. H., Streiff R. R., Godwin H. A., Castle W. B., (1969), *New England J. Med.*, **280**, 985—988.
95. Tamura T., Stokstad E. L. R., (1973), *Brit. J. Haemat.*, **25**, 513—532.
96. Herbert V., (1973), *J. Infec. Dis.*, **128**, suppl., S601—S606.
97. Mathews D. M., (1974) w *Biomembranes*, red. L. A. Manson, **4B**, 847—916.
98. Grossowicz N., Rachmilewitz M., Izak G., (1975), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **150**, 77—79.
99. Whitehead V. M., Cooper B. A., (1967), *Brit. J. Haemat.*, **13**, 679—686.
100. Bernstein L. H., Gutstein S., Weiner S., Efron G., (1970), *Am. J. Med.*, **48**, 570—579.
101. Hoffbrand A. V., Peters T. J., (1970), *Schw. Med. Wschr.*, **100**, 1954—1960.
102. Brown J. P., Scott J. M., Foster F. G., Weir D. G., (1973), *Gastroenterology*, **64**, 223—232.
103. Weir D. G., Brown J. P., Freedman D. S., Scott J. M., (1973), *Clin. Sci. Mol. Med.*, **45**, 625—631.
104. Weir D. G., (1974), *Irish J. Med. Sci.*, **143**, 3—20.
105. Baugh C. M., Krumdieck C. L., Baker H. J., Butterworth C. F., jr. (1975), *J. Nutr.*, **105**, 80—89.
106. Silverman M., Law L. W., Kaufman B., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 2530—2533.
107. Kozloff L. M., Lute M., Crosby L. K., Rao N., Chapman V. A., DeLong S., (1970), *J. Virol.*, **5**, 726—739.
108. Brown J. P., Davidson G. E., Scott J. M., (1971), *Abstr. FEBS Meeting*, Varna, str. 249.
109. Brown J. P., Davidson G. E., Scott J. M., (1973), *J. Chromatogr.*, **79**, 195—207.
110. Usdin E., Porath J., (1957), *Arkiv Kemi*, **11**, 41—46.
111. Nixon P. F., Bertino J. R., (1971), *Methods in Enzymology*, **18B**, 661—663.
112. Whitehead V. M., (1971), *Clin. Res.*, **19**, 435.

113. Bakerman H. A., (1961), *Anal. Biochem.*, **2**, 558—567.
114. Tamura T., Shin Y. S., Williams M. A., Stokstad E. L. R., (1972), *Anal. Biochem.*, **49**, 517—521.
115. Krumdieck C. L., Baugh C. M., (1969), *Biochemistry* **8**, 1568—1572.
116. Baugh C. M., Krumdieck C. L., Nair M. G., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 116—125.
117. Godwin H. A., Rosenberg J. H., Ferenz R., Jacobs P. M., Meienhofer J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2266—2271.
118. Houlihan C. M., Scott J. M., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1675—1687.
119. Goldman I. D., Lichtenstein N. S., Oliveiro V. T., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5007—5017.
120. Goldman J. D., (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **186**, 400—422.
121. Nahas A., Nixon P. F., Bertino J. R., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 1416—1421.
122. Nixon P. F., Slutsky G., Nahas A., Bertino J. R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5932—5936.
123. Niethammer D., Huennekens F. M., (1973) w *Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes*, red. Gerlach E., Moser K., Deutsch E., Wilmanns W., str. 504—506, George Thieme Publishers, Stuttgart.
124. Huennekens F. M., DiGirolamo P. M., Fuji K., Henderson G. B., Jacobson D. W., Neef V. G., Rader J. J., (1974) *Advances in Enzyme Regulation*, t. 12, red. Weber G., str. 131—157, Pergamon Press, Oxford, London, Edinburgh, New York, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig.
125. Chello P. L., Bertino J. R., (1973), *Cancer Res.*, **33**, 1898—1904.
126. Waxman S., Schreiber C., (1974), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **147**, 760—764.
127. Grzelakowska-Sztabert B., *Acta Biochim. Polon.* (w druku).
128. Das K. C., Hoffbrand A. V., (1970), *Brit. J. Haematol.*, **19**, 203—221.
129. Corcino J. J., Waxman S., Herbert V., (1971), *Brit. J. Haematol.*, **20**, 503—509.
130. Izak G., Rachmilewicz M., Grossowicz N., Galewski K., Kraus S., (1968) *Brit. J. Haematol.*, **14**, 447—452.
131. Hoffbrand A. V., Tripp E., Lavoie A., (1976), *Clin. Sci. Mol. Med.*, **50**, 61—68.
132. Tisman G., Herbert V., (1971), *Clin. Res.*, **19**, 433.
133. Rader J. J., Niethammer D., Huennekens F. M., (1974), *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2057—2059.
134. Hoffbrand A. V., Tripp E., Catovsky D., Das K. C., (1973), *Brit. J. Haematol.*, **25**, 497—511.
135. Niethamer D., Jackson R. C., (1975), w *Chemistry and Biology of Pteridines*, red. Pfeleiderer W., str. 197—207, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
136. Hoffbrand A. V., Tripp E., Houlihan C. M., Scott J. M., (1973), *Blood*, **42**, 141—146.
137. Tisman G., Herbert V., (1973), *Blood*, **41**, 465—469.
138. Lavoie A., Tripp E., Hoffbrand A. V., (1974), *Clin. Sci. Mol. Med.*, **47**, 617—630.
139. Nixon P. F., Bertino J. R., (1972), *J. Clin. Invest.*, **51**, 1431—1439.
140. Waxman S., (1975), *Brit. J. Haematol.*, **29**, 23—29.
141. Waxman S., Schreiber C., (1973), *Blood*, **42**, 281—290.
142. Grzelakowska-Sztabert B., —dane w opracowaniu
143. (1975), *Nutrition Rev.*, **33**, 183—184.

144. Henderson G. B., Huennekens F. M., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 722—728.
145. Huennekens F. M., Henderson G. B., (1975), w *Chemistry and Biology of Pteridines*, red. Pfeleiderer W., str. 179—196, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
146. Shane B., Stokstad E. L. R., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2243—2253.
147. Shin Y. S., Buehring K. U., Stokstad E. L. R., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5772—5777.
148. Cooper B. A., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **208**, 99—109.
149. Nichol C. A., (1968), *Adv. Enzyme Regul.*, red. Weber G, t. 6, str. 305—322, Pergamon Press, Oxford, London, Edinburg, New York, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig.
150. McElwee P. G., Scott J. M., (1974), *Biochem. J.*, **127**, 901—905.
151. Mandelbaum-Shavit F., Grossowicz N., (1970), *J. Bacteriol.*, **104**, 1—7.
152. Zakrzewski S. F., Grzelakowska-Sztabert B. (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2684—2690.
153. Bühring K. U., Fölsch E., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **421**, 22—32.
154. Pariser R. J., Cunningham D. D., (1971), *J. Cell Biol.*, **49**, 525—529.
155. Ulrich F., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1453—1459.
156. Werner D., Schulte M., (1975), *Eur. J. Cancer*, **11**, 521—522.
157. Brown J. P., Davidson G. E., Scott J. M. (1974) *Int. J. Biochem.* **5**, 735—739.
158. Barbiroli B., Bovina C., Tolomelli B., Marchetti M., (1975), *Biochem. J.*, **152**, 229—232.
159. Smith R. M., Osborne-White W. S., (1973), *Biochem. J.*, **136**, 279—293.
160. Vidal A. J., Stokstad E. L. R., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **362**, 245—257.
161. Gawthorne J. M., Smith R. M., (1974), *Biochem. J.*, **142**, 119—126.
162. Thenen S. W., Stokstad E. L. R., (1973), *J. Nutr.*, **103**, 363—370.
163. Marchetti M., Pasquali P., Landi L., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **93**, 423—424.
164. Marchetti M., Landi L., Pasquali P. (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **97**, 356—358.
165. Marchetti M., Pasquali P., Landi L., (1965), *Biochem. J.*, **94**, 763—767.
166. Marchetti M., Landi L., Pasquali P., (1966), *J. Nutr.*, **89**, 422—428.
167. Bovina C., Landi L., Pasquali P., Marchetti M., (1969), *J. Nutr.*, **99**, 320—324.
168. Rovinetti C., Bovina C., Tolomelli B., Marchetti M., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 291—294.
169. Pasquali P., Landi L., Bovina C., Marchetti M., (1970), *Biochem. J.*, **116**, 217—221.
170. Buehring K. U., Batra K. K., Stokstad E. L. R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **279**, 498—512.
171. Shin Y. S., Buehring K. U., Stokstad E. L. R., (1975), *Mol. Cell. Biochem.*, **9**, 97—108.
172. Brown J. P., Davidson G. E., Weir D. G., Scott J. M., (1974), *Int. J. Biochem.*, **5**, 727—733.
173. Corrocher R., Hoffbrand A. V., (1972), *Clin. Sci.*, **43**, 815—822.
174. McBurney M. W., Whitmore G. F., (1974), *Cell*, **2**, 173—182.
175. McBurney M. W., Whitmore G. F., (1974), *Cell*, **2**, 183—188.

176. McBurney M. W., Whitmore G. F., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 586—590.
177. Jackson R. C., Harrap K. R., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 827—841.
178. Lor K. L., Cossins E. A., (1972), *Biochem. J.*, **130**, 773—783.
179. Cossins E. A., Chan P. Y., Combepine G., (1975) *FEBS Letters*, **54**, 286—290.
180. Himes R. H., Rabinowitz J. C., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 2903—2914.
181. Uyeda K., Rabinowitz J. C., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 24—31.
182. Uyeda K., Rabinowitz J. C., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 271—278.
183. Blakley R. L., (1957), *Biochem. J.*, **65**, 342—348.
184. Morales D. R., Greenberg D. M., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 360—376.
185. Greenberg D. M., Tam B. D., Payes E. J. B., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 423—435.
186. Coward J. K., Parameswaran K. N., Cashmore A. R., Bertino J. R., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3899—3903.
187. Guest J. R., Friedman S., Foster M. A., Tejerina G., Woods D. D., (1964), *Biochem. J.*, **92**, 497—504.
188. Burton E., Selhub J., Sakami W., (1969), *Biochem. J.*, **111**, 793—795.
189. Whitefield C. D., Weissbach H., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 996—1003.
190. Whitfield C. D., Steers E. J., jr, Weissbach H., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 390—401.
191. Cheng F. W., Shane B., Stokstad E. L. R., (1975), *Can. J. Biochem.*, **53**, 1020—1027.
192. Coward J. K., Chello P. L., Cashmore A. R., Parameswaran K. N., DeAngelis L. M., Bertino J. R., (1975), *Biochemistry*, **14**, 1548—1552.
193. Friedkin M., Crawford E. J., Donowan E., Pastore E. J., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 3811—3814.
194. Friedkin M., Crawford E. J., Plante L. T., (1971), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **186**, 209—213.
195. Friedkin M., Plante L. T., Crawford E. J., Crumm M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5614—5621.
196. Kisliuk R. L., Gaumont Y., Baugh C. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4100—4103.
197. Iwai K., Luttner P. M., Toennies G., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 2365—2369.
198. Rothenberg S. P., (1970), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **133**, 428—432.
199. Zamierowski M., Wagner C., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 81—87.
200. Zakrzewski S. F., Hakala M. T. (1975), *Proc. Am. Assoc. Soc. Concer Res.*, **16**, 29.
201. d'Urso-Scott M., Uhoch J., Bertino J. R., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2736—2739.
202. Markkanen T., (1968), *Life Sci.*, **7**, 887—895.
203. Markkanen T., Peltola O., (1971), *Acta Haemat.*, **45**, 106—111.
204. Markkanen T., Pajula R. L., Himanen P., Virtanen S., (1974), *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **44**, 347—356.
205. Markkanen T., Virtanen S., Pajula R. L., (1974), *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **44**, 81—94.

206. Mantzos J. D., Alevizon-Terzaki V., Gyftaki E., (1974, *Acta Haemat.*, **51**, 204—210.
207. Waxman S., Schreiber C., (1973), *Blood*, **42**, 291—301.
208. da Costa M., Rothenberg S. P., (1974), *J. Lab. Clin. Med.*, **83**, 207—214.
209. Kamen B. A., Caston J. D., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4261—4264.
210. Spector R., Lorenzo A. V., Drum D. E., (1975), *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 542—544.
211. Longo D. L., Herbert V., (1974), *Clin. Res.*, **22**, 701A.
212. Metz J., Zalusky R., Herbert V., (1968), *Am. J. Nutr.*, **21**, 289—297.
213. Salter D. N., Ford J. E., Scott K. J., Andrews P., (1972), *FEBS Letters*, **20**, 302—306.
214. Ford J. E., (1974), *Brit. J. Nutr.*, **31**, 243—257.
215. Rubinoff M., Schreiber C., Waxman S., (1975), *Fed. Proc.*, **34**, 904.
216. Rothenberg S. P., da Costa M., (1971), *J. Clin. Invest.*, **50**, 719—726.
217. Fisher C. D., da Costa M., Rothenberg S. P., (1975), *Blood*, **46**, 855—868.
218. Leslie G. I., Rowe P. B., (1972), *Biochemistry*, **12**, 1696—1703.
219. Corrocher R., De Sandre G., Pacor M. L., Hoffbrand A. V., (1974), *Clin. Sci. Mol. Med.*, **46**, 551—554.
220. Kamen B. A., Caston J. D., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2203—2205.
221. Waxman S., (1975) w Chemistry and Biology of Pteridines, red. Pfeleiderer W., str. 165—178, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
222. Colman N., Herbert V., (1974), *Clin. Res.*, **22**, 700A.
223. Markkanen T., Pajula R. L., Virtanen S., Himanen P., (1972), *Acta Haemat.*, **48**, 145—150.
224. Markkanen T., Virtanen S., Himanen P., Pajula R. L., (1972), *Acta Haemat.*, **48**, 213—217.
225. Jacob E., Herbert V., (1974), *Blood*, **43**, 767—768.
226. Markkanen T., Himanen P., Pajula R. L., Ruponen S., Castren O., (1973), *Acta Haemat.*, **50**, 85—91.
227. Markkanen T., Himanen P., Pajula R. L., Molnar G., (1973), *Acta Haemat.*, **50**, 284—292.
228. Markkanen T., Himanen P., Pajula R. L., (1974), *Acta Haemat.*, **51**, 193—203.
229. Eichner E. R., Paine Ch. J., Dickson V. L., Hargrowe M. D., jr., (1975), *Blood*, **46**, 599—610.
230. Selhub J., Grossowicz N., (1973), *FEBS Letters*, **35**, 76—78.
231. Waxman S., Schreiber C., (1975), *Biochemistry*, **14**, 5422—5428.
232. da Costa M., Rothenberg S. P., Kamen B., (1972), *Blood*, **39**, 621—627.

KOMUNIKAT

VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego odbędzie się w Katowicach w dniach 22—25 września 1977 r.

Wstępny program

1. Leki i mechanizmy monoaminergiczne
2. Prostaglandyny
3. Cykliczne nukleotydy
4. Interakcje leków. Działanie leków a alkohol
5. Farmakologia układu sercowo-naczyniowego

W czasie trwania Zjazdu odbędą się 2 następujące sympozja:

1. Prostaglandyny a proces zapalny.
2. 5-Hydroksytryptamina w ośrodkowym układzie nerwowym.

Obrady Zjazdu będą prowadzone w języku angielskim.

Termin zgłoszeń upływa z dniem 31 grudnia 1976 r.

Termin wysyłania streszczeń komunikatów — 31 marzec 1977 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego Zjazdu:

INSTYTUT FARMAKODYNAMIKI I ANALITYKI MEDYCZNEJ
ŚLĄSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ
UL. JAGIELLOŃSKA 4
41-200 SOSNOWIEC, TEL. 66-79-64

WALDEMAR LUTZ *

Przemiana glutationu i transport aminokwasów. Cykl γ -glutamylowy

Gluthatione Turnover and the Transport of Amino Acids. The γ -Glutamyl Cycle

Glutation jest trójskładnikiem (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycyna) występującym w komórkach wszystkich badanych organizmów, a stężenie tego związku osiąga nieraz bardzo wysokie wartości rzędu 5—10mMola (1). W cząsteczce glutationu występują dwa szczególnie ważne funkcjonalnie ugrupowania chemiczne, a mianowicie grupa wodorosiarczkowa i wiązanie γ -glutamylowe. Dotychczasowe badania nad glutationem dotyczyły głównie udziału jego grupy —SH w utrzymaniu właściwej struktury i funkcji różnych enzymów, a także jego uczestnictwa w procesach detoksykacji, eliminacji nadtlenków i wolnych rodników (2). Badano również właściwości katalityczne glutationu w dwusiarczkowych reakcjach wymiany oraz jego rolę jako koenzymu, np. w reakcji katalizowanej przez glioksalazę (3).

W laboratorium Meistersa (4) zwrócono uwagę na rolę glutationu jako dawcy reszty γ -glutamylowej zużywanej w procesie syntezy γ -glutamyllopeptydów. Ponadto wykazano, że 5-oksoprolina (synonimy: kwas pirolidonokarboksylowy, kwas piroglutaminowy) jest jednym z głównych metabolitów glutationu. W toku prac nad enzymami biorącymi udział w przemianie glutationu uwagę skupiono początkowo na dwóch enzymach: γ -glutamylotranspeptydazie (E.C. 2.3.2.2) (5) i γ -glutamylocyklotransferazie (6). Enzymy te wprawdzie znane są od wielu lat, ale nie przypisywano im dotychczas określonej funkcji metabolicznej. Zbadano także dwa inne enzymy, niezbędne w syntezie glutationu, a mianowicie syntetazę γ -glutamylcysteiny (E.C. 6.3.2.2.) (7) oraz syntetazę glutationu (E.C. 6.3.2.3) (8). Badania z roku 1971 doprowadziły do wykrycia nowego enzymu 5-oksoprolinazy, która katalizuje przemianę 5-oksoproliny w gluta-

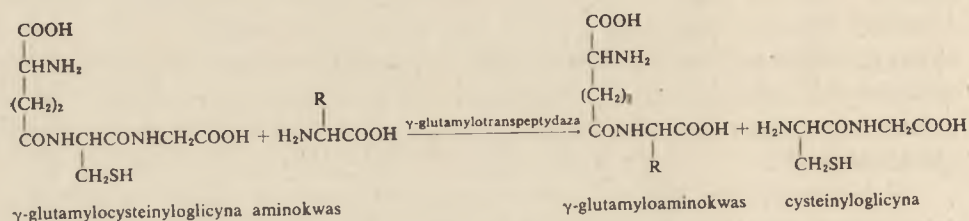
* Dr, Zakład Analityki Lekarskiej, Instytut Medycyny Wewnętrznej, Wojskowa Akademia Medyczna, ul. Żeromskiego 113, 90-549 Łódź.

minian (9). Okazało się, że wymienione enzymy katalizują cykl przemian chemicznych, w który włączone są prawie wszystkie aminokwasy wchodzące w skład cząsteczek białkowych. Cykl ten otrzymał nazwę cyklu γ -glutamylowego (4).

Zdaniem Meistera (4) cykl γ -glutamylowy jest jednym z układów przenoszących aminokwasy przez błony komórkowe. Zasadnicza rola glutationu w procesie przenoszenia aminokwasów polega na dostarczaniu grup γ -glutamylowych, służących jako nośniki.

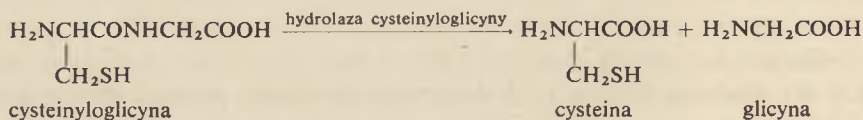
I. Enzymy przemiany glutationu

Wszystkie komórki zawierają enzymy konieczne dla degradacji a także dla jego syntezy ze składowych aminokwasów (10). Inkubacja glutationu z homogenatem nerki prowadzi do powstania 5-oksoproliny i cysteinyloglicyny. Degradację glutationu katalizują w połączonym działaniu γ -glutamylotranspeptydaza i γ -glutamylocyklotransferaza (11). γ -glutamylotranspeptydaza katalizuje reakcję między glutationem i aminokwasem, w której odszczepiona zostaje cysteinyloglicyna, a reszta γ -glutamylowa glutationu tworzy odpowiedni γ -glutamylaminokwas:

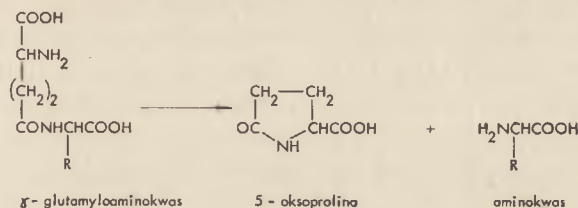


Wszystkie aminokwasy występujące w białkach, z wyjątkiem proliny, mogą być substratami tej reakcji (12).

Odpowiednia peptydaza (hydrolaza L-cysteinyloglicyny, E.C. 3.4.3.5.) rozszczepia cysteinyloglicynę i powoduje uwolnienie cysteiny i glicyny (10):



γ -glutamylocyklotransferaza katalizuje przekształcenie γ -glutamylaminokwasu w 5-oksoprolinę i wolny aminokwas (13):



Należy zauważyć, że γ -glutamylotranspeptydaza może katalizować reakcję transpeptydacji z wykorzystaniem innych niż glutation substratów, np. γ -glutamyllopeptydów, naftyloamidów i anilidów (14, 15). γ -glutamylotranspeptydaza jest enzymem związanym z błoną komórkową. Badania histochemiczne wykazały, że γ -glutamylotranspeptydaza występuje w rąbku szczoteczkowym kanalików proksymalnych nerki (16, 17), którą to część nefronu uważa się za główne miejsce reabsorpcji aminokwasów (18). Enzym ten występuje również w rąbku szczoteczkowym śluzówki jelita (15). W homogenacie nerki γ -glutamylotranspeptydaza występuje we frakcji nierozpuszczalnej i aby przeprowadzić enzym w postać rozpuszczalną trzeba zastosować ekstrakcję roztworem z dodatkiem dezoksycholanu (19). Badania izolowanej frakcji komórek rąbka szczoteczkowego kanalików nerkowych szczura wskazują, że γ -glutamylotranspeptydaza stanowi około 1,5% wszystkich białek obecnych w błonie (20). Enzym ten jest glikoproteidem i zawiera 35% węglowodanów (19).

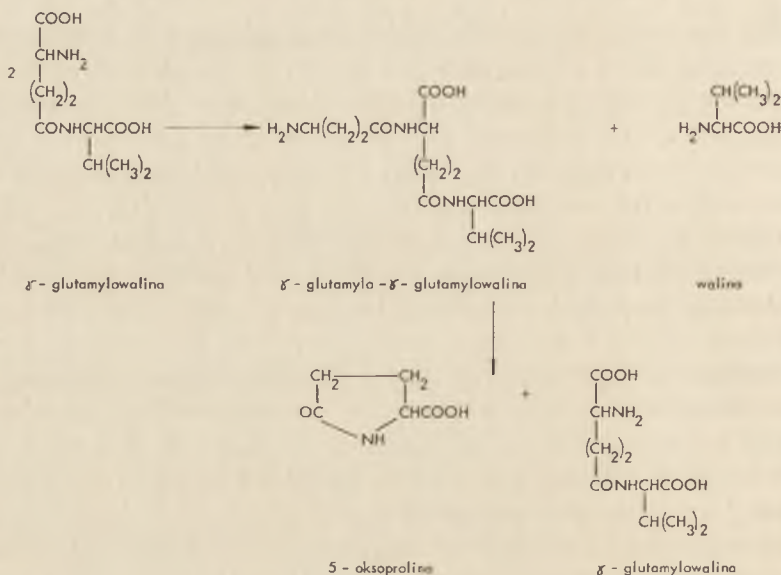
γ -glutamylocyklotransferaza w odróżnieniu od γ -glutamylotranspeptydazy jest enzymem rozpuszczalnym, łatwo uwalniającym się z komórek i nie zawiera węglowodanów (10). Enzym otrzymano już w wysoce oczyszczonej postaci z wielu tkanek (6, 21).

Zarówno γ -glutamylotranspeptydaza jak i γ -glutamylocyklotransferaza występują powszechnie w tkankach ssaków, ale największą ich aktywność stwierdza się w nerkach (13).

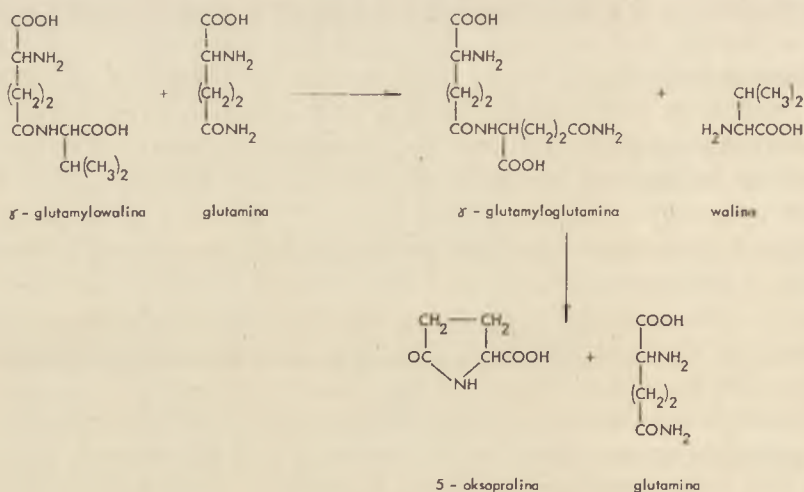
Występowanie w nerce glutationu w wysokich stężeniach (4–5 mmoli) mimo, że zawiera ona enzymy rozkładające go, sugerowało obecność enzymów syntetyzujących glutation. Opracowany w laboratorium Meistera sposób oznaczania aktywności syntetazy γ -glutamylcysteiny w obecności γ -glutamylotranspeptydazy oraz γ -glutamylocyklotransferazy pozwolił wykazać, że enzym ten występuje powszechnie w tkankach ssaków (7). W następnym etapie badań izolowano z nerki szczura wysoce oczyszczony preparat syntetazy γ -glutamylcysteiny (22). Najwyższą aktywność syntetazy γ -glutamylcysteiny stwierdzono w nerkach gdzie enzym ten stanowi 2–3% wszystkich rozpuszczalnych białek nerki szczura (10). Obliczono, że szybkość syntezy i degradacji glutationu w nerce szczura jest tego samego rzędu i wynosi około 1 grama na dobę (10).

γ -glutamylaminokwasy ulegają przekształceniu w 5-oksoprolinę oraz wolne aminokwasy w reakcji katalizowanej przez γ -glutamylocyklotransferazę (23). γ -glutamylowe pochodne glutaminy, metioniny, glicyny, ala-

niny i cysteiny są bardzo dobrymi substratami tego enzymu (6). Inne natomiast γ -glutamylowe pochodne aminokwasów np. γ -glutamylowalina są gorszymi substratami i ulegają przekształceniu, przez działanie γ -glutamylotranspeptydazy, w pochodną γ -glutamilo- γ -glutamiloaminokwasową (10). Powstałe dwu- γ -glutamylowe pochodne aminokwasów są dobrymi substratami γ -glutamylotransferazy (schemat 1) (6).



γ -glutamylotranspeptydaza katalizuje reakcję między γ -glutamiloaminokwasem i wolnymi aminokwasami a więc γ -glutamylowalina oraz inne pochodne γ -glutamylowe, będące gorszymi substratami γ -glutamylotransferazy, są rozszczepiane na następującej drodze:



Niektóre γ -glutamylaminokwasy ulegają hydrolizie do glutaminianu i aminokwasu. Dotychczasowe jednak badania wskazują na bardzo powolny przebieg tej reakcji i można przypuszczać, że nie ma ona większego znaczenia w metabolizmie (10).

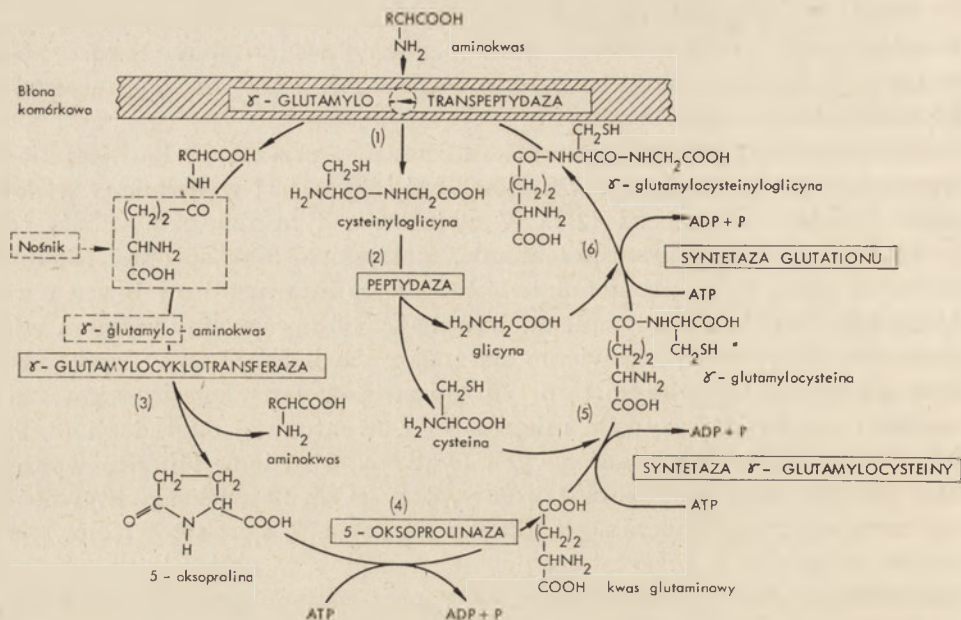
5-oksoprolina, produkt reakcji katalizowanej przez γ -glutamylcyklotransferazę nie gromadzi się w nerkach ani też nie jest wydalana w większych ilościach do moczu (23). W związku z tym należało sądzić, że 5-oksoprolina ulega dalszej przemianie. Metabolizm 5-oksoproliny badano wiele lat temu ale w piśmiennictwie brak było informacji o miejscu rozkładu tego związku. Podawanie znakowanej ^{14}C 5-oksoproliny myszom lub szczurom powodowało pojawienie się znacznych ilości $^{14}\text{CO}_2$ w wydychanym powietrzu. Świadczyło to o tym, że związek ten ulega częściowemu spalaniu ale nie wskazywało miejsca jego ewentualnej degradacji (8, 9, 24). Badania skrawków tkankowych (wątroby, śledziony i nerki) wykazały, szybkie utlenianie 5-oksoproliny, przy czym największą aktywnością metaboliczną odznaczała się tkanka nerkowa. Z nerek też izolowano enzym katalizujący przekształcenie 5-oksoproliny w glutaminian, z rozszczepieniem ATP i uwolnieniem ADP oraz fosforanu nieorganicznego.

Wykrycie reakcji katalizowanej przez 5-oksoprolinazę połączyło ostatni etap degradacji glutationu, katalizowany przez γ -glutamylcyklotransferazę, z pierwszym etapem jego biosyntezy, który katalizuje syntetaza γ -glutamylcysteiny (Ryc. 1).

II. Cykl γ -glutamylowy

Sześć omówionych poprzednio enzymów bierze udział w zamkniętym ciągu reakcji nazwanym przez Meistera cyklem γ -glutamylowym (4). Kolejne etapy tego cyklu przedstawiono na rycinie 1.

Związana z błoną komórkową γ -glutamylotranspeptydaza reaguje z aminokwasem znajdującym się poza komórką oraz glutationem obecnym w komórce. W wyniku reakcji katalizowanej przez ten enzym ugrupowanie γ -glutamylowe z glutationu zostaje przeniesione na aminokwas i utworzony γ -glutamylaminokwas zostaje wprowadzony do wnętrza komórki (etap 1). Powstały w tej reakcji dwupeptyd cysteinyloglicyna w wyniku działania odpowiedniej peptydazy ulega rozkładowi do cysteiny i glicyny (etap 2). Pod wpływem γ -glutamylcyklotransferazy z połączenia γ -glutamylaminokwas uwalnia się aminokwas a reszta γ -glutamylowa przekształca się w 5-oksoprolinę (etap 3). 5-oksoprolina ulega przekształceniu w glutaminian w obecności 5-oksoprolinazy (etap 4). Glutaminian oraz cysteina i glicyna (powstałe z hydrolizy cysteinyloglicyny) mogą zostać wykorzystane do resyntezy cząsteczki glutationu w dwóch kolejnych reakcjach katalizowanych przez syntetazę γ -glutamylcysteiny (etap 5) oraz przez syntetazę glutationu (etap 6).

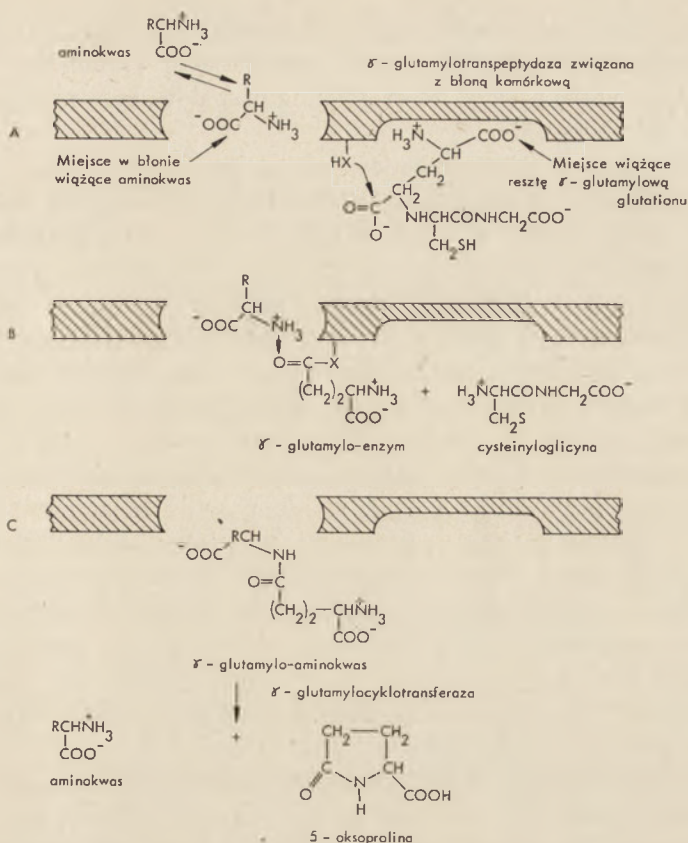


Ryc. 1. Cykl γ -glutamyłowy (10).

γ -glutamylotranspeptydaza katalizuje przeniesienie ugrupowania γ -glutamyłowego z glutationu na aminokwas tworząc γ -glutamylaminokwas (1). Powstający w tej reakcji dwupeptyd cysteinylglycyna w wyniku działania odpowiedniej peptydazy ulega rozkładowi do cysteiny i glicyny (2). γ -glutamylcyklotransferaza uwalnia aminokwas z połączenia γ -glutamylaminokwas, a reszta γ -glutamyłowa przekształca się w 5-oksoprolinę (3). 5-oksoprolina ulega przemianom w kwas glutaminowy w obecności 5-oksoprolinazy (4). Kwas glutaminowy oraz cysteina i glicyna (powstałe po hydrolizie cysteinylglycyny) są wykorzystywane do resyntezy glutationu w dwóch kolejnych reakcjach katalizowanych przez syntetazę γ -glutamyllocysteiny (5) oraz syntetazę glutationu (6).

Jednemu obrotowi cyklu towarzyszy włączenie i uwolnienie jednej cząsteczki aminokwasu w niezmienionej postaci. Ponadto każdemu uwolnieniu cząsteczki aminokwasu towarzyszy powstanie i zużycie jednej cząsteczki 5-oksoproliny. Na każdy obrót cyklu zużywane są trzy cząsteczki ATP (etapy 4, 5 i 6). W ten sposób transport 0,5mola aminokwasów (ilość jaka jest reabsorbowana przeciętnie w ciągu doby przez nerki człowieka) (18), wymaga zużycia 1,5mola ATP. Tę ilość wydatku energetycznego można porównać ze zużyciem 2 moli ATP dla syntezy 0,5mola mocznika (ilości tworzonej przez człowieka w ciągu doby) (23). Znaczne wymagania energetyczne transportu aminokwasów poprzez cykl γ -glutamyłowy odpowiadają wysokiej wydajności reabsorpcji aminokwasów w kanalikach nerkowych.

Etapem cyklu γ -glutamyłowego biorącym bezpośredni udział w przeniesieniu aminokwasu ze środowiska poza komórkowego do wnętrza komórki jest etap katalizowany przez γ -glutamylotranspeptydazę. Meister (10) zaproponował następujący hipotetyczny schemat translokacji aminokwasu przez błonę komórkową (Ryc. 2). Zgodnie z tym schematem



Ryc. 2. Skłócanie aminokwasu przez błonę komórkową z udziałem γ -glutamylotranspeptydazy (10).

Aminokwas wiąże się niekowalencyjnie z błoną komórkową w pobliżu miejsca gdzie znajduje się γ -glutamylotranspeptydaza (A). Ugrupowanie X związanej z błoną γ -glutamylotranspeptydazy wchodzi w reakcję z resztą γ -glutamylową glutationu co prowadzi do powstania γ -glutamiloenzymu i uwolnienia cysteinyloglicyny (B). Atak nukleofilowy atomu azotu na γ -atom węgla γ -glutamiloenzymu prowadzi do powstania połączenia γ -glutamiloaminokwas i uwolnienia enzymu (C). Powstanie połączenia γ -glutamiloaminokwasowego powoduje odłączenie aminokwasu od miejsca wiążącego na zewnętrznej części błony i przeniesienie go do wnętrza komórki.

aminokwas wiąże się niekowalencyjnie z błoną komórkową w pobliżu miejsca gdzie znajduje się γ -glutamylotranspeptydaza (Ryc. 2A). Ugrupowanie X związanej z błoną γ -glutamylotranspeptydazy, wchodzi w reakcję z resztą γ -glutamylową glutationu co prowadzi do powstania γ -glutamiloenzymu i uwolnienia cysteinyloglicyny (Ryc. 2B). Atak nukleofilowy atomu azotu na γ -atom węgla γ -glutamiloenzymu prowadzi do powstania połączenia γ -glutamiloaminokwas i uwolnienia enzymu (Ryc. 2C). Powstanie połączenia γ -glutamiloaminokwasowego (nośnik-aminokwas) powoduje odłączenie aminokwasu od miejsca wiążącego na zewnętrznej części błony i przeniesienie go wnętrza komórki. Przeniesienie aminokwasu może przypuszczalnie odbywać się albo przez otwór w błonie, albo też jako wynik zmian konformacyjnych w elementach strukturalnych błony.

Kompleks nośnik-aminokwas, teraz już wewnątrz komórki, staje się substratem γ -glutamylocyklotransferazy uwalniającej aminokwas od nośnika. Powstająca w tej reakcji 5-oksoprolina ulega dalszym przemianom, jak przedstawiono na rycinie 1.

Zebrano już dość dużo dowodów na to, że enzymy cyklu γ -glutamyłowego występują powszechnie w komórkach zwierzęcych a co za tym idzie, że w komórkach tych może funkcjonować cykl γ -glutamyłowy (10, 23, 25, 26).

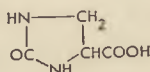
Stwierdzenie wysokiej aktywności enzymów cyklu γ -glutamyłowego w splocie naczyniowym mózgu (27) potwierdza koncepcję, że cykl γ -glutamyłowy jest również zaangażowany w procesie transportu aminokwasów przez barierę krew — płyn mózgowo-rdzeniowy. Splot naczyniowy mózgu bierze udział w zjawisku transportu przez barierę krew — płyn mózgowo-rdzeniowy i istnieje pewna analogia między mechanizmem tworzenia moczu przez nefrony i wydzielaniem płynu mózgowo-rdzeniowego przez splot naczyniowy (23). Aktywność enzymów cyklu γ -glutamyłowego jest dużo wyższa w splocie naczyniowym niż w innych częściach mózgu, a badania histochemiczne wykazały, że γ -glutamylotranspeptydaza występuje w szczytowej części komórek nabłonkowych spłotu (23).

Obecność γ -glutamylaminokwasów w mózgu (28, 29), podobnie jak w moczu (30), potwierdza sugestie odnośnie udziału cyklu γ -glutamyłowego w transporcie aminokwasów w mózgu i nerce.

Inne komórki mózgu, poza komórkami spłotu naczyniowego, np. niektóre neurony również wykazują wysoką aktywność enzymów cyklu γ -glutamyłowego (23). Przypuszcza się, że cykl może odgrywać ważną rolę w transporcie aminokwasów występującym w procesie przewodnictwa synaptycznego (23).

Wysoką aktywność enzymów cyklu γ -glutamyłowego wykazano także w ciałkach rzęskowych oka, a ponadto stwierdzono obecność wszystkich enzymów tego cyklu, z wyjątkiem 5-oksoprolinazy, w soczewce oka (31). Badania histochemiczne potwierdziły obecność γ -glutamylotranspeptydazy w części podstawowej komórek nabłonkowych ciała rzęskowego (31). Te dane wskazują, że cykl γ -glutamyłowy bierze również czynny udział w transporcie aminokwasów przez barierę krew — ciecz wodnista komory oka.

Częściowe potwierdzenie funkcjonowania cyklu γ -glutamyłowego *in vivo* uzyskano w doświadczeniach na zwierzętach, którym podawano kwas 2-imidazolidono-4-karboksylowy.



Związek ten jest analogiem strukturalnym 5-oksoproliny i ma właściwości kompetytywnego hamowania aktywności 5-oksoprolinazy (32). Wstrzyknięcie myszom kwasu 2-imidazolidono-4-karboksylowego zmniejsza

szało zużycie podanej równolegle 5-oksoproliny i prowadziło do nagromadzenia 5-oksoproliny w wielu tkankach (mózgu, wątrobie, nerkach, oczach), duże ilości były jednak wydalane do moczu (11). Zahamowanie aktywności 5-oksoprolinazy przez kwas 2-imidazolidono-4-karboksyłowy nie przerywa działania cyklu γ -glutamylowego, ale zwalnia tylko jego działanie. W komórce występują bowiem inne drogi przemian w których może być tworzony glutaminian, np. redukcyjna aminacja α -katoglutaranu lub hydroliza glutaminy.

III. Schorzenia spowodowane defektem enzymatycznym w cyklu γ -glutamylowym

Badania nad wrodzonymi i nabytymi defektami enzymatycznymi, które mogą występować na określonym etapie cyklu γ -glutamylowego, dostarczyły danych przemawiających za występowaniem tego cyklu w komórkach organizmu ludzkiego.

Jednym ze stwierdzonych objawów chorobowych spowodowanych defektem enzymatycznym w cyklu γ -glutamylowym jest 5-oksoprolinuria. W opisanych przypadkach chorych z tym defektem wykazano wydalanie do moczu znacznych ilości 5-oksoproliny. Jeden z badanych chorych wydalął w moczu dobowym 25—35 gramów tego związku (33), podczas gdy wydalanie dobowe 5-oksoproliny u ludzi zdrowych nie przekracza kilku miligramów na dobę (34, 35). Podanie dożylnie choremu roztworu zawierającego mieszaninę różnych aminokwasów, powodowało nasilenie wydalania 5-oksoproliny (23). Podanie ludziom zdrowym znakowanej ^{14}C 5-oksoproliny prowadzi do wydalania znacznej ilości dwutlenku węgla radioaktywnego w wydychanym powietrzu, natomiast u chorych z 5-oksoprolinurią wykrywano w wydychanym powietrzu tylko niewielkie jego ilości. Tak niska przemiana znakowanej 5-oksoproliny była przypuszczalnie spowodowana rozcieńczeniem tego preparatu przez wysokie stężenie 5-oksoproliny w osoczu krwi tego chorego (24).

U innej chorej wydalanie 5-oksoproliny do moczu przekraczało 6 gramów na dobę a stężenie tego związku w osoczu krwi wynosiło 2—5 mmola/litr. Podając małe dawki ^{14}C 5-oksoproliny wykazano, że 25% tego związku jest wydalane do moczu, a reszta ulega przemianie (36). Trzeci opisany przypadek 5-oksoprolinurii dotyczył siostry opisanej poprzednio chorej (36). Obie siostry miały wyraźnie obniżone stężenie glutationu w erytrocytach. Ponadto erytrocyty wykazywały zwiększoną podatność na hemolizę. Badanie erytrocytów oraz fibroblastów skóry tych chorych, pozwoliło stwierdzić, że defekt metaboliczny w cyklu γ -glutamylowym występował na etapie reakcji katalizowanej przez syntetazę glutationu (36). Aktywność tego enzymu w fibroblastach skóry chorych stanowiła mniej niż 5% tej aktywności, jaką oznaczono w fibroblastach skóry ludzi zdrowych. Aktywność syntetazy glutationu w erytrocytach ojca badanych chorych była wyraźnie obniżona, w erytrocytach matki zaś niewiele różniła się

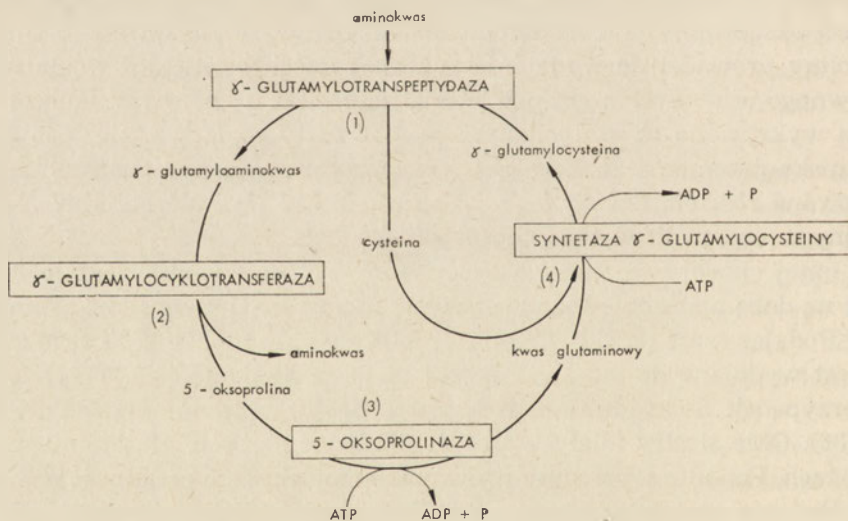
od wartości prawidłowych. Pozwala to przypuszczać, że obserwowany defekt enzymatyczny miał charakter wrodzony, dziedziczony po jednym z rodziców.

Badania aktywności syntetazy glutationu w mieszaninie ekstraktów komórkowych pochodzących od chorych z 5-oksoprolinurią oraz zdrowych wykazały, że ekstrakty z komórek chorych nie hamują aktywności tego enzymu (36). Wskazuje to, że 5-oksoprolinuria jest wynikiem niedoboru syntetazy glutationu a nie zahamowania jej aktywności.

Doniesiono również o kilku innych chorych, u których wystąpił niedobór syntetazy glutationu z towarzyszącą temu chorobą hemolityczną (37, 38, 39). W opisanych przypadkach nie podano jednak, czy u chorych tych wystąpiła 5-oksoprolinuria. W związku z tym nie można wykluczyć jednej z alternatyw, że albo chorzy ci wykazywali niedobór syntetazy glutationu ograniczony tylko do erytrocytów albo, że u chorych tych nie rozpoznano 5-oksoprolinurii.

Wysoki odsetek chorych z wrodzoną zaćmą oczu wykazuje także aminoacidurię i w związku z tym zaburzenia w transporcie aminokwasów przez kanaliki nerkowe i nabłonek rzęskowy mogą być spowodowane takim samym defektem w cyklu γ -glutamyłowym (31).

Meister (10) uważa, że niedobór syntetazy glutationu może prowadzić do wystąpienia 5-oksoprolinurii, bo wtedy nadmierna ilość γ -glutamylcysteiny przekształca się w 5-oksoprolinę (reakcja katalizowana przez



Ryc. 3. Modyfikacja cyklu γ -glutamyłowego spowodowane nieobecnością syntetazy glutationu (23).

γ -glutamylotranspeptydaza katalizuje przeniesienie ugrupowania γ -glutamyłowego z γ -glutamylcysteiny na aminokwas tworząc γ -glutamylaminokwas (1). γ -glutamylcyklotransferaza uwalnia aminokwas z połączenia γ -glutamylaminokwasowego, a reszta γ -glutamyłowa przekształca się w 5-oksoprolinę (2). 5-oksoprolina ulega przemianie w kwas glutaminowy w obecności 5-oksoprolinazy (3). Kwas glutaminowy oraz cysteina (uwolniona w reakcji 1) są wykorzystywane do resyntezy γ -glutamylcysteiny w reakcji katalizowanej przez syntetazę γ -glutamylcysteiny (4).

γ -glutamylcyklotransferazę) i nadprodukcja tego związku przekracza zdolności 5-oksoprolinazy do przemiany w glutaminian.

Jak dotąd nie obserwowano, by u chorych z 5-oksoprolinurią występowały zaburzenia w transporcie aminokwasów (23). Przypuszczalnie prawidłowy przebieg transportu poprzez cykl γ -glutamylowy może mieć również miejsce i przy niskich stężeniach glutationu w komórce. γ -glutamylcysteina, która jest bardzo dobrym substratem γ -glutamylotranspeptydazy, może zastąpić glutation w reakcji transpeptydacji z aminokwasami (12). W ten sposób u chorych z niedoborem lub nawet brakiem syntetazy glutationu, cykl γ -glutamylowy może funkcjonować z udziałem tylko czterech enzymów (Ryc. 3).

Tłumacząc działanie cyklu γ -glutamylowego przy niedoborze lub braku syntetazy glutationu Meister (23) uważa, że przedziałowość wewnątrzkomórkowa γ -glutamylcyklotransferazy oraz syntetazy γ -glutamylcysteiny może być przyczyną pewnej niedostępności γ -glutamylcysteiny dla γ -glutamylcyklotransferazy. Przy dużym jednak nagromadzeniu się tego dwupeptydu pewna jego część może się stać substratem γ -glutamylcyklotransferazy. Powstające w tej reakcji 5-oksoprolina i cysteina mogą być ponownie włączane w obieg cyklu. Występowanie takiej przemiany γ -glutamylcysteiny wymaga oczywiście zwiększenia syntezy tego dwupeptydu aby reakcja transpeptydacji mogła przebiegać normalnie. Aktywność syntetazy γ -glutamylcysteiny oraz syntetazy glutationu znacznie przewyższa tę jaka jest konieczna dla utrzymania prawidłowego stężenia glutationu. Meister (23) przypuszcza, że glutation oddziałuje na szybkość syntezy γ -glutamylcysteiny na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Przy niskim stężeniu glutationu w komórce powinna zwiększać się synteza γ -glutamylcysteiny. Wewnątrzkomórkowe stężenie cysteiny może również odgrywać pewną rolę w określaniu szybkości syntezy γ -glutamylcysteiny. Przy obniżeniu stężenia glutationu, stężenie wolnej cysteiny może się zwiększać i w ten sposób stymulować syntezę γ -glutamylcysteiny.

IV. Uwagi końcowe

Hipoteza Meistersa (4) o udziale cyklu γ -glutamylowego w procesie transportu aminokwasów, została sformułowana na podstawie uzyskanych przez tego badacza danych doświadczalnych oraz fakcie, że cykl γ -glutamylowy wykazuje cechy które w pełni odpowiadają wymaganiom jakie stawiane są układowi aktywnie przenoszącemu aminokwasy przez błonę komórkową (42, 43). W układzie tym γ -glutamylotranspeptydaza, enzym związany z błoną komórkową, wchodzi w kontakt z aminokwasami znajdującymi się na zewnątrz komórki oraz z glutationem występującym w roli prekursora dla nośnika, którym jest ugrupowanie γ -glutamylowe;

γ -glutamylcyklotransferaza katalizuje uwolnienie aminokwasu z nośnika, który poprzez kolejne reakcje (resynteza glutationu) może być ponownie wykorzystany. Trzy etapy cyklu wymagają dostarczenia energii.

Fakt, że wszystkie reakcje biochemiczne, jakie przebiegają w cyklu γ -glutamylowym, dotyczą procesu rozkładu i syntezy glutationu, wskazują na istotną rolę tego trójpeptydu w procesie transportu aminokwasów, jakkolwiek cykl γ -glutamylowy może również funkcjonować w pewnych warunkach (wysokie stężenie γ -glutamylcysteiny) w nieobecności glutationu. Warto zauważyć, że liczne i różnorodne funkcje glutationu, wynikające z obecności w cząsteczce grupy —SH nie mają większego wpływu na procesy jego syntezy i degradacji. Procesy te zależą od występowania w cząsteczce glutationu ugrupowania γ -glutamylowego, które bierze bezpośredni udział w przenoszeniu aminokwasów ze środowiska pozakomórkowego do komórki.

Szybkość przemiany glutationu jest wynikiem wysokiej aktywności enzymów cyklu γ -glutamylowego, związanych z procesem transportu aminokwasów. Szczególnie wysoką aktywność tych enzymów wykazuje nerka (20). Szybkość przemiany glutationu w nerce (wynosząca $64,3 \pm 15,4$ mmola/minutę/gram tkanki) jest co prawda dużo niższa od tej jaka byłaby niezbędna dla reabsorpcji aminokwasów z moczu kanalikowego (przyjmując szybkość filtracji kłębkowej 0,8 ml/minutę/gram i stężenie aminokwasów 3 mmole) (40). Te dane jednak nie mogą przemawiać przeciwko koncepcji udziału glutationu, za pośrednictwem cyklu γ -glutamylowego, w procesie reabsorpcji aminokwasów z moczu kanalikowego. Wynika to z tego że, rozmieszczenie glutationu w nerce, podobnie jak enzymów jego syntezy i rozkładu, nie jest jednolite (41). Jeśli cykl γ -glutamylowy bierze udział w reabsorpcji aminokwasów, to glutation oraz inne substraty i enzymy cyklu powinny występować w miejscu reabsorpcji, tj. w rąbku szczoteczkowym kanalika proksymalnego. W tej części nefronu glutation powinien ulegać znacznie szybciej przemianie niż w innych miejscach tej jednostki czynnościowej nerki. Podobne rozważania można odnieść także do przemiany glutationu w mózgu, gdzie jest ona bardzo wolna (24). Ale wysoka aktywność enzymów cyklu γ -glutamylowego stwierdzona w splocie naczyniowym (29), wskazuje, że przynajmniej w tej części mózgu (stanowiącej około 0,1% ciężaru całego mózgu) przemiana glutationu jest dużo wyższa niż to się obserwuje dla całej tkanki mózgowej.

Jak się wydaje, cykl γ -glutamylowy współdziała w transporcie nie wszystkich aminokwasów. Istnieją również inne układy transportujące aminokwasy, a rola i udział cyklu γ -glutamylowego w procesie transportu może się zmieniać w szerokim zakresie dla różnych tkanek i narządów. Poza reakcjami katalizowanymi przez γ -glutamylcyklotransferazę, 5-oksoprolinazę oraz reakcjami syntezy glutationu mogą istnieć inne reakcje aktywujące układ transportujący, w skład którego wchodzi — glutamyl-

transpeptydaza, bez usuwania nośnika γ -glutamylowego poprzez cykliczację lub hydrolizę (40). Takie mechanizmy, przebiegające z zależnymi od energii zmianami w konformacji γ -glutamylotranspeptydazy (40) lub wpływem jonów Na^+ (43), mogą także w pewnym stopniu wyjaśnić różnice w szybkości przemiany glutationu i szybkości transportu aminokwasów w nerce.

Wydaje się, że przedstawiona rola cyklu γ -glutamylowego w transporcie aminokwasów nie jest jedyną rolą tego cyklu. Być może cykl γ -glutamylowy bierze również udział w transporcie peptydów.

Artykuł nadszedł 13.9.1975, po rewizji autorskiej otrzymano 8.2.1976.

PIŚMIENICTWO

1. Knox W. E., (1960) w *The Enzymes*, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K., t. 2, str. 253—294, Academic Press, Inc. Publishers, New York.
2. Kappas A., Alvares A. P., (1975), *Sci. Am.*, **232**, 22—31.
3. Baranowski T., (1974) w *Enzymologia kliniczna*, red. Szczeklik E., str. 24—25, PZWL, Warszawa.
4. Orłowski M., Meister A., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1248—1255.
5. Orłowski M., Meister A., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 338—347.
6. Orłowski M., Richman P., Meister A., (1969), *Biochemistry*, **8**, 1048—1055.
7. Orłowski M., Meister A., (1971), *Biochemistry*, **10**, 372—380.
8. Meister A., (1974) w *The Enzymes*, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K., t. 10, str. 671—697, Academic Press, Inc. Publishers, New York.
9. Van der Werf P., Orłowski M., Meister A., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2982—2985.
10. Meister A., (1973), *Science*, **180**, 33—39.
11. Van der Werf P., Stephani R. A., Meister A., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1026—1029.
12. Tate S. S., Meister A., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7593—7602.
13. Meister A., (1974), *Life Sci.*, **15**, 177—190.
14. Orłowski M., Szewczuk A., (1961), *Acta Biochim. Pol.*, **8**, 189—200.
15. Szczeklik A., Szewczuk A., (1974) w *Enzymologia kliniczna*, red. Szczeklik E., str. 236—238, PZWL, Warszawa.
16. Albert Z., Orłowski M., Szewczuk A., (1961), *Nature*, **191**, 767—768.
17. Glenner G. G., Folk J. E., McMillan P. J., (1962), *J. Histochem. Cytochem.*, **10**, 481—489.
18. Kiersz J., (1970), w *Fizjologia nerek*, str. 231—232, PZWL, Warszawa.
19. Szewczuk A., Baranowski T., (1963), *Biochem. Z.*, **338**, 317—329.
20. Glossmann H., Neville D. M., (1972), *FEBS Letters*, **19**, 340—344.
21. Adamson E. D., Szewczuk A., Connell C. E., (1971), *Can. J. Biochem.*, **49**, 218—226.
22. Orłowski M., Meister A., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7095—7105.
23. Meister A., (1974), *Ann. Int. Med.*, **81**, 247—253.
24. Ramakrishna M., Krishnaswamy P. R., Rao D. R., (1970), *Biochem. J.*, **118**, 895—897.
25. Albert Z., Rzucidło Z., Starzyk H., (1970), *Acta Histochem.*, **37**, 74—79.

26. Palekar A. G., Tate S. S., Meister A., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 293—297.
27. Tate S. S., Ross L. L., Meister A., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1447—1449.
28. Reichelt K. L., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 19—25.
29. Verteeg D. H. G., Witter A., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 41—52.
30. Buchanan D. L., Haley E. E., Markiw R. T., (1962), *Biochemistry*, **1**, 612—620.
31. Ross L. L., Barber L., Tate S. S., Meister A., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2211—2214.
32. Van der Werf P., Stephani R. A., Orłowski M., Meister A., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 759—761.
33. Jellum E., Kluge T., Børresen H. C., Stokke O., Eldjarn L., (1970), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **26**, 327—335.
34. Meister A., Bukenberger M. W., Strassburger M., (1963), *Biochem. Z.*, **338**, 217—229.
35. Eldjarn L., Jellum E., Stokke O., (1972), *Clin. Chim. Acta*, **40**, 461—476.
36. Hagenfeldt L., Larsson A., Zetterström R., (1973), *Acta Pediatr. Scand.*, **63**, 1—8.
37. Cort M., Loos J. A., Prins H. K., (1961), *Vox Sang.*, **6**, 370—373.
38. Boivin P., Galand C., (1965), *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **5**, 707—720.
39. Boivin P., Galand C., Bernard J. F., (1973), w Glutathione. Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry, str. 146—156, Georg Thieme Verlag, Tübingen, Stuttgart.
40. Sekura R., Meister A., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2969—2972.
41. Palekar A. G., Tate S. S., Meister A., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 651—657.
42. Dudek G., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 333—345.
43. Curran P. F., (1972), *Arch. Int. Med.*, **129**, 258—269.

JERZY K. PIOTROWSKI *, EWA M. MOGILNICKA **

Metalotioneina

Metalothionein

I. Wstęp

W tkankach zwierząt i roślin występują w normalnych warunkach śladowe ilości kadmu. Poszukując informacji o biologicznym znaczeniu tego pierwiastka, Margoshes i Vallee wykazali w roku 1957, że w korze nerek końskich kadm występuje w postaci kompleksu ze specyficznym białkiem (1). W nieco późniejszych badaniach stwierdzono, że jest to białko o niskiej masie cząsteczkowej, około 10 000, o dużej zawartości siarki, zawierające w stanie natywnym kadm i cynk (2, 3). Białko to nazwano metalotioneiną. Piscator znalazł duże ilości tego białka w wątrobie królików, którym podawano kadm (4), a następnie Pulido, Kāgi i Vallee wyizolowali analogiczne białko z kory nerek ludzkich (5).

Wykrycie metalotioneiny pozostawało początkowo nie zauważone. Większe zainteresowanie tym białkiem w ostatnich latach związane jest z ogólnym wzrostem zainteresowania toksykologią środowiskową. W Japonii zaobserwowano schorzenia spowodowane zatruciami kadmem (choroba „itai-itai”) (6) i rtęcią (choroba Minamata) (7). Opublikowano także badania dowodzące, że poziom kadmu w narządach ludzi wzrasta z wiekiem (8). Wyniki badań doprowadziły do wniosku, że za wieloletnią kumulację kadmu w wątrobie i nerkach odpowiedzialna jest metalotioneina. Odgrywa ona także dominującą rolę w odkładaniu rtęci w nerkach zwierząt i ludzi (5, 9, 10, 11).

* Doc. dr habil., ** mgr, Zakład Chemii Toksykologicznej, Instytut Badania Środowiska i Bioanalizy, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Narutowicza 120a, 90-145 Łódź.

II. Izolowanie, skład i właściwości metalotioneiny.

Pierwszy oczyszczony preparat metalotioneiny otrzymano z kory nerek końskich (2, 3); po ekstrakcji homogenatu buforem fosforanowym, usuwano białka balastowe działaniem etanolu i chloroformu. Po dializie preparat poddawano frakcjonowanemu wytrącaniu siarczanem amonu. W późniejszych pracach stosowano różne metody wyodrębniania tego białka z narządów. Białka balastowe usuwano przez zastosowanie Rivanolu (4, 12), lub wirowanie homogenatu do uzyskania frakcji postmitochondrialnej (13), bądź postmikrosomalnej (10, 14, 15). Preparat oczyszczano dodatkowo przez frakcjonowane wytrącanie siarczanem amonu (2, 16) lub acetonem (17, 18).

W celu wyodrębnienia właściwej frakcji białka, stosowano sączenie molekularne z zastosowaniem różnych kombinacji żeli Sephadex oraz żeli jonowymiennych z użyciem różnych gradientów stężeń buforów eluujących. Przed naniesieniem na kolumny roztwory zagęszczano przez odparowywanie pod zmniejszonym ciśnieniem (19, 20) lub metodą ultrafiltracji (12, 14, 21).

We wcześniejszych pracach masę cząsteczkową metalotioneiny oceniano zgodnie na 10 000—12 000 na podstawie szybkości sedymentacji i dyfuzji (3) oraz sączenia molekularnego (5, 19, 22—25). Masa cząsteczkowa białka wyliczona ze składu aminokwasowego (12) lub z sączenia molekularnego białka utlenionego uprzednio kwasem nadmanganowym w obecności 6 M chlorowodoru guanidyny (13) wynosiła 6 000—6 600. Ostatnio jednak w przypadku białka wyizolowanego z wątroby szczurów, masę cząsteczkową oceniono zarówno na podstawie analizy składu aminokwasowego i chromatografii kolumnowej na 10 000—12 000 (17).

Już w pierwszych badaniach nad metalotioneiną ustalono, że cechuje się ona wysoką zawartością siarki około 4,1% (3), a nawet 8,1% (5) występującej w postaci reszt cysteinyłowych posiadających reaktywne grupy SH.

Dotychczas opublikowane dane dotyczące składu aminokwasowego metalotioneiny wyodrębnionej z narządów różnych zwierząt tylko nieznacznie różnią się między sobą. Podano pełny skład aminokwasowy metalotioneiny wyodrębnionej z wątroby królika (12), wątroby szczura (17, 24, 26, 27), wątroby kurczęcia (24), nerek konia (13, 18, 25), wątroby konia (13), wątroby człowieka (28), nerek królika (29) oraz nerek szczura (30).

W tabeli 1 zamieszczono skład aminokwasowy metalotioneiny wyizolowanej z wątroby i nerek konia (13) oraz wątroby człowieka (28).

Głównym składnikiem metalotioneiny jest cysteina (26—34%). K ä g i i wsp. (13) przyjmując za podstawę ciężar cząsteczkowy tioneiny 6 000 podali następujący skład aminokwasowy białka: Lys₆, Arg₁, Asp₃, Thr₂, Ser₇, Glu₃, Pro₃, Gly₆, Ala₆, Cys₂₀, Val₂, Met₁.

Tabela 1

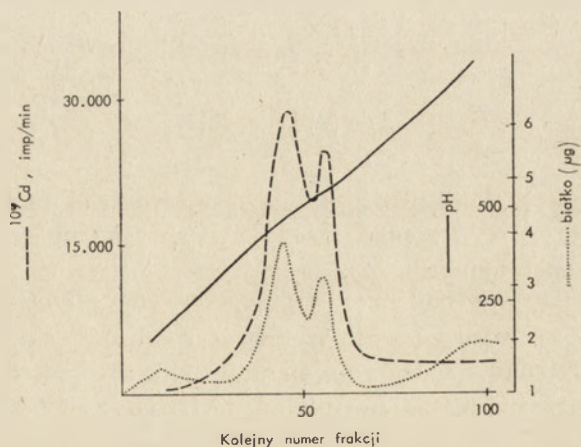
Procentowy skład aminokwasowy metalotioneiny wyizolowanej z wątroby i nerki konia (13) oraz z wątroby człowieka (28).

Aminokwas	metalotioneina wyodrębniona:		metalotioneina wyodrębniona z wątroby człowieka (28)	
	z nerek konia (13)	z wątroby konia (13)	I forma	II forma
lizyna	11,06	10,41	12,8	12,8
cysteina*	33,58	32,62	30,5	34,0
kwas asparaginowy	5,22	5,00	4,7	6,7
treonina	3,11	3,85	4,0	3,4
seryna	11,01	11,55	13,8	13,6
kwas glutaminowy	4,27	4,47	5,6	3,9
prolina	4,29	5,10	3,9	3,4
glicyna	10,01	10,08	8,0	8,5
alanina	9,68	9,43	9,5	11,2
metionina	1,68	1,50	1,3	1,4
izoleucyna	0,17	0,63	1,9	1,6
arginina	2,29	2,22	—	—
walina	3,11	2,57	—	—
leucyna	0,55	0,60	1,1	—

* cysteinę oznaczono jako kwas cysteinowy po utlenieniu kwasem nadmanganowym.

Preparaty metalotioneiny poddawane chromatografii jonowymiennej (17, 30), elektroforezie (28) lub ogniskowaniu izoelektrycznemu (12, 16) ulegają rozdzielaniu na dwie frakcje. Frakcje te różnią się nieznacznie składem aminokwasowym (12, 28, 30), zawartością metali, a także punktem izoelektrycznym. Dwie formy metalotioneiny wyodrębnionej z wątroby królika charakteryzują się punktami izoelektrycznymi 3,9 oraz 4,5 (12), pI metalotioneiny uzyskanej z wątroby szczura wynoszą 4,2 oraz 4,7 (16).

Z natywną metalotioneiną związane są głównie dwa metale: kadm



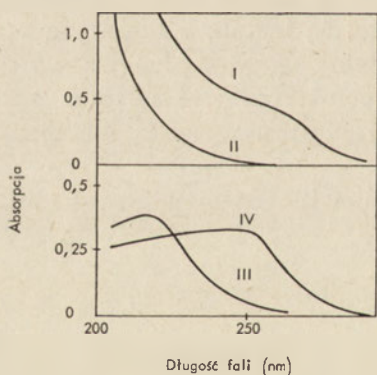
Ryc. 1. Rozdział metalotioneiny metodą ogniskowania izoelektrycznego.

Metalotioneina indukowana podawaniem kadmu, wyizolowana z wątroby szczura (16).

i cynk, a także niewielkie ilości miedzi i żelaza. Łączna zawartość metali związanych z białkiem wynosi 6 do 8 gramoatomów metalu na 6 000g białka, w tym 0,1 do 0,2 gramoatomu miedzi. Metalotioneina pochodząca z różnych narządów charakteryzuje się różną zawartością kadmu i cynku. W preparacie metalotioneiny uzyskanym z nerek końskich zawartość kadmu wynosiła 5,9%, cynku 3,2% (13). Metalotioneina z wątroby konia zawierała zaledwie 0,3% kadmu, przy znacznie wyższej zawartości cynku — 5,7%. W białku wyodrębnionym z wątroby ludzkiej również stwierdzono wyższy poziom cynku (7,5%) niż kadmu (0,2%) (28).

W związku z tym, że wyniki dotyczące poziomu kadmu i cynku w metalotioneinie, uzyskane w różnych pracowniach, nie są ze sobą zgodne, wygodniejszym kryterium wstępnej oceny czystości białka jest oznaczanie ilości reaktywnych grup SH. Stosowane są metody spektrofotometryczne (31, 32, 33), a także miareczkowanie amperometryczne (34). Zawartość reaktywnych grup sulfhydrylowych w przeliczeniu na mol białka 6 000 powinna wynosić około 20.

Widmo absorpcyjne metalotioneiny charakteryzuje brak absorpcji przy długości fali 280nm, związany z nieobecnością aminokwasów aromatycznych (3). Obserwuje się natomiast pasmo podwyższonej absorpcji w okolicy 250nm, charakteryzujące wiązanie Cd-cysteina. Wiązanie Zn-tioneina cechuje przesunięcie absorpcji w kierunku 215nm, a Hg-tioneina w kierunku fal dłuższych, około 270nm (14). W wyniku uwolnienia białka od



Ryc. 2. Widma absorpcyjne: I — metalotioneina, II — tioneina (apoproteina), III — cynkotioneina, IV — kadmotioneina (3).

metali (Cd, Zn) przez dializę w środowisku kwaśnym lub przez zastosowanie EDTA, zanika pasmo absorpcyjne charakteryzujące wiązanie białka z metalem (Ryc. 2).

W przeciwieństwie do kadmu, rtęć nie uwalnia się w środowisku kwaśnym. Właściwość tę wykorzystywano w celach identyfikacyjnych (10, 19). Całkowite wysycenie tioneiny rtęcią *in vitro* powoduje zmiany w strukturze przestrzennej białka, związane ze zmianą energii wiązania elektronów $S_{2P_{1/2, 3/2}}$ (35).

III. Metody oznaczania metalotioneiny i poziomy fizjologiczne.

Dotychczas nie opracowano metod, które nadawałyby się do ilościowego oznaczania metalotioneiny w tkankach.

W badaniach eluatów z kolumn chromatograficznych stosowane jest zazwyczaj oznaczanie metali, grup SH i absorpcji przy długości fali 250nm. Wartości tych trzech grup parametrów są ilościowo skorelowane. Na ogół dwa z nich wykorzystuje się równolegle w badaniach. Otrzymane wyniki sygnalizują jedynie obecność lub brak metalotioneiny w analizowanym materiale. Technika ta nadaje się głównie do badań porównawczych.

Opracowano metodę oznaczania metalotioneiny w tkankach (36) opartą na znakowaniu metalotioneiny nadmiarem rtęci ^{203}Hg w homogenatach tkanek i pomiarze aktywności supernatantu uzyskanego przez odbiałczanie TCA. Metodę stosowano do oznaczeń metalotioneiny w nerkach i w wątrobie szczurów. Metoda nie jest w pełni swoista. Niskocząsteczkowe związki występujące w tkankach wiążą rtęć i powodują zawyżenie wyników (37), które przy zastosowaniu tej metody zależą w pewnym stopniu również od czystości preparatu metalotioneiny, stosowanego jako wzorzec wewnętrzny.

W opracowanej ostatnio modyfikacji tej metody, wprowadzono dodatkowo, po uprzednim wytrąceniu innych białek TCA, wytrącanie ^{203}Hg -tioneiny taniną, co eliminuje wpływ związków niskocząsteczkowych na wyniki oznaczeń (38). Metoda nie jest jednak prawdopodobnie swoista w obecności innych niskocząsteczkowych białek wiążących metale (patrz rozdz. IV—4).

Informacje o fizjologicznych poziomach metalotioneiny w tkankach są niepełne i sprzeczne. W pracowniach, w których ocenę poziomów metalotioneiny oparto na oznaczaniu metali, grup SH oraz absorpcji eluatów uzyskanych po rozdziale chromatograficznym, nie wykrywano obecności metalotioneiny w wątrobie szczurów i myszy nie narażonych uprzednio na metale (22, 26, 39). Poziom tego białka oznaczany wspomnianą metodą radiochemiczną (36) jest niższy w wątrobie (średnio 0,13mg/g tkanki), niż w nerce (średnio 0,43mg/g tkanki) (23). W późniejszych badaniach (37, 40, 41), w tej samej pracowni uzyskiwano wyniki około dwukrotnie wyższe, co między innymi mogło być związane z warunkami hodowli zwierząt. Ostatnie badania przeprowadzone w pracowni autorów (42) wykazały, że poziom metalotioneiny w wątrobie i nerkach dorosłych szczurów jest zależny od zawartości kadmu (patrz rozdz. IV). Dorosłe szczury pochodzące z hodowli polskich, cechują się wysoką zawartością kadmu w narządach, sięgającą w skrajnych przypadkach 10 $\mu\text{g/g}$ w wątrobie i 20 $\mu\text{g/g}$ w nerce, podczas gdy dorosłe szczury używane do badań w innych pracowniach miały zawartość kadmu w tych narządach niższą o co najmniej rząd wielkości (26, 39).

Niezależnie od przyczyn tej rozbieżności, zjawiska zachodzące u zwierząt są o tyle interesujące, o ile stanowią model zjawisk zachodzących u ludzi. Poziom kadmu w nerkach ludzi jest wysoki i aż do późnego okresu dojrzałości (40—50 lat) ma tendencję rosnącą (8). W warunkach zbliżonych do fizjologicznych główną formą w jakiej znajduje się kadm w wątrobie i nerkach, jest kompleks z metalotioneiną (29, 43, 44). Należy więc przypuszczać, że poziom metalotioneiny w narządach ludzi jest wyższy, niż stwierdzany w narządach szczurów. Przemawia również za tym fakt, że białko to izolowano preparatywnie z nerek ludzkich (5) i wątroby ludzkiej (28). Fizjologiczny poziom metalotioneiny w narządach innych niż wątroba i nerka nie był systematycznie badany.

IV. Indukowana biosynteza metalotioneiny i wiązanie z metalami toksycznymi.

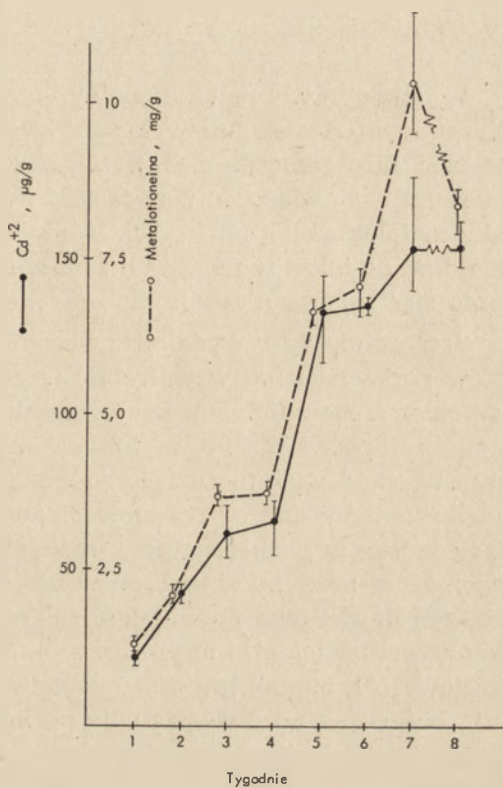
IV-1. Kadm

Kadm podawany królikom i szczurom przez dłuższy okres czasu jest selektywnie wiązany w narządach przez metalotioneinę (29, 43, 45). Stwierdzono również, że białko to wiąże kadm w wątrobie i nerkach człowieka, który przyjął wysoką dawkę tego metalu (46). Kadm w formie kompleksu o cechach metalotioneiny znajdowano nie tylko w wątrobie i nerkach, ale także we krwi i jądrach oraz sporadycznie w moczu myszy którym podawano jego związki (47, 48, 49). Informacje dotyczące roli metalotioneiny w wiązaniu kadmu w narządach zwierząt zostały potwierdzone w wielu pracowniach (26, 39, 45, 50, 51). Jeżeli dawka kadmu nie była zbyt wysoka, metal ten znajdowano w wątrobie i nerkach wyłącznie w postaci kompleksu z metalotioneiną (44, 47, 52). Dopiero przy bardzo wysokim poziomie kadmu w wątrobie (200 µg Cd/g tkanki) stwierdzono wiązanie go przez białka o wyższej masie cząsteczkowej (26). W jądrach szczurów takie kompleksy występują dopiero w przypadku martwicy tego narządu. Występowanie kadmu w innych formach, niż w postaci kompleksu z metalotioneiną wykazano także w narządach ludzi, zwłaszcza starszych wiekiem (autopsja) (53). Białka te nie zostały bliżej scharakteryzowane.

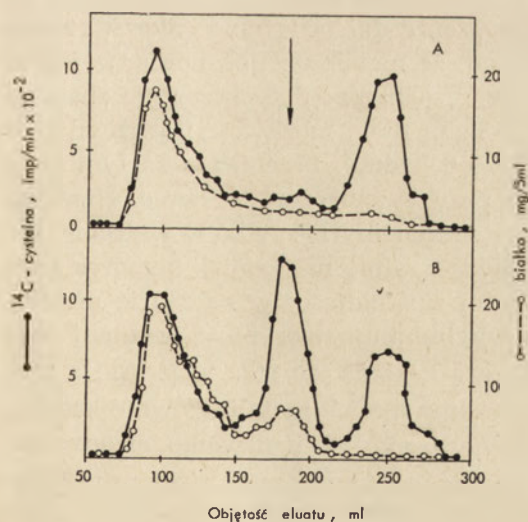
W narządach szczurów, którym podawano związki kadmu, wzrost poziomu metalotioneiny zachodził szybciej w wątrobie niż w nerce (44, 52). Podwyższenie poziomu metalotioneiny w wątrobie było równoległe do wzrostu ilości kadmu (Ryc. 3).

Podawanie kadmu powoduje w wątrobie zwierząt wyraźny wzrost inkorporacji ^{14}C -cysteiny (lub cystyny) *in vivo* do frakcji metalotioneiny (52, 54, 55). Może to przemawiać za stymulowaniem przez kadm procesu biosyntezy metalotioneiny (Ryc. 4).

Zjawisko to wykorzystuje się do otrzymywania metalotioneiny zarówno do identyfikacji jak i prac badawczych (12, 15, 20, 24, 26, 50, 56). Zdania różnych autorów na temat mechanizmu biosyntezy są podzielone.



Ryc. 3. Zależność poziomu kadmu i metalotioneiny w wątrobie szczura od czasu podawania kadmu (44).



Ryc. 4. Rozdział chromatograficzny (Sephadex G-75) homogenatu wątroby szczura po podaniu ^{14}C -cysteiny.

A — grupa kontrolna, B — grupa otrzymująca kadm. Strzałką zaznaczono szczyt metalotioneiny (52).

Efekt stymulacji biosyntezy metalotioneiny wywołany podawaniem kadmu ulega zniesieniu pod wpływem inhibitorów biosyntezy białka; akty-nomycyny D i cykloheksaimidu (17, 39, 57, 58).

IV-2. Rtęć

W preparatach metalotioneiny, uzyskanych z nerek ludzi leczonych diuretykami rtęciowymi wykazano obecność rtęci (5). Stwierdzono także, że rtęć nieorganiczna podawana szczurom w dawkach subtoksycznych i toksycznych, wiąże się w nerkach i wątrobie głównie w postaci kompleksu z metalotioneiną (9, 10, 19). Kompleksy rtęci o cechach metalotioneiny znajdowano także w moczu (9) i mózgu (37) szczurów narażonych na działanie rtęci nieorganicznej.

Szczególnie dużą wydajność wiązania rtęci z metalotioneiną stwierdzono w nerkach (a nie w wątrobie) szczurów którym podawano wielokrotnie chlorek rtęci (52, 59). Fakt wiązania przez metalotioneinę rtęci nieorganicznej potwierdzono w innych pracowniach (56, 60, 61), jednakże obserwowana wydajność tego procesu była znacznie niższa. Może się to wiązać z różnicami w poziomie fizjologicznym metalotioneiny w narządach szczurów pochodzących z różnych pracowni (patrz rozdz. III). Ilość rtęci, która może być związana w nerce po dostaniu się do ustroju jednorazowej dawki tego metalu jest zależna od poziomu metalotioneiny (62). W nerkach zwierząt, którym przez dłuższy okres czasu podawano chlorek rtęciowy (41, 52, 59) lub które poddawano działaniu par rtęci metalicznej (37), obserwowano podwyższenie poziomów metalotioneiny. Podobnie jak w przypadku kadmu, wzrost poziomu metalotioneiny w nerkach szczurów zachodzi równolegle do wzrostu poziomu rtęci, po czym ulega stabilizacji (44). Białko o cechach metalotioneiny uzyskano także w skali preparatywnej z nerek królików, którym przez szereg dni podawano chlorek rtęciowy (14). Obecnie akceptuje się pogląd, że metalotioneina powstaje i gromadzi się w nerce pod wpływem rtęci, jednakże dotychczas nie zbadano mechanizmu tego procesu. Rozważane są dwie możliwości: (a) Rtęć wywiera wpływ indukcyjny niezależny od kadmu. Przemawia za tym podwyższenie poziomu metalotioneiny prawie wyłącznie w nerce. Hipoteza ta zakłada możliwość biosyntezy metalotioneiny nie tylko w wątrobie, ale i w nerce, co wykazano ostatnio doświadczalnie na hodowli komórek nerkowych (63). (b) Rtęć wypiera kadm z istniejącej w narządzie metalotioneiny, a uwolniony jon kadmowy indukuje biosyntezę kolejnej cząsteczki metalotioneiny. Druga hipoteza zakłada, że rtęć wiąże się z metalotioneiną wyłącznie przez podstawienie innych metali (głównie kadmu) w natywnej cząsteczce białka. Stwierdzono, że podawanie zwierzętom kadmu zwiększa zdolność narządów do zatrzymywania rtęci proporcjonalnie do wzrostu poziomu metalotioneiny (56). Ponadto, wykazano ostat-

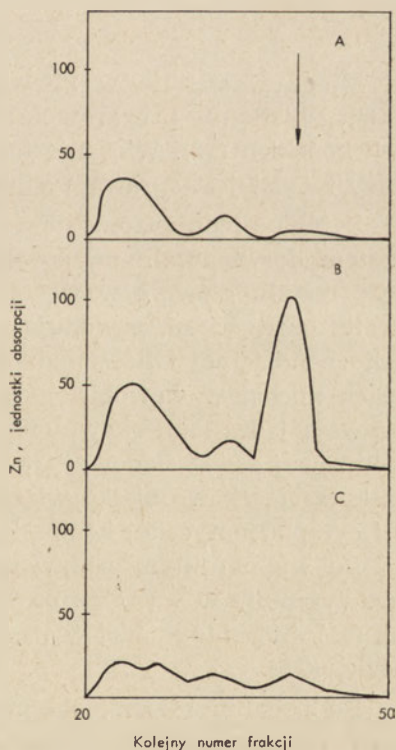
nio obecność w wątrobie metalotioneiny, której powstawanie indukowano podawaniem rtęci (17).

Organiczne związki rtęci były badane ze względu na ich znaczenie w toksykologii środowiskowej. Stwierdzono, że metalotioneina wiąże rtęć dostającą się do ustroju w postaci octanu fenylortęciowego (11, 61). Dynamika tego wiązania wykazywała jednakże, że i w tym przypadku metalotioneina wiązała rtęć nieorganiczną, powstającą w wyniku stosunkowo szybkiej degradacji wiązania fenyl-Hg *in vivo*. Związki metylortęciowe wykazują znaczną trwałość *in vivo*, a *in vitro* mają znikomo małe powinowactwo do metalotioneiny (64). Jest więc mało prawdopodobne, aby metalotioneina wiązała rtęć dostającą się do ustroju w postaci związków metylortęciowych.

IV-3. Cynk

Wiązanie egzogenego cynku przez metalotioneinę w wątrobie i nerkach ssaków zaobserwowano w kilku pracowniach (17, 40, 45, 50, 65).

Możliwość indukcji biosyntezy metalotioneiny cynkiem stwierdzono w sposób pośredni (66). Wykazano, że podanie szczurom cynku 24 godziny przed toksyczną dawką kadmu daje efekt ochronny, zmniejszając usz-



Ryc. 5. Rozdział chromatograficzny (Sephadex G- 75) frakcji rozpuszczalnej komórek wątroby szczura.

A — grupa kontrolna, B — po jednorazowej dawce cynku, C — po iniekcji cynku i aktynowiny D. Strzałką zaznaczono szczyt metalotioneiny (65).

kodzenie jąder wywoływane kadmem. Badania wskazywały na przyspieszenie wiązania kadmu przez metalotioneinę w wątrobie zwierząt, które uprzednio otrzymały dawkę cynku. Wykazano także, że wielokrotne podawanie cynku podwyższa poziom metalotioneiny głównie w wątrobie, przy czym nagromadzanie metalotioneiny zachodziło równolegle do wzrostu poziomu cynku (40, 41). Po podaniu cynku obserwowano także wzmożoną inkorporację znakowanych aminokwasów do frakcji metalotioneiny (55, 67, 68). Stosując aktynomycynę D i cykloheksaimid jako inhibitory stwierdzano, że proces biosyntezy białka stymulowany cynkiem może być zahamowany podaniem aktynomycyny D lub cykloheksaimidu (27, 65). Stymulacja ezogennym cynkiem wymaga jednak znacznie wyższych dawek mealu, niż w przypadku kadmu lub rtęci. Jest to prawdopodobnie związane z niską wydajnością deponowania cynku w wątrobie i nerce; z jednorazowej dawki cynku w narządach tych pozostaje około 20%; z tej ilości w wątrobie znajduje się nie więcej niż 30—40% cynku w postaci kompleksu z metalotioneiną (40). Podawanie aktynomycyny D, która hamuje biosyntezę metalotioneiny w stopniu wyższym niż innych białek wątroby (58), znacznie zmniejsza wydajność tego procesu. Podany parenteralnie cynk pozostaje w osoczu krwi, a równocześnie nie stwierdza się obecności kompleksu Zn-tioneina w tkankach (65) (Ryc. 5).

IV-4. Miedź

Miedź występuje w niewielkiej ilości, około 0,1—0,2 gramoatomu/6 000g białka, w preparatach metalotioneiny uzyskanych z wątroby i nerek końskich (13). Wiązanie tego metalu z tioneiną przy zwiększonej podaży miedzi jest sprawą dyskusyjną.

Zarówno jednorazowa dawka jak i przewlekłe podawanie miedzi zwierzętom doświadczalnym, powoduje wielokrotne podwyższenie poziomów tego metalu głównie w wątrobie. Niskie dawki miedzi podawane przez krótki okres czasu, powodują wzrost stężenia metalu głównie we frakcji mitochondrialnej i lizosomalnej komórek wątroby. Przy wysokich stężeniach miedzi w wątrobie, główną rolę w deponowaniu tego metalu odgrywają jądra komórkowe (69—72). Jednakże zarówno w przypadku jednorazowej dawki śladowej (73, 74), jak i powtarzanych dawek miedzi (75), niskocząsteczkowe białko wiążące miedź egzogenną znajdowano we frakcji cytoplazmatycznej komórek wątroby.

Po wielokrotnym podawaniu chlorku miedzi szczurom, stwierdzono podwyższenie w wątrobie poziomu białka oznaczanego jako metalotioneina (41). Stężenie miedzi w wątrobie rosło wraz ze wzrostem stężenia tego białka (76).

Po podaniu miedzi, obserwowano wzmożoną inkorporację znakowanych aminokwasów do niskocząsteczkowego białka o cechach metalotio-

neiny (55), które znajdowano w cytoplazmie komórek wątroby. Białko to nie powstaje w przypadku równoczesnego podawania cykloheksomidu lub aktynomycyny D (74).

Opublikowane ostatnio badania nad cytoplazmatycznym białkiem, występującym w wątrobie szczurów (po parenteralnym podawaniu związków miedzi) wykazały, że nie jest ono identyczne z metalotioneiną (77, 78, 79, 80) i nazwano je miedziochelatyną (Copper-chelatin; przez analogię do metalotioneiny, kadmotioneiny itp. — proponujemy więc tłumaczenie nazwy — miedziochelatyna). Białko to różni się od metalotioneiny masą cząsteczkową (około 8 000), ruchliwością elektroforetyczną i składem aminokwasowym. Według różnych autorów miedziochelatyna zawiera o połowę (77) lub czterokrotnie (80) mniej cysteiny, niż metalotioneina. Pasma absorpcyjne chelatyny znajduje się w pobliżu 250nm, podobnie jak metalotioneiny. Biosynteza miedziochelatyny w cytoplazmie komórek wątroby zachodzi pod wpływem miedzi (77, 78, 79).

Wykonano doświadczenie, w którym podawano szczurom kolejno kadm, aktynomycynę D oraz miedź. W tych warunkach indukcji ulegała biosynteza metalotioneiny, a zahamowaniu biosynteza miedziochelatyny; podana miedź wiązała się w wątrobie z frakcją metalotioneinową (77). Wydaje się prawdopodobne, że w wiązaniu miedzi w cytoplazmie komórek wątroby, mogą brać udział zarówno metalotioneina jak i miedziochelatyna. Dotychczas nie wiadomo w jakiej formie miedź wiązana jest w mitochondriach lub lizosomach. Nie można wykluczyć, że w procesie wiązania biorą udział obydwa lub jedno z tych białek.

Można przypuszczać, że kompleks miedzi z metalotioneiną jest mniej trwały, niż kompleksy metalotioneiny z kadmem, rtęcią lub cynkiem. Wykazano, że rtęć a także kadm i cynk wypierają miedź z połączenia z metalotioneiną *in vitro* (21). Nietrwałość kompleksu miedzi z niskocząsteczkowym białkiem, występującym we frakcji rozpuszczalnej niektórych narządów, wykazano także w badaniach *in vivo* po jednorazowej śladowej dawce $^{67}\text{CuCl}_2$ (73, 81). Nie jest jednak jasne, czy informacja ta odnosi się do metalotioneiny czy miedziochelatyny.

IV-5. Inne pierwiastki

Dotychczas opublikowane dane wskazują na to, że niewiele pierwiastków ma właściwości indukujące biosyntezę metalotioneiny. Badając to zagadnienie, szczurom podawano wielokrotnie subtoksyczne dawki związków następujących pierwiastków: Be, Mg, Pb, As, Se, Cr, Ni, Mn, V, Sb, U, Tl, Rb, Cs (41, 82, 83). Wyniki badań wykluczają możliwość indukowania biosyntezy metalotioneiny tymi pierwiastkami zarówno w wątrobie jak i w nerce. Wykazano natomiast, że niewielkie działanie stymulujące biosyntezę metalotioneiny ma kobalt, podawany w bardzo wysokich

dawkach. Silne działanie stymulujące ma bizmut (82); kompleks bizmutu z białkiem o masie cząsteczkowej odpowiadającej metalotioneinie zlokalizowany jest we frakcji rozpuszczalnej komórek nerki szczura (84). Opublikowane ostatnio doniesienia wskazują na to, że zdolność indukowania biosyntezy ma również srebro (17, 83).

Z dotychczasowych danych wynika, że wszystkie metale indukujące biosyntezę metalotioneiny (Cd, Zn, Hg, Bi, Co) mają zdolność do wiązania się z tym białkiem *in vivo*. Istnieje natomiast możliwość, że metale nie mające zdolności indukcyjnych mogą być również wiązane przez metalotioneinę. Przykładem tego zjawiska jest ołów. Obserwowano sporadyczne wiązanie tego metalu przez frakcję odpowiadającą metalotioneinie, przy czym zawartość ołowiu w tej frakcji była wyższa w narządach szczurów, którym uprzednio podano chlorek kadmu (85).

V. Rola metalotioneiny w zatruciach metalami ciężkimi.

Po doświadczalnym podawaniu kadmu i rtęci, względnie w zatruciu ostrym tymi metalami (37, 46, 49, 51) obecność kompleksów białkowych o ciężarze cząsteczkowym rzędu 10 000 stwierdzano nie tylko w wątrobie i nerce, ale i w innych tkankach, między innymi we krwi, mózgu i jądrach. Należy przepuszczać, że są to kompleksy tych metali z tioneiną. Nie wyjaśniono jednakże, czy wiązanie metalu następuje z metalotioneiną syntetyzowaną w danej tkance, czy też kompleks metal-tioneina utworzony w wątrobie lub nerce jest następnie transportowany do innych narządów.

Piscator (4) pierwszy postulował ochronną rolę metalotioneiny przed działaniem kadmu, a Pulido i wsp. (5) przed działaniem rtęci. Od czasu tych pierwszych sugestii nagromadzono więcej informacji, jednakże nie pozwalają one na jednoznaczną ocenę roli metalotioneiny w przebiegu zatruc metalami ciężkimi.

Metalotioneina ma prawdopodobnie znaczenie ochronne w przypadku zatruc rtęcią nieorganiczną. Istniejące dane pozwalają sądzić, że efekty uszkodzenia nerek są wynikiem wpływu wysokich dawek rtęci przewyższających zdolność wiązania metalotioneiny występującej w narządzie (59, 62). Kompleks rtęci z metalotioneiną ma dość dużą trwałość i prawdopodobnie jest mało toksyczny. Natomiast podawanie zwierzętom metalotioneiny egzogennej, nie zmniejsza ostrej toksyczności rtęci (59). Dotychczas nie zaobserwowano jakichkolwiek ujemnych biologicznie skutków wiązania rtęci przez metalotioneinę.

Metalotioneina wykazuje działanie ochronne również w pierwszej fazie ostrego zatrucia kadmem. Wiązanie kadmu przez metalotioneinę jest szczególnie wydajne i zapobiega interakcji z grupami SH białek biologicznie czynnych. Wykazano to na przykładzie inhibicji dehydrogenazy okso-

glutaranowej i oksydazy bursztynianowej wątroby (43). Stwierdzono także, że 1-hydroksylacja 25-hydroksycholekalciferołu, która jest hamowana w obecności kadmu, przebiega normalnie lub z częściowym zahamowaniem w przypadku gdy kadm wchłonięty do ustroju, występuje w tkance w postaci kompleksu z metalotioneiną (29, 30).

Metalotioneina zmniejsza toksyczny wpływ kadmu na jądra, poprzez wiązanie tego metalu w wątrobie. Kadm podany w dawce toksycznej, ale w postaci kompleksu z metalotioneiną, nie uszkadza jąder (49), jednakże toksyczny wpływ na nerkę kompleksu Cd-tioneina jest większy niż chloru kadmu (86). W tym aspekcie interesujące jest, że zmianom martwiczym w jądrach można przeciwdziałać zarówno przez uprzednie podawanie zwierzętom cynku (66, 87), jak też małej dawki kadmu, poprzedzającej dawkę toksyczną (49).

Wpływ metalotioneiny na przebieg i skutki przewlekłego zatrucia kadmem nie jest jednoznaczny. W zatruciu przewlekłym narządem krytycznym jest nerka (a nie jądra jak w zatruciu ostrym). Istniejące informacje pozwalają przypuszczać, że kompleks Cd-tioneina może być wydalany w moczu (88). W przypadku gdy poziom kadmu w nerce osiąga wysoką wartość (rzędu 200 µg Cd/g tkanki), wydalaniu kadmo-tioneiny towarzyszy uszkodzenie nerek, podobnie jak w przypadku podania egzogennej kadmo-tioneiny (86). Nagromadzanie się w wątrobie i nerkach zwierząt i ludzi dużych ilości kadmu, na skutek wchłaniania ze środowiska, może stwarzać pewne niebezpieczeństwo: po osiągnięciu krytycznego poziomu kompleks Cd-tioneina może się uwalniać z komórek narządów i wywierać działanie toksyczne bezpośrednio lub po degradacji apoproteiny. Ta ostatnia możliwość nasuwa się w związku z krótkim okresem półtrwania metalotioneiny obecnej w narządach (4—5 dni) (55).

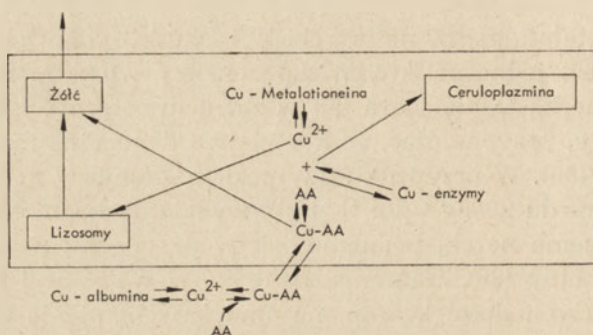
VI. Rola metalotioneiny w gospodarce cynkiem i miedzią.

Biologiczna rola metalotioneiny prawdopodobnie nie ogranicza się do jej funkcji detoksykacyjnych. Można przypuszczać, że jej pierwotną funkcją biologiczną jest udział w metabolizmie metali, a szczególnie cynku i miedzi, koniecznych dla przemian zachodzących w ustroju.

Wydaje się, że cynk jest niezbędny w procesach biosyntezy i prawidłowego funkcjonowania metalotioneiny. Przemawia za tym fakt, że jest on stałym składnikiem metalotioneiny i występuje zarówno w tioneinie powstającej w wyniku podawania tego metalu, jak i w Cd-, Hg-, Ag-tioneinie (17). Uważa się, że cynk może stanowić czynnik stabilizujący w stosunku do tego białka, podobnie jak i do wielu innych makrocząsteczek (27).

Ostatnio zaproponowano wyjaśnienie mechanizmu regulacji poziomu

cynku w ustroju. W mechanizmie tym centralną rolę może odgrywać metalotioneina (65). Zgodnie z tą hipotezą, wysoki poziom cynku w osoczu krwi stymuluje biosyntezę metalotioneiny w wątrobie oraz w ścianie jelita. Wzrost poziomu metalotioneiny w wątrobie powoduje związanie w tym narządzie nadmiaru cynku krążącego we krwi. Uwalnianie cynku z kompleksu z metalotioneiną w wątrobie następuje odpowiednio do zapotrzebowania ustroju. Wzmoczona biosynteza metalotioneiny w nabłonku jelita, powoduje związanie nadmiaru cynku i przeciwdziała jego wchłonięciu do krwioobiegu. Cynk zgromadzony w nabłonku jelit ulega usunięciu w trakcie złuszczenia nabłonka. Hipoteza ta jest interesująca z uwagi na jej prostotę, jednakże zbudowana została na podstawie fragmentarycznych obserwacji i wymaga dalszych dowodów doświadczalnych.



Ryc. 6. Schemat metabolizmu miedzi w komórkach wątroby w warunkach fizjologicznych (89).

AA — aminokwasy.

W ostatnich latach równolegle z nagromadzeniem się informacji o metalotioneinie z jednej strony i o metalbolizmie miedzi z drugiej, powstał pogląd zgodnie z którym metalotioneina odgrywała centralną rolę w metalbolizmie miedzi, podobnie jak to postulowano dla cynku. Rycina 6 przedstawia schemat mechanizmu regulacji gospodarki miedzią (89). Schemat ten pozwala na wytłumaczenie wielu oderwanych faktów, które zostaną omówione niżej.

Jednak najnowsze oraz wcześniejsze mało rozpowszechnione dane wskazują na to, że jednoznaczność tego schematu jest wątpliwa. Nie jest pewne w jakich przypadkach w wiązaniu miedzi bierze udział metalotioneina. Zagadnienie to można rozpatrywać w czterech aspektach: występowanie niskocząsteczkowego białka a) w wątrobie ludzi z objawami choroby Wilsona, b) w wątrobie noworodków; wiązania miedzi: c) w warunkach fizjologicznych, d) po narażeniu na miedź (patrz rozdz. V-4).

Choroba Wilsona (zwyrodnienie soczewkowate wątroby) znana jest od początku naszego stulecia, jednak patogeneza jej do dziś nie została wyjaśniona. Przypuszcza się, że choroba ta jest dziedziczna. Objawy choroby podobne są do tych, jakie występują przy marskości wątroby, ale

związane są z zachwianiem równowagi przemian miedzi w organizmie: następuje wielokrotne podwyższenie poziomu miedzi w wątrobie do 100 a nawet 270 $\mu\text{g/g}$ tkanki (90), zahamowaniu natomiast ulega inkorporacja miedzi do ceruloplazminy i obniża się wydalanie z żółcią.

Równolegle z pierwszymi pracami nad metalotioneiną (2, 3), z patologicznej wątroby ludzi wyodrębniono białko o zawartości miedzi około 3%, wysokiej zawartości grup SH i niskiej masie cząsteczkowej około 10 000 (91). Skład aminokwasowy białka jest zbliżony do składu miedziochelatyny (92). Podobne białko, wyizolowane przez tych samych autorów z fizjologicznej wątroby ludzkiej zawierało tylko 0,1—0,3% Cu, co odpowiada późniejszym danym uzyskanym dla metalotioneiny izolowanej z wątroby ludzkiej (28). Wykazano także, że jakkolwiek zdolność do wiązania miedzi *in vitro* przez białka wyizolowane z wątroby patologicznej i fizjologicznej jest taka sama 7,9 gramoatomu/mol, to stała kompleksowania białka występującego w wątrobie patologicznej jest około czterokrotnie wyższa (93). Obecnie wydaje się prawdopodobne, że autorzy ci porównywali właściwości metalotioneiny z właściwościami miedziochelatyny. Jeżeli to przypuszczenie jest słuszne, chorobę Wilson'a można by wiązać nie tylko z niedoborem ceruloplazminy, ale i z nadmierną biosyntezą miedziochelatyny. Należy dodać, że omawiane białko występuje w cytoplazmie komórek wątroby (89).

W roku 1964 stwierdzono występowanie w wątrobie noworodków niezwykle wysokich poziomów miedzi, która zlokalizowana była głównie we frakcji mitochondrialnej (94). Później wykazano wysoką zawartość białek o cechach metalotioneiny w wątrobie płodów i noworodków szczurzych (37, 42). Białko wiążące miedź, występujące w wątrobie noworodków (ciełeta), lokalizowano początkowo we frakcji mitochondrialnej i nazwano mitochondrokupreiną (95). W późniejszych badaniach wykazano, że znajduje się ono we frakcji ciężkich lizosomów i zidentyfikowano je jako metalotioneinę bogatą w miedź (96). W białku tym o masie cząsteczkowej 7 000 wykazano zawartość cysteiny ponad 35% i zawartość miedzi około 4%. Skład aminokwasowy tego białka był zbliżony do składu metalotioneiny wyizolowanej z wątroby koni i ludzi (13, 28). Reszty cysteinylowe w tym białku mogą prawdopodobnie występować zarówno w postaci wolnej jak i w postaci dwusiarczków, co wykazano *in vitro* badając energię wiązań metodą fotoelektronowej spektroskopii rentgenowskiej (97).

Wydaje się, że metalotioneina może pełnić funkcję magazynowania miedzi w wątrobie noworodków. W tym przypadku rola jej kończy się prawdopodobnie w momencie wytworzenia przez organizm pełnej zdolności do biosyntezy ceruloplazminy (90). Wydaje się, że metalotioneina może być czynnikiem wiążącym miedź w mitochondriach (71) lub lizosomach (72, 98) niezależnie od miedziochelatyny wiążącej miedź w cytoplazmie.

Najnowsze badania wskazują na to, że w wątrobie białkami odpowiedzialnymi zarówno za metabolizm jak i za wiązanie miedzi dostającej się do ustroju w dawce toksycznej, mogą być dwa białka o zbliżonych właściwościach i spełniające podobne funkcje.

Artykuł nadszedł 29.9.1975, po rewizji autorskiej otrzymano 20.3.1976.

PIŚMIENNICTWO

1. Margoshes M., Vallee B. L., (1957), *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4813—4814.
2. Kägi J. H. R., Vallee B. L., (1960), *J. Biol. Chem.* **235**, 3460—3465.
3. Kägi J. H. R., Vallee B. L., (1961), *J. Biol. Chem.* **236**, 2435—2442.
4. Piscator M., (1964), *Nord. Hyg. Tidskr.* **45**, 76—82.
5. Pulido P., Kägi J. H. R., Vallee B. L., (1966), *Biochemistry* **5**, 1768—1777.
6. Friberg L., Piscator M., Nordberg G. F., (1971), Cadmium in the environment. Chemical Rubber Co, Cleveland.
7. Skerfving S., Vostal J., (1972), w *Mercury in the Environment*, red. Friberg L., Vostal J., Chemical Rubber Co, Cleveland, str. 93—107.
8. Piscator M., Lind D., (1972), *Arch. Environ. Health* **24**, 246—250.
9. Jakubowski M., Piotrowski J., Trojanowska B., (1970), *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **16**, 743—763.
10. Wiśniewska J. M., Trojanowska B., Piotrowski J., Jakubowski M., (1970), *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **16**, 754—763.
11. Piotrowski J. K., Bolanowska W., (1970), *Med. Pracy* **21**, 338—348.
12. Nordberg G. F., Nordberg M., Piscator M., Vesterberg O., (1972), *Bioch. J.* **126**, 491—498.
13. Kägi J. H. R., Himmelhoch S. W., Whanger P. D., Bethune J. L., Vallee B. L., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 3537—3542.
14. Nordberg M., Trojanowska B., Nordberg G. F., (1974), *Environ. Physiol. Biochem.* **4**, 149—158.
15. Shaikh J. A., Lucis C. J., (1971), *Experientia* **27**, 1024—1025.
16. Cherian M. G., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 920—926.
17. Winge D. R., Premakumar R., Rajagopalan K. V., (1975), w *Arch. Biochem. Biophys.* **170**, 242—252.
18. Żelazowski A., Piotrowski J. K., Mogilnicka E. M., Szymańska J., Kaszper W. (w druku).
19. Wiśniewska-Knypl J. M., Trojanowska B., Piotrowski J. K., Jabłońska J. K., (1972), *Acta Biochim. Polon.* **19**, 11—18.
20. Piotrowski J. K., Balcerska I., (1974), IV Sympozjum Toksykologiczne PT Farmakol., Poznań (streszczenia referatów).
21. Evans G. W., Majors P. F., Cornatzer W. E., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1142—1148.
22. Nordberg G. F., Piscator M., Lind B., (1971), *Acta Pharmacol. Toxicol.* **29**, 456—470.
23. Piotrowski J. K., Trojanowska B., Wiśniewska-Knypl J. M., Bolanowska W., (1973), w *Mercury, Mercurials and Mercaptans*, red. M. W. Miller, T. W. Clarkson, C. C. Thomas Publisher, Springfield JU. str. 247—260.
24. Weser K., Donay F. i Rupp H., (1973), *FEBS Letters* **32**, 171—174.
25. Kägi J. H. R., (1970), *Abstr. Int. Congr. Biochem.* 8th, IUB, str. 130.
26. Winge D., Rajagopalan K. V., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.* **153**, 755—762.
27. Bremner J., Davies N. T., (1975), *Biochem. J.* **149**, 733—738.

28. Bühler R. H. O., Kägi J. H. R., (1974), *FEBS Letters* **39**, 229—234.
29. Suda T., Horiuchi N., Ogata E., Ezawa I., Otaki N., Kimura M., (1974), *FEBS Letters* **42**, 23—26.
30. Kimura M., Otaki N., Yoshiki S., Suzuki M., Horiuchi N., Suda T., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.* **165**, 340—348.
31. Ellman G. L., (1958), *Arch. Biochem. Biophys.* **74**, 443—450.
32. Ellman G. L., (1959), *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70—77.
33. Bitny-Szlachto S., (1972), *Acta Polon. Pharm.* **29**, 439—446.
34. Benesch R. R., Lardy H. A., Benesch R., (1955), *J. Biol. Chem.* **216**, 663—670.
35. Sokolovski G., Pilz W., Weser U., (1974), *FEBS Letters* **48**, 222—225.
36. Piotrowski J. K., Bolanowska W., Sapota A., (1973), *Acta Bioch. Polon.* **20**, 207—215.
37. Sapota A., Piotrowski J. K., Barański B., (1974), *Med. Pracy* **25**, 129—135.
38. Żelazowski A., Piotrowski J. K., (w druku).
39. Webb M., (1972), *Biochem. Pharmacol.* **21**, 2751—2765.
40. Trojanowska B., Piotrowski J. K., (1974), *Bromat. Chem. Toksykol.* **7**, 137—142.
41. Mogilnicka E. M., Piotrowski J. K., Trojanowska B., (1975), *Med. Pracy* **26**, 147—155.
42. Kaszper W., Piotrowski J. K., Marciniak W., (w druku).
43. Wiśniewska-Knypl J. M., Jabłońska J., (1970), *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol. cl. II*, **18**, 321—327.
44. Piotrowski J. K., Trojanowska B., Sapota A., (1974), *Arch. Toxicol.* **32**, 351—360.
45. Shaikh Z. A., Lucis O. J., (1972), *Arch. Environ. Health* **24**, 419—425.
46. Wiśniewska-Knypl J. M., Jabłońska J., Myślak Z., (1973), *Arch. Toxicol.* **28**, 46—50.
47. Piscator M., (1966), *Arch. Environ. Health* **12**, 335—344.
48. Nordberg G. F., Piscator M., Nordberg M., (1971), *Acta Pharmacol. (kbh)* **30**, 289—295.
49. Nordberg G. F., (1971), *Environ. Physiol.* **1**, 171—187.
50. Shaikh Z. A., Lucis O. J., (1972), *Arch. Environ. Health* **24**, 410—418.
51. Chen R. W., Wagner P. A., Hoekstra W. G., Ganther H. E., (1974), *J. Reprod. Fert.* **38**, 293—306.
52. Piotrowski J. K., Trojanowska B., Wiśniewska-Knypl J. M., Bolanowska W., (1974), *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **27**, 11—19.
53. Syversen T. L. M., (1975), *Archiv. Environ. Health* **30**, 158—161.
54. Shaikh Z. A., Lucis O. J., (1970), *Fed. Proc.* **29**, 298 (streszczenie).
55. Chen R. W., Whanger P. A., Weswig P. H., (1975), *Biochem. Med.* **12**, 95—105.
56. Shaikh Z. A., Coleman R. L., Lucis O. J., (1973), Trace Substances in Environmental Health (VII). Proceedings 7th Annual Conference on Trace Substances in Environmental Health, University of Missouri.
57. Wiśniewska-Knypl J., (1975), II Zjazd Tow. Med. Pracy (streszczenia referatów).
58. Squibb K. S., Cousins R. J., (1974), *Environ. Physiol. Biochem.* **4**, 24—30.
59. Piotrowski J. K., (1971), w Proceedings of the Special foreign Currency Program Symposium, Dubrovnik, str. 93—136.
60. Ellis R. W., Fang S. C., (1971), *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **20**, 14—21.

61. Fang S. C., (1973), w Mercury, Mercurials and Mercaptans, Ch. C. Thomas, Publisher, Springfield, USA, str. 277—293.
62. Piotrowski J., Bolanowska W., Trojanowska B., Szendziowski S., (1969), *Med. Pracy* **20**, 589—599.
63. Webb M., Daniel M., (1975), *Chem. Biol. Interactions* **10**, 269—276.
64. Chen R. W., Ganther H. E., Hoekstra W. G., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 383—390.
65. Richards M., Cousins R. J., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**, 1215—1223.
66. Webb M., (1972), *Biochem. Pharmacol.* **21**, 2767—2771.
67. Bremner L., Davies N. T., Mills C. F., (1973), *Biochem. Soc. Trans.* **1**, 982—985.
68. Davies N. T., Bremner I., Mills C. F., (1973), *Biochem. Soc. Trans.* **1**, 985—988.
69. Evans G. F., Myron D. R., Cornatzer N. F., Cornatzer W. E., (1970), *Am. J. Physiol.* **218**, 298—300.
70. Gregoriadis G., Sourkes T. L., (1967), *Can. J. Biochem.* **45**, 1841—1851.
71. Lal S., Sourkes T. L., (1971), *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **18**, 562—572.
72. Feldman G., Abramowitz C., Sermini H., Rousselet M., (1972), *Biol. Gastrocentrol.* **5**, 37—45.
73. Terao T., Owen Ch. A., (1973), *Am. J. Physiol.* **224**, 682—686.
74. Bremner I., Davies N. T., (1974), *Biochem. Soc. Trans.* **2**, 425—427.
75. Bloomer L. C., Sourkes T. L., (1973), *Biochem. Med.* **8**, 78—91.
76. Mogilnicka E. M. (dane nie publikowane).
77. Winge D. R., Premakumar R., Wiley R. D., Rajagopalan K. V., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.* **170**, 253—266.
78. Premakumar R., Winge D. R., Wiley R. D., Rajagopalan K. V., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.* **170**, 267—277.
79. Premakumar R., Winge D. R., Wiley R. D., Rajagopalan K. V., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.* **170**, 278—288.
80. Riordan J. R., Gower I., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 678—686.
81. Terao T., Owen Ch. A., (1974), *Mayo Clinic Proc.* **49**, 376—381.
82. Piotrowski J. K., Szymańska J., (1976), *J. Toxicol. Environ. Health* (w druku).
83. Mogilnicka E. M., Piotrowski J. K., Tomaszewski A., *Bromat. Chem. Toksykol.*, **9**, 357—360.
84. Szymańska J., Mogilnicka E. M., Kaszper W., *Biochem. Pharmacol.* (w druku).
85. Bolanowska W., Sapota A., (1975), *Bromat. Chem. Toksykol.* **8**, 91—98.
86. Nordberg G. F., Goyer R., Nordberg M., (1975), *Arch. Pathol.* **99**, 192—197.
87. Parizek J., (1975), *J. Endocrin.* **15**, 56—60.
88. Nordberg G. F., Piscator M., (1972), *Environ. Physiol. Biochem.* **2**, 37—49.
89. Evans G. W., (1973), *Physiol. Rev.* **53**, 535—570.
90. Mogilnicka E., Piotrowski J. K., (1972), *Med. Pracy* **23**, 499—509.
91. Shapiro J. R., Morell A. G., Schneiberg J. H., (1961), *J. Clin. Invest.* **40**, 1081.
92. Morell A. G., Shapiro J. R., Scheinberg J. H., (1961), w *Wilson's Disease; Some Current Concepts*. Blackwell, Oxford, str. 36. (cyt. za Riordan J. R., Gower J., (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 678—686 (80)).

93. Evans G. W., Dubois R. S., Hambidge A., (1973), *Science* **181**, 1175—1176.
94. Porter H., (1964), *Arch. Neurology* **11**, 341—349.
95. Porter H., (1971), *Biochem. Biophys. Acta* **229**, 143—154.
96. Porter H., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**, 661—668.
97. Rupp H., Weser U., (1974), *FEBS Letters* **44**, 293—297.
98. Linqvist R. R., (1967), *Amer. J. Pathol.* **51**, 471—478.

Uwaga P.T. Autorzy.

OD PIERWSZEGO ZESZYTU 23 TOMU „POSTĘPÓW BIOCHEMII” WPROWADZAMY ZWYCZAJ ROZPOCZYNANIA ARTYKUŁU OD RZECZOWEGO SPISU TREŚCI. SPIS WINIEN ZAPOWIADAĆ W SPOSÓB MERYTORYCZNY (NIE HASŁOWY) TREŚĆ ARTYKUŁU POCZNAJĄC OD WSTĘPU, POPRZECZ RZECZOWE TYTUŁY ROZDZIAŁÓW I PODROZDZIAŁÓW, PO WNIOSKI KOŃCOWE.

REDAKCJA

SPRAWOZDANIE

X Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS)

Paryż, 20—25 lipiec 1975

Organizatorem Zjazdu FEBS było Francuskie Towarzystwo Biochemiczne. Funkcje honorowych prezydentów Zjazdu pełnili Prof. J. Roche i Prof. R. Wurmser. Prezydentem Zjazdu był Prof. J. P. Ebel.

Podczas sesji otwarcia Zjazdu Prof. H. G. Wittmann z Berlina Zachodniego został udekorowany medalem im. Sir Hansa Krebsa po czym wygłosił ku Jego czci wykład na temat „Struktura i funkcja rybosomów”. Ze względu na niezwykle obszerną tematykę Zjazdu obrady odbywały się w ramach ośmiu sympozjów i czterech kolokwium. Nowością wprowadzoną na omawianym Zjeździe było przedstawienie wszystkich doniesień w formie plakatowej. Dla udostępnienia bezpośredniego kontaktu pomiędzy specjalistami zorganizowano liczne dyskusje okrągłego stołu.

Tematyka sympozjów:

1. Organizacja i realizacja genomu w komórkach eukariotycznych;
2. Biochemiczne mechanizmy różnicowania w komórkach prokariotycznych;
3. Organizacja i realizacja genomu wirusów;
4. Translacja genetyczna;
5. Enzymy;
6. Błony biologiczne;
7. Neurochemia;
8. Systemy transportujące elektrony.

Tematyka kolokwium:

1. Receptory hormonów i systemy przenoszące działanie hormonów;
2. Molekularna farmakologia i porównawcze mechanizmy działania substancji mutagennych, rakotwórczych i antyrakowych na DNA;
3. Grasica i pośredniki komórek T;
4. Molekularne aspekty ewolucji.

Podczas sesji zamknięcia Prof. L. L. M. Van Deenen z Utrechtu wygłosił obszerny przeglądowy wykład p.t. „Od błon jednowarstwowych do błon biologicznych”. W Zjeździe wzięło udział około 2800 uczestników. W skład delegacji polskiej wchodziło 39 osób.

Sympozjum 5 — Enzymy

W ramach tego sympozjum ogłoszono 12 referatów i przedstawiono 308 komunikatów (w formie plakatowej). Komunikaty podzielone były tematycznie na szereg sesji dotyczących nowych metod badania enzymów, ich budowy i mechanizmów

reakcji ze szczególnym uwzględnieniem układów wieloenzymatycznych. Spośród ogłoszonych referatów — cztery poświęcono zastosowaniu nowych metod w badaniach enzymologicznych, a mianowicie badaniom mechanizmów reakcji w bardzo niskich temperaturach z używaniem wodnoorganicznych mieszanin (referat wygłoszony przez P. Douzon, Francja), zastosowaniu jądrowego rezonansu magnetycznego na przykładzie interakcji trypsyna — inhibitor trypsyny (referat K. Wütrich, Zurych, Szwajcaria) i fosforylasy glikogenu (referat S. J. W. Busby i wsp., Oxford, Anglia). Czwartym z tej serii był referat S. Shaltiel, (Rehovot, Izrael) dotyczący zastosowania chromatografii hydrofobowej na Sepharose c_n-x (gdzie $x = H, NH_2, COOH$ itp. a n = ilość atomów węgla łańcucha węglowodorowego) do szybkiego i wydajnego oczyszczania białek enzymatycznych. Większość pozostałych doniesień była poświęcona zależności pomiędzy trzecio- i czwartorzędową strukturą i funkcją enzymów. (M. Goldberg, Paryż, Francja) na przykładzie kinazy pirogronianowej (B. Hess i wsp., Dortmund, RFN) i syntetazy kwasów tłuszczowych z drożdży. (E. Schweizer, Erlangen, RFN). Ten ostatni referat był kontynuacją ubiegłorocznego doniesienia. Autor wykazał na podstawie badań genetycznych (omawiany kompleks enzymatyczny u drożdży jest kodowany przez dwa różne loci), że prawidłowe funkcjonowanie enzymu zależy od zachowania właściwej budowy kompleksu zarówno pod względem ilościowym jak i jakościowym.

W sesji plakatowej około 15 doniesień dotyczyło problemu badania pierwszo- oraz drugo- i trzeciorzędowej struktury enzymów ze szczególnym uwzględnieniem metod spektrofлуometrycznych, dyfrakcji promieni X oraz magnetycznego rezonansu jądrowego. Ścisłe związana z poprzednim tematem była sesja poświęcona izolowaniu nowych enzymów wśród których wyróżniała się praca dotycząca izolacji reduktazy dwuhydrofolianowej z *Lactobacillus casei* opornego na Methotrexat z zastosowaniem chromatografii powinowactwa (L. J. Intyre i wsp., Cambridge, Anglia). T. Baranowski i wsp. (Wrocław, Polska) przedstawili pracę dotyczącą izolowania w postaci krystalicznej dwu typów kinazy pirogronianowej z mięśni ludzkich.

Nowe możliwości badawcze ukazywał komunikat H. Nilssona i K. Mosbacha, (Lund, Szwecja) omawiający elektrodę enzymatyczną sporządzoną w formie roztworu enzymów i kofaktorów ulokowanych w błonie celofanowej. Taka elektroda zawierająca dehydrogenazę glutaminianową i melczanową oraz NAD pozwala na mierzenie glutaminianu i pirogronianu w stężeniach 0,1—1,0mM. Metodą umożliwiającą preparatykę enzymów na dużą skalę jest zastosowanie enzymów sprzężonych z nośnikiem np. błoną kolagenową (J. M. Brillouet i wsp., Villeurbanne, Francja). Wiele doniesień poświęconych było badaniu mechanizmu działania centrum aktywnego enzymów metodami kinetycznymi i termodynamicznymi z zastosowaniem analogów substratowych oraz przez modyfikację centrum aktywnego przy użyciu odpowiednich substancji. Ożywioną dyskusję wzbudziło doniesienie R.A. John i wsp. (Rzym, Włochy), dotyczące nietypowej kinetyki reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę jablczanową i aminotransferazę asparaginianową. Autorzy sugerowali, że enzymy te działają w sposób sprzężony, tak że szczawiooctan nie zostaje uwalniany do środowiska w czasie reakcji, a jest bezpośrednio przenoszony na centrum aktywne drugiego enzymu. Liczne doniesienia były poświęcone współdziałaniu ligandów ze specyficznym białkiem np. utlenowaną hemoglobina lub cytochromem c. Interesujące również było doniesienie omawiające interakcję aminotransferazy asparaginianowej z inhibitorem dwufluoroszczawiooctanem (R. Eisinger, Bath, Anglia). Jedną z najbardziej interesujących była niewątpliwie sesja poświęcona kompleksom wieloenzymatycznym. Cztery doniesienia, w tym jedno z Polski (E. Wałajtys, A. B. Wojtczak, Warszawa) dotyczyły regulacji kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej przez fosforylację — defosforylację białka enzymatycznego pod wpływem różnych czynników w izolowanych mitochondriach wątroby szczura. Autorzy sugerują, że kwasy

łuszczowe działają na proces interkonwersji enzymu poprzez zmiany wewnątrzmitochondrialnego stosunku ATP/ADP oraz NADH/NAD i acetyloCoA/CoA (J. Batenburg, M. Olson, Tucson, USA). Podobny mechanizm regulacji poprzez fosforylację i defosforylację białka proponuje się dla kinazy pirogronianowej (E. Eigenbrodt, Gussen, RFN) oraz dla fosfofruktokinazy (I. A. Brand, M. D. Soling, Göttingen, RFN) przy czym dla tego ostatniego enzymu formą aktywną jest forma ufosforolowana.

W sesji poświęconej specyficznym systemom enzymatycznym omawianego regulację aktywności dehydrogenaz glutaminianowej i izocytrynianowej przez mitochondrialny potencjał utleniania—redukcji NAD i NADP (J. R. Williamson i wsp., Filadelfia, USA oraz C. M. Smith i wsp., Filadelfia, USA). Pośród pozostałych doniesień ciekawe było stwierdzenie powiązania heksokinazy z frakcją błon mitochondriów serca szczura, jak to uprzednio stwierdzono w mitochondriach mózgu (pracownia D. C. Gautheron, Villeurbanne, Francja).

Osobne sekcje omawiały regulację aktywności enzymów na poziomie biosyntezy *de novo*, oraz zmiany aktywności zachodzące podczas różnicowania i rozwoju. Badania odnerwianych mięśni szkieletowych szczura (V. S. Ilyin, Leningrad, ZSRR) pozwoliły na stwierdzenie, że impulsy nerwowe działają na syntezę enzymów (kontrolowaną przez genetyczny system jąder mięśni szkieletowych) na etapie transkrypcji. Badano również kontrolę aktywności enzymów metabolizujących glukozę w zsynchronizowanych hodowlach fibroblastów (M. Farnararo i wsp., Florencja, Włochy).

Symposium 4 — Molekularne interakcje w procesie genetycznej translacji

Symposium to obejmowało 9 referatów poświęconych takim zagadnieniom, jak: struktura i funkcja tRNA i syntetaz aminoacylo-tRNA, różne aspekty inicjacji i elongacji łańcucha polipeptydowego, modyfikacja niektórych komponent układu syntetyzującego białko, inhibitory translacji. Kluczowy problem biosyntezy jakim jest struktura i funkcja rybosomu nie wchodził w skład tematyki symposium. Zagadnienia te wyczerpująco omówił Wittmann (Berlin Zachodni) w referacie plenarnym wygłoszonym w dniu otwarcia Zjazdu.

W naszym, może subiektywnym, przekonaniu nie przedstawiono na Symposium 4 wyników badań zasługujących na miano ważnych odkryć naukowych, jakkolwiek wiele prezentowanych wyników wartych jest bliższego omówienia. Tak np. Marcker i inni (Århus) przedstawili szereg dowodów wskazujących na wyraźne różnice pomiędzy prokariotycznymi i eukariotycznymi układami syntetyzującymi białko. Należą do nich potranskrypcyjne modyfikacje eukariotycznych mRNA związane nie tylko z dołączaniem poliA do końca 3', ale również metylację końca 5' mRNA. Szczegółne różnice dotyczą procesu inicjacji biosyntezy białka. Badając organizmy wyższe wykazano obecność szeregu czynników inicjujących nie mających swoich odpowiedników w komórkach bakteryjnych. Funkcji poszczególnych czynników inicjujących u ssaków poświęcony był referat Stachelina i wsp. (Bazylea). Wyizolowano ogółem 6 czynników niezbędnych do utworzenia *in vitro* kompleksu inicjującego. Wykazano, że obok GTP również ATP jest niezbędny w tym procesie. Funkcja tego ostatniego jest związana z przyłączaniem mRNA do mniejszej podjednostki rybosomowej. Szereg badań zdaje się wskazywać na proces inicjacji syntezy białka u organizmów wyższych jako miejsce regulacji translacji. Bosch (Leiden) omówił w swoim referacie zagadnienie swoistej selekcji cistronów w procesie translacji fagowych RNA u *E. coli*. Przedstawiono pewne dowody wskazujące, że istotną rolę w selekcji cistronów może pełnić 16S rRNA. Udało się np. wykazać, że tworzy on sparowane fragmenty oligonukleotydowe z przyłączającym się do rybosomu mRNA. Dość interesująca jest sugestia jakoby energia hydrolizy GTP potrzebna była do uwalniania z rybosomu czynników IF-2, EF-Tu i EF-G, a nie w procesach katalizowanych przez te enzymy.

Vazquez (Madryt) przedstawił wyniki wieloletnich badań nad mechanizmem działania inhibitorów translacji na poszczególne etapy biosyntezy białka w tym głównie na centrum transferazy peptydylowej. Cenną wartością badań autora jest możliwość identyfikacji białek rybosomowych wchodzących w skład różnych centrów aktywnych rybosomu przy jednoczesnej weryfikacji odnośnych danych uzyskiwanych innymi metodami i przez inne grupy badaczy.

Organizacji genów strukturalnych białek rybosomowych w strukturze genomu *E. coli* poświęcony był referat Nomury (Madison). Przy pomocy fagów transdukcujących i innych metod określono w przybliżeniu lokalizację genów białek rybosomowych wykazując jednocześnie, że geny te występują w formie zgrupowanej a nie rozproszonej w różnych częściach genomu. Clark (Arhus) i Klug (Cambridge, Anglia) przedstawili aktualne zagadnienia dotyczące zależności pomiędzy strukturą i funkcją tRNA, koncentrując swoją uwagę głównie na badaniach krystalicznej struktury tRNA^{phe} z drożdży. Zagadnienie struktury pierwszo- i trzeciorzędowej niektórych syntetaz aminoacylo-tRNA było przedmiotem referatu Hartleya (Londyn). Autor poświęcił także wiele uwagi oligomerycznym formom tych enzymów.

Nowe podejścia eksperymentalne w badaniach kompleksów syntetaza—tRNA i uzyskane rezultaty nad strukturą takich kompleksów omówił Schimmel (Cambridge, USA). Zagadnieniem mechanizmu enzymatycznej metylacji tRNA i strukturalnym aspektem rozpoznawania tRNA przez odpowiednie metylazy był poświęcony referat Bayeva i wsp. (Moskwa). Uzyskane wyniki skłaniają do wniosku, że enzymy te nie rozpoznają poszczególnych sekwencji nukleotydowych tRNA a raczej III-rzędową strukturę cząsteczki tRNA.

Warto ponadto dodać, że zagadnienia poruszane w referatach sympozjalnych były przedmiotem około 150 komunikatów przedstawionych na sesjach plakatowych.

Sympozjum 7 — Neurochemia

Zagadnienia neurochemiczne omawiano w specjalnym sympozjum, podczas konferencji okrągłego stołu oraz w trakcie prezentacji komunikatów w sesji plakatowej. Sympozjum 7 poświęcone neurochemii odbyło się w ramach trzech posiedzeń, na których zgromadzono referentów omawiających zbliżone zagadnienia. Sesji poświęconej omówieniu neuromediatorów przewodniczył Prof. P. Mandel z Francji. On też przedstawił ciekawe zagadnienie dotyczące ewentualnej roli tauryny jako związku o możliwym działaniu mediatora w przewodnictwie nerwowym.

Giocobini z USA omówił wyniki badań nad ewentualną rolą piperydyny w mózgu zwierząt. Tę biogenną aminę wykrywano w śladowych lecz wyraźnie różnych ilościach w poszczególnych obszarach mózgu. Autor referatu nie wyklucza możliwości, że związek ten może uczestniczyć jako neuromediator w funkcji układu nerwowego. W tej części sympozjum na uwagę zasługuje obszerny referat E. Kwamma i wsp. z Oslo o nowych N-podstawionych peptydach w mózgu. Stwierdzono, że bezrybosomowy ekstrakt tkanki mózgowej jest w stanie syntetyzować te peptydy w obecności ATP i inhibitorów biosyntezy białka. Ac-Asp-peptyd może zawierać w swej cząsteczce GABA, taurynę lub histaminę co sugeruje jego udział w tworzeniu kompleksów z neurotranscentrami.

Drugą sesję sympozjum neurochemicznego poświęcono w całości cyklicznym nukleotydym w układzie nerwowym. Wygłoszono w sumie pięć referatów. Jeden z pierwszych referatów był Prof. P. Greengard z USA. W oparciu o doświadczenia z kinazą proteinową aktywowaną przez cAMP przedstawił koncepcję udziału tego układu w mechanizmie transmisji synaptycznej. Pozostałe prezentacje referatów z RFN, NRD, Francji i USA dotyczyły szczegółowych badań nad mechanizmem działania

cyklicznych nukleotydów w receptorach siatkówki jak też udziału kinazy proteinowej zależnej od cAMP w kontroli syntezy hydroksylazy tyrozynowej.

Trzecia część sympozjum, które odbyło się wspólnie z sympozjum na temat błon biologicznych poświęcona była głównie problematyce białkowej. Charakterystyka specyficznych dla tkanki mózgowej białek zajmuje wiele miejsca w pracach neurochemicznych. Oprócz dobrze poznanych białek typu „S-100” lub „14-3-2” ostatnio zwrócono uwagę na specyficzne białka o charakterze glikoproteidów. Charakterystyce i ewentualnej funkcji biologicznej specyficznego glikoproteidu GP-350 poświęcił swój referat Van Nieuw Amerongena (Holandia) oraz G. Gombos (Francja) dotyczący glikoproteidów obszaru synoptycznego. Znany specjalista w zakresie białek zasadowych De Eyler z USA przedstawił obszerny referat na temat charakterystyki białek zasadowych wyodrębnionych z błon myelinowych.

Komunikaty prezentowane w sesji plakatywnej obejmowały tematy związane z: neurotransmitorami (14), strukturą i funkcją synaptyczną (12), neurochemią systemu widzenia (3), neurochemią w procesie rozwojowym (8) oraz neurochemią w stanach patologicznych (6 komunikatów). Ponadto problematyka neurochemiczna reprezentowana była podczas dyskusji okrągłego stołu na temat: „Mechanizmy molekularne na poziomie synaptosomów”. Moderatorem tej dyskusji był Prof. P. Mandel z Francji.

W porównaniu z całością problematyki stanowiącej przedmiot X Zjazdu FEBS, zagadnienia neurochemiczne zajmowały stosunkowo niewiele miejsca. W dużej mierze spowodowane było to odbywającym się miesiąc później w Barcelonie Zjazdem Międzynarodowego Towarzystwa Neurochemicznego.

Sympozjum 6 i 8 — Błony biologiczne i układy przenoszące elektrony

Na sympozja te złożyło się 19 referatów i 238 doniesień w sesjach plakatowych.

Spośród referatów poświęconych mechanizmowi tworzenia gradientu potencjału na błonach biologicznych bardzo ciekawe były danej prezentowane przez W. P. Skulaczewa (Moskwa, ZSRR). Autor omówił trwały model sztucznej błony w skład której wchodzi kompleksy bakteriorodopsyny z fosfolipidami lub proteoliposomami i Ca^{2+} . Model ten służy do badania mechanizmu przepływu elektronów i powstawania potencjału tworzonego przez biologiczne generatory.

F. Racker, Itaka, USA przedstawił pracę na temat rekonstrukcji procesów biologicznych zachodzących w błonie po rozbiciu jej detergentami i przy użyciu ultradźwięków. Przez zastosowanie odpowiednich procedur jest możliwe odtworzenie funkcjonowania pompy protonowej, oksydacyjnej fosforylacji, transportu nukleotydów adeninowych i fosforanu w błonie mitochondrialnej, pompy wapniowej sarkoplazmatycznego retikulum oraz pompy sodowej w błonie komórkowej. Transport wapnia w błonach sarkoplazmatycznych stanowił również temat referatu W. Hasselbacha (Heidelberg, RFN), który omówił funkcje białkowej komponenty błony i jej interakcję z lipidami stanowiącą istotny warunek aktywności enzymatycznej układu. Współzależność pomiędzy białkami i lipidami w błonie mitochondrialnej była również badana metodą rezonansu spinu elektronowego (E.S.R.) z użyciem znaczonych ³¹P kwasów tłuszczowych. Między innymi metodą tą badano translokazę nukleotydów adeninowy h (P. F. Devaux, Paryż, Francja).

Referaty B. Chance'a oraz D. F. Wilsona i wsp. (Filadelfia, USA) dostarczyły nowych danych dotyczących kinetyki, termodynamiki i mechanizmu oddziaływania oksydazy cytochromowej z tlenem cząsteczkowym. T. P. Singer (Madison, USA) przedstawił referat na temat mechanizmu oddziaływania flawinowych przenośników elektronów w regionie dehydrogenazy bursztynianowej łańcucha oddechowego.

Pozjazdowe sympozjum poświęcone współdziałaniu pomiędzy mitochondriami i cytosolem w komórce

Sympozjum to odbyło się 26 lipca 1975 po zakończeniu Zjazdu FEBS. Zorganizowało je Francuskie Towarzystwo Biochemiczne oraz Francuska Grupa Bioenergetyczna. Na sympozjum złożyły się trzy sesje poświęcone najistotniejszym problemom regulacji metabolizmu komórkowego. Ponieważ omawiane zagadnienia są aktualnie przedmiotem badań sesje miały charakter dyskusyjny. Obczeranie omawiano transport metabolitów przez błonę mitochondrialną (J. B. Chappel, Bristol, Anglia) oraz wewnątrzkomórkową kompartmentację metabolitów badaną po rozbiciu komórek przez digitoninę na frakcję cytosolową oraz pelet zawierający fragmenty struktur subkomórkowych (P. F. Zuurendonk, Amsterdam, Holandia i H. W. Heldt, Monachium, RFN). Stwierdzono m.in., że większość komórkowego acetylo-CoA oraz długołańcuchowe acylo-CoA są związane z osadem. T. Bücher, Monachium, RFN wygłosił referat poświęcony mitochondrialnym i cytosolowym potencjałom utleniania—redukcji, a E. C. Slater, Amsterdam, Holandia, omówił wewnątrz i zewnątrzmitochondrialne potencjały fosforylacyjne. Wiadomo, że w normalnych warunkach u zwierząt potencjał utleniania redukcji cytosolu jest bardziej dodatni, niż w mitochondriach, natomiast potencjał fosforylacyjny cytosolu wielokrotnie przewyższa potencjał wewnątrzmitochondrialny. Dyskutowano mechanizm tego zjawiska oraz rolę obu potencjałów w regulacji metabolizmu komórkowego. Na zakończenie J. R. Williamson omówił rolę transportu anionów przez błonę mitochondrialną. Wykazał on, że w pewnych warunkach transport jabłczanu lub α -ketoglutaranu może stanowić czynnik regulujący szybkość glukoneogenezy oraz produkcji mocznika w izolowanych hepatocytach.

Metabolizm; współdziałanie mitochondriów i cytosolu. W sesji plakatowej poświęconej temu zagadnieniu zgromadzono szereg ciekawych doniesień na temat wpływu wewnątrzkomórkowych warunków (stężenia jonów i pH) na metabolizm (R. van der Meer i wsp., Amsterdam, Holandia). Omawiano również wpływ kwasów tłuszczowych na transport metabolitów i nukleotydów adeninowych pomiędzy cytosolem i mitochondriami podczas glukoneogenezy w izolowanych komórkach wątroby szczura (T. P. Akerbroom i wsp., Amsterdam, Holandia). Wykazano, że wewnątrzmitochondrialny stosunek acylo-CoA/CoA jest ściśle skorelowany z poziomem glukoneogenezy. Wpływ kwasów tłuszczowych na syntezę glukozy był tematem doniesień M. J. Geelena i wsp., Utrecht, Holandia (w izolowanych hepatocytach) oraz M. Jomain-Baum i R. W. Hansona, Filadelfia, USA (perfundowana wątroba).

E. J. Davies i wsp., Indianapolis, USA przedstawił dane przemawiające za regulacją steady-state zewnątrzmitochondrialnego potencjału fosforylacji przez palmito-CoA, który hamuje translokację nukleotydów adeninowych.

J. Bryła i J. Zalewski, (Warszawa, Polska) przedstawili pracę dotyczącą równowagi glukoneogenezy. Wpływ kwasów tłuszczowych na glukoneogenezę był tematem doniesień M. J. Geelena i wsp., Utrecht, Holandia (w izolowanych hepatocytach) oraz M. Jomain-Baum i R. W. Hansona, Filadelfia, USA (perfundowana wątroba).

T. Borkowski,
E. Gąsior,
E. Wałajtys.

RECENZJE

W. J. Ridgman "Experimentation in Biology — An Introduction to Design and Analysis".

Blackie 1975, London, Glasgow.

Badacz w zakresie nauk biologicznych spotyka się z dużą zmiennością indywidualną oraz bardzo często z koniecznością stosowania próbek o małej liczebności. Obydwa te czynniki niesłuchanie komplikują interpretację wyników i często zmuszają — jeśli nie stosuje się odpowiednich testów statystycznych — do szukania w ramach pojedynczego eksperymentu odpowiedzi tylko na najprostsze pytania. W efekcie, przy badaniu bardziej złożonego problemu, lub nawet tylko oddziaływania wielu czynników na podmiot eksperymentu, stosuje się wielokrotnie powtarzane doświadczenia cząstkowe. Pomijając nawet fakt kłopotów łączenia wyników eksperymentów cząstkowych w spójną całość, ten typ postępowania pochłania znaczną ilość czasu i materiału doświadczalnego. Z drugiej strony, jeżeli przeprowadza się badania w sposób kompleksowy, to bez pomocy odpowiednich metod matematycznych bardzo łatwo część wniosków przeoczyć lub nawet nieprawidłowo interpretować.

Wydawać by się mogło, że w tej sytuacji właśnie w naukach biologicznych powinno rozwijać się statystyczne opracowywanie wyników i planowanie doświadczeń. Niestety, tradycyjne, fenomenologiczne podejście daje o sobie znać w tym, że wielu badaczy planuje swoją pracę nie zastanawiając się jak będzie analizowało wyniki, a rezultaty szacuje stosując średnią, odchylenie standardowe i test t-Studenta, bez względu czy jest to prawidłowe czy też nie. Używanie podstawy mikroskopu jako linijki do kreskowania słupków przedstawiających wyniki jest ewidentnie nieprawidłowe; niestety często w ten właśnie sposób traktuje się statystykę.

Najlepiej sytuacja przedstawia się tam, gdzie zarówno efekty badań związane są bezpośrednio z zastosowaniami, a częstość eksperymentów jest drastycznie ograniczona przez naturę, a więc w doświadczalnej hodowli roślin i zwierząt. Znalazło to także wyraz w książce W. J. Ridgmana *Experimentation in Biology*, która pomimo bardzo ogólnego tytułu jest ustawiona głównie pod kątem doświadczeń uprawowo-hodowlanych chociaż prezentowane metody postępowania dają się łatwo przystosować do innych typów zagadnień. Łatwość ta w dużej mierze wynika z wyjątkowej czytelności i prostoty przeprowadzonych wywodów. Pomimo omawiania także złożonych zagadnień, od czytelnika wymagana jest jedynie znajomość czterech działań oraz logicznego myślenia. Książkę tę napisano w taki sposób aby mógł ją zrozumieć każdy nie posiadający żadnych wiadomości z zakresu statystyki. Z tego względu autor wprowadza i tłumaczy stopniowo wszystkie, nawet najbardziej podstawowe pojęcia, ilustruje je odpowiednio dobranymi przykładami liczbowymi. Pierwsze rozdziały poświęcone są problemom próbkowania, definiowania hipotez zerowych, stopniom

swobody, różnym miarom tendencji centralnych, wariancji, błędowi standardowemu oraz współczynniki zmienności. Następnie autor prezentuje test t-Studenta w różnych wariantach wraz z tworzeniem przedziałów ufności, test Fisher-Behrensa oraz test U Mann-Whitney.

Dalszą część książki poświęcono doświadczeniom z jednym czynnikiem występującym na wielu poziomach lub też z wieloma czynnikami. Sygnalizując tylko problemy dokładnie omówione w książce wymienić można wielowymiarową analizę wariancji z testem Duncana, analizę typu 2^n , gniazdową, problem czynników losowych i deterministycznych, wielomiany ortogonalne, regresję i korelację jako szczególnie przypadki analizy wariancji, metodę uwikłania, analizę nieortogonalną oraz analizę kowariancji. Bardzo cenną cechą jest to, że autor równolegle z prezentacją testów parametrycznych przytacza odpowiednie do danego zagadnienia testy nieparametryczne omawiając test Wikoxona, Kruskal—Wallisa, Friedmann'a i współczynnik korelacji Kendalla. Nie zabrakło także omówienia metod planowania eksperymentów od klasycznego kwadratu łacińskiego do bardziej złożonych metod.

Natomiast odczuwa się brak testów na zgodność otrzymanego rozkładu z teoretycznym. W. J. Ridgman podkreśla istotność spełnienia założenia o rozkładzie normalnym, ale nawet klasycznie używany do tego celu test jakim jest χ^2 jest przedstawiony głównie do badania interakcji. Brak zupełnie szerokiej i bardzo mocnej klasy testów Smirniv-Kołmogorova, które są niezwykle wygodne nie tylko przy badaniu zgodności rozkładów z teoretycznym (np. wariant test Kołmogorova do badania normalności rozkładu — test Lillieforsa), ale także do badania istotności różnic dwóch, lub więcej grup danych. Brakuje też omówienia możliwości wstępnej transformacji danych. Została pominięta możliwość skorygowania rozkładu danych i zbliżenia go do rozkładu normalnego — np. przy procentach — oraz stosowanie metody regresji jeśli typ zależności nie jest wielomianowy lecz innego typu np. $1/x$, a^x lub x^a . Oczywiście możemy aproksymować dany typ zależności wielomianami, ale często z przesłanek teoretycznych lub poprzednich badań wiadomo jaki jest typ krzywej i prosta transformacja danych pozwala na zredukowanie problemu do regresji liniowej. Umożliwia to nie tylko stosowanie znacznie prostszych metod obliczeniowych, ale również osiąganie większej dokładności ocen parametrów przy mniejszej ilości punktów zmiennej niezależnej. Wyjaśnienie tych problemów zajęłoby zaledwie kilka stron, a dla osoby bez podstaw matematycznych stanowiłoby to wielką pomoc.

Także, na tle prezentowanych bardzo jasno i zrozumiale problemów, niedostatecznie wyraźnie została podkreślona możliwość liczenia poszczególnych wariancji bezpośrednio jako sumy kwadratów odpowiednich sum cząstkowych, a nie tylko metodą Yates'a. W książce tej nie podano szerszych tablic, a tylko ich fragmenty i w praktyce jako niezbędny dodatek do niej trzeba mieć tablice statystyczne.

Powyższe zastrzeżenia nie umniejszają wartości tej interesującej książki. Czytelnik jest stopniowo prowadzany w coraz trudniejsze zagadnienia, przy czym nie musi dysponować praktycznie żadną wiedzą statystyczną czy też matematyczną. Wielką zaletą książki jest jej zwięzłość. Cała książka, pomimo szerokiego wachlarza omawianych problemów, ma zaledwie 223 strony formatu nieco mniejszego od A5 i stanowi jedną spójną całość łatwą do przeczytania i zrozumienia. Także szerokie stosowanie przykładów liczbowych, które nie tylko są szczegółowo analizowane od strony logicznej ale obliczane krok po kroku, znacznie ułatwia zrozumienie prezentowanych zagadnień.

Ta niezwykle prosto, jasno i zwięźle napisana książka daje możliwość zapoznania się nie tylko z dobrze dobranym zestawem testów, lecz również z generalnymi zasadami planowania eksperymentów i ze sposobami myślenia statystycznego. Z powyższych względów jest ona godna polecenia zarówno studentom jak i pracownikom nauki reprezentującym cały zakres nauk biologicznych.

**Wolfgang Wiessner "Bioenergetik bei Pflanzen",
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1975,**

str. 224, ryc. 55, schematów 44, tabel 22

„Bioenergetik bei Pflanzen” jest kolejną monografią z serii „Bausteine der modernen Physiologie” wydawanej przez wydawnictwo G. Fischer. Książkę poświęcił autor omówieniu głównych etapów przekształcania energii w organizmach roślinnych. Pierwszym jest proces fotosyntezy, tj. przekształcanie energii świetlnej w energię chemiczną utworzonych związków organicznych, drugim jest wytwarzanie energii w wyniku przekształceń produktów fotosyntezy w procesach katabolicznych.

Bioenergetykę roślin przedstawia autor w 6 rozdziałach:

1. Historia badań nad fotosyntezą, obliczenia zapotrzebowania energetycznego, rola NADPH i ATP;
2. Cytologiczno-chemiczne podstawy fotosyntezy. Budowa i skład chemiczny chloroplastów, barwniki występujące w chloroplastach i ich rola w fotosyntezie;
3. Fizjologia fotosyntezy. Zależność procesu od stężenia CO_2 , O_2 , soli mineralnych, intensywności i barwy światła, współzależność dwu reakcji świetlnych;
4. Biofizyka fotosyntezy. Absorpcja promieniowania, energetyka tego procesu, rola różnych barwników w absorpcji promieniowania i przekształcania energii;
5. Biochemia fotosyntezy. Reakcje oksydacyjno-redukcyjne, I i II układ fotosyntezy i ich składniki, fosforylacja cykliczna i niecykliczna, teoria chemiczno-osmotycznego sprzężenia transportu elektronów i protonów z fosforylacją, redukcja CO_2 w cyklu Calvina, dobowe wahania poziomu kwasów organicznych w roślinach gruboszowatych, włączanie CO_2 w szlaku Hatcha, Slacka i Kortschaka;
6. Katabolizm — fizjologia oddychania, lokalizacja i przemiany w komórce drogi glikolitycznej, cyklu kwasów trójkarboksylowych, łańcucha oddechowego i oksydacyjnej fosforylacji. Zakres wiadomości zawartych w tym rozdziale o objętości 30 stron (1/6 całości książki) w znacznym stopniu pokrywa się z materiałem kursu podstawowego wielu podręczników biochemii. Cechuje go przy tym, jak i całą książkę duża zwięzłość opisu co wymaga od czytelnika dobrej znajomości podstaw biochemii. Zaletą tego rozdziału jest zgrupowanie i podkreślenie procesów zachodzących w tkankach roślin.

Proces fotosyntezy, mimo ogromnego znaczenia biologicznego nie znajduje odpowiedniego odzwierciedlenia w większości podręczników biochemii, zarówno krajowych jak i zagranicznych. Autorzy podręczników ograniczają się naogół do przedstawienia reakcji cyklu Calvina i schematu fotosyntetycznego transportu elektronów. „Bioenergetik bei Pflanzen” jest monografią, w której proces fotosyntezy potraktowano szczegółowo i wnikliwie. Wykorzystano w niej dane doświadczalne do 1971 oraz kilkanaście pozycji literatury z roku 1972. Można byłoby więc oczekiwać, że kilka przynajmniej zagadnień będzie przedstawionych odpowiednio do poziomu wiedzy w tym okresie. Tak jednak nie jest, gdyż autor nie uniknął kilku przeoczeń. tak spisując włączanie CO_2 w cyklu Calvina (str. 139) pominął zupełnie dane o mechanizmie regulacji tego procesu, mimo, że były one przedmiotem wielu publikacji oraz tematem referatu J. A. Basshama na II Kongresie Fotosyntezy w 1971. Z opublikowanych materiałów tego Kongresu Autor korzystał przy omawianiu innych zagadnień. Początkowo uważano wprawdzie, na podstawie zdjęć z mikroskopu elektronowego, że chloroplasty pochw. okołowiązkowych w roślinach typu C_4 nie mają gran (str. 147), lecz w roku 1971/72 ukazały się prace wykazujące, że chloroplasty te mimo braku widocznych gran zawierają II układ fotosyntezy i tworzą NADPH i ATP, niezbędne w procesie redukcji CO_2 w cyklu Calvina.

Autor omawia tylko powstawanie glikolanu z „aktywnego aldehydu glikolowego” tworzonego w reakcji katalizowanej przez transketolazę (str. 149). W 1975 roku wiadomo już było, że P-glikolan a z niego glikolan mogą powstawać z rybulozo-1,5-dwufosforanu w reakcji katalizowanej przez oksygenazę rybulozo-1,5-dwufosforanu. Transport metabolitów przez błonę chloroplastów (str. 151) przedstawiono w sposób niepełny z szerszym jedynie omówieniem transportu ATP, ortofosforanu i kwasów dwukarboksylowych, zachodzącego przy udziale odpowiednich przenośników.

Uzupełnienia tych braków nie znalazły się jednak w zamieszczonym na końcu książki 2 stronicowym Dodatku omawiającym wyniki badań z lat 1972 i 1973.

Przytoczone tutaj uwagi krytyczne nie obniżają oceny starannego i rzeczowego opracowania monografii. Wskazują tylko, że szybki rozwój badań w tej dziedzinie sprawia wiele trudności w ich bieżącym przedstawieniu, szczególnie w chwili gdy książka jest już przygotowana do druku.

Monografia „Bioenergetik bei Pflanzen” jest dobrze zilustrowana rysunkami (55), schematami reakcji i cykli (44), tabelami (22). Zawiera wiele równań reakcji i wzorów strukturalnych omawianych związków. Przedstawiony materiał doświadczalny obejmuje całość zagadnień związanych z bioenergetyką roślin i z tego względu zasługuje na polecenie jej tym wszystkim, którzy interesują się tą tematyką.

Zbigniew Kaniuga

Metody instrumentalne w histochemii — Sympozjum organizowane przez Towarzystwo naukowe DDR zajmujące się zagadnieniami histochemii i mikroskopii elektronowej, Lipsk, 5—8.III.1974.

Acta Histochemica, Supplement, XV, wyd. Gustav Fischer, Jena, 1975, stron 443.

Dobłą tradycją redakcji czasopisma *Acta Histochemica* stał się zwyczaj wydawania suplementów obejmujących całość materiałów dorocznych sympozjów organizowanych przez niemieckie towarzystwa naukowe zainteresowane zagadnieniami histochemii i mikroskopii elektronowej. Ostatni, XV tom zawiera bogato ilustrowane materiały sympozjum zorganizowanego w marcu 1974 r. w Lipsku, przez Towarzystwo Histochemików i Mikroskopii Elektronowej oraz przez Oddział Fizjologii Zwierząt Towarzystwa Biologicznego NRD. Tematem obrad były metody instrumentalne uzupełniające konwencjonalne metody stosowane w histochemii. Objęto nimi zarówno metody badań *in vitro*, — jak na przykład zapożyczone z pracowni biochemicznych frakcjonowanie wirowanie, elektroforeza na żelach poliakrylamidowych, chromatografia, stale udoskonalana metoda van Duijn'a analizy substancji zawieszonych w błonach modelowych, jak również metody badań *in situ* obejmujące bezpośrednią lokalizację różnych związków w komórce. W tym ostatnim przypadku, zgodnie z założeniem sympozjum, przedstawiono możliwości zastosowania odpowiedniej aparatury do samej detekcji tych związków w komórce, oraz możliwości obiektywnej oceny wyników uzyskanych przy pomocy bardziej konwencjonalnych metod. Znalazły tu miejsce prace wykonane przy pomocy takich metod, jak na przykład cytofotometria, mikroskopia polaryzacyjna i interferencyjna, badanie składu chemicznego ultracienkich skrawków na drodze analizy emitowanego przez nie widma rentgenowskiego wzbudzanego w mikroskopie elektronowym działaniem wiązki elektronów, analiza elektroniczna obrazów (fotogramów) reakcji cytochemicz-

nych, lub analiza procesu mineralizacji tkanek przy użyciu metody śledzenia rezonansu spinowego. Tę ostatnią metodę opracowano wspólnie w Instytucie Biostruktury i Instytucie Badań Jądrowych w Warszawie — co jest rzeczą szczególnie miłą dla czytelnika polskiego. Oczywiście nie wszystkie prace wypełniające ten 443-stronicowy tom odpowiadają ściśle tytułowi symposium. Wiele jest takich, w których jedynym „instrumentem” jest mikroskop świetlny lub elektronowy. Niestety — podobnie, jak u nas, tak i w NRD nie wszystkie pracownie cytochemiczne wyposażone są w odpowiednią aparaturę pomiarową. Zarówno cytofotometry, jak i analizatory dokumentacji fotograficznej, które powinny wchodzić w skład podstawowego wyposażenia tego typu pracowni spotyka się nieczęsto. Lekturę recenzowanego tomu uważam więc za tym bardziej pożyteczną dla osób zainteresowanych biologią komórki, ponieważ obok informacji dotyczących samego meritum opracowywanych zagadnień oraz innowacji metodycznych dostarcza również — pośrednio — informacji mówiących o tym gdzie, kto, w jakiej pracowni dane problemy rozwiązuje i dane metody wprowadza.

A. Przełęcka

Biochemistry of Cell Walls and Membranes, red. C. F. Fox,

tom wydany w 1975 r. przez Butterworth and Co., Ltd przy współudziale Medical and Technical Publishing Co., Ltd oraz University Park Press, Baltimore.

Współczesność fenotypowych i proliferacyjnych cech komórek i ich właściwości immunologicznych oraz dynamicznej struktury błon komórkowych sprawiają, że błonom tym przypisują niektórzy niemal omnipotentną rolę w sterowaniu metabolizmem komórkowym, a nawet w podejmowaniu decyzji czy w komórce rozpocznie się synteza DNA prowadząca do podziału komórki, czy też nie w zależności od sygnałów, jakie komórki otrzymują od środowiska zewnętrznego i od innych komórek.

Poszczególne wspomniane tu zjawiska i zależności przedstawia książka: „Biochemia ścian i błon komórkowych” stanowiąca drugi tom (str. 316) biochemicznej serii wydawnictwa seryjnego obejmującego różne dziedziny chemii i fizjologii (porównaj recenzję tomu „Biochemistry of Nucleic Acids”, *Postępy Biochemii*, (1975), 22, 113—114). Zdaniem tomu opracowanego pod redakcją S. F. Foxa z Kalifornijskiego Uniwersytetu w Los Angeles było daniem możliwie pełnego obrazu wiedzy o błonach biologicznych, bez zbędnego jednak powtarzania wielu szczegółowych informacji już opublikowanych w innych monografiach. Co więcej zarówno redaktor tomu jak i autorzy — wybrani spośród wielu specjalistów — dbali o to, by przedstawiając najnowsze osiągnięcia ujmowali je z innego punktu widzenia niż uczyniono to w opublikowanych wcześniej monografiach. Tom zawiera następujące artykuły:

1. Biochemia endocytozy (E. D. Korn).
2. Selektywność cząsteczkowych nośników, błon i enzymów wobec jonów G. Eisenman i S. J. Krasne).
3. Błony transformowanych komórek ssaków (R. O. Brady and P. H. Fishman).
4. Ruchliwość składników błony (F. Podo i J. K. Blasie).
5. Orientacja molekularna białek w błonach (W. T. Marchesi).
6. Rola powierzchni w produkcji nowych komórek (A. B. Pardee i E. Rozengurt).
7. Błony w przewodzeniu impulsów nerwowych (C. W. Cotman i W. B. Lewy).
8. Interferencja penicyliny i innych antybiotyków z procesami syntezy ściany bakteryjnej (J. L. Strominger).

9. Wymiana białek błonowych (R. T. Schimke).
10. Transport przez błony (W. Epstein).
11. Zmiany faz w układach modelowych i błonach biologicznych (C. F. Fox).

Przejrzenie spisu treści i przedmowy redaktora nasuwa pytanie czym się kierował szeregując artykuły skoro czytelnikowi zaleca ich czytanie z zupełnie innej kolejności. Radzi on mianowicie ze względów dydaktycznych przeczytać najprzód rozdziały, które omawiają ogólną organizację, skład i dynamiczność organizacji błon biologicznych (rozdz. 5, 11, 4 i 9), później rozdziały traktujące o transporcie przez błony (2, 10 i 8), następnie rozdział o endocytozie (1) przed opisującym znaczenie błon w przewodnictwie impulsów nerwowych (7), a wreszcie rozdziały mówiące o roli błon komórkowych w regulacji podziałów komórkowych (3 i 6).

Zgodnie z założeniami wydawnictwa tom „Biochemia ścian i błon komórkowych” omawia wszechstronnie i krytycznie bieżący postęp w tej dziedzinie wiedzy a syntetyczna forma relacji powoduje, że książka jest komunikatywna a jej lektura porządkując wiadomości czytelnika sprawia mu przyjemność. Jest to jednak książka wymagająca od czytelnika przygotowania zarówno w zakresie biochemii jak i biologii komórki i przeznaczona jest dla naukowców pracujących właśnie w tych dziedzinach.

Z. Zielińska

SPIS TREŚCI

Z. Kaniuga — Regulacja włączania CO ₂ w procesie fotosyntezy (<i>Referat Sympozjalny wygłoszony na XIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego</i>)	245
M. Lercher — Protoplasty roślinne i ich zastosowanie w badaniach biologicznych	305
K. Bańkowski — Dynamika cząsteczkowa związków naturalnych wyznaczana z badań relaksacji spinowo-sieciowej jąder węgla ¹³ C	321
B. Grzelakowska-Sztabert — Transport i metabolizm folianu w komórkach zwierząt i drobnoustrojów	343
W. Lutz — Przemiana glutationu i transport aminokwasów; cykl γ-glutamylowy	385
J. Piotrowski, E. M. Mogilnicka — Metalotioneina	399
Sprawozdanie — X Zjazd FEBS, Paryż, 20—25.7.1975	419
Recenzje	425

POSTĘPY BIOCHEMII

September 1976

ARTICLES IN POLISH

Volume 22

Number 3

Z. Kaniuga — Regulatory Mechanisms in Photosynthesis of CO ₂ Fixation (Inst. Biochem. University of Warsaw, Warszawa)	245
M. Lercher — Plant Protoplasts and their Application in Biological Investigations (Inst. Biochem. University of Warsaw, Warszawa)	305
K. Bańkowski — Molecular Dynamics of Natural Compounds as Determined by Carbon-13 Spin-Lattice Relaxation Time Studies (Lab Peptides, Inst. Fund. Probl. Chem., University of Warsaw, Warszawa)	321
B. Grzelakowska-Sztabert — Transport and metabolism of folate in animal cells and microorganisms (Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	343
W. Lutz — Glutathione Turnover and the Transport of amino acids. The γ -Glutamyl Cycle (Dep. Med. Anal. Inst. Inter. Med., Military Academy, Łódź)	385
J. K. Piotrowski, E. M. Mogilnicka — Metallothionein (Dept. Toxicol. Chem., Inst. Environmental Res. Bioanal. School of Medicine, Łódź)	399
Meeting Report	419
Book Reviews	425

POSTĘPY BIOCHEMII

— kwartalnik

Cena zł 20.—

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej

półrocznie zł 40.—

rocznie zł 80.—

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

- do dnia 25 listopada na styczeń, I-szy kwartał, I-sze półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 10 miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty na pozostałe okresy roku bieżącego.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SPIS TREŚCI

Z. Kaniuga — Regulacja włączania CO ₂ w procesie fotosyntezy (<i>Referat Sympozjalny wygłoszony na XIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego</i>)	245
M. Lercher — Protoplasty roślinne i ich zastosowanie w badaniach biologicznych	305
K. Bańkowski — Dynamika cząsteczkowa związków naturalnych wyznaczana z badań relaksacji spinowo-sieciowej jąder węgla ¹³ C	321
B. Grzelakowska-Sztábert — Transport i metabolizm folianu w komórkach zwierząt i drobnoustrojów	343
W. Lutz — Przemiana glutationu i transport aminokwasów; cykl γ -glutamylowy	385
J. Piotrowski, E. M. Mogilnicka — Metalotioneina	399
Sprawozdanie — X Zjazd FEBS, Paryż, 20—25.7.1975	419
Recenzje	425