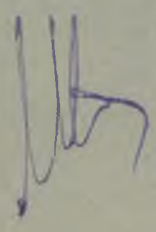


POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII



1966
tom 12
nr 4

KWARTALNIK

<http://rcin.org.pl>

INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Prof. Dr Józefowi HELLEROWI w 70-lecie urodzin Redakcja Postępów Biochemii składa najlepsze życzenia.

Z myślą o pierwszym Redaktorze i współzałożycielu naszego czasopisma wydajemy zeszyt o oddychaniu tkankowym. Z tymi zagadnieniami od wielu lat związane są Jego zainteresowania i działalność naukowa.

Redakcja

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1966
tom XII
zeszyt 4

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

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

Komitet Redakcyjny

Redaktor -- Zofia Lassota

Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1966

Nakład 1390 (1250 + 140)	Oddano do składania 29.VII.66 r.
Ark. wyd. 13. Ark. druk. 10,75	Podpisano do druku w listopadzie 66
Papier druk. sat. kl. V, 70 × 100	Druk. ukończono w grudniu 66
Cena zł 20.--	Zam. nr 1122/66 M-4

DRUKARNIA IM. RWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ. WARSZAWA

ZBIGNIEW KANIUGA * JADWIGA BRYŁA **

Odwracalność reakcji przenoszenia elektronów i energii w łańcuchu oddechowym

Reversal of the Respiratory Chain

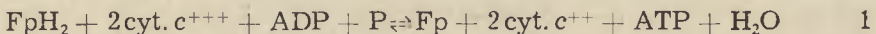
PANU PROFESOROWI JOZEFOWI HELLEROWI
Z OKAZJI 70-TEJ ROCZNICY URODZIN

Several aspects of the reversibility of electron and energy transfer in the respiratory chain as well as methods and properties of investigated materials are reviewed and discussed.

I. Wprowadzenie

Łączenie się wodoru substratowego z tlenem katalizowane w układach biologicznych przez enzymy łańcucha oddechowego związane jest ze znacznym spadkiem energii. W układach sprzężonych procesowi temu towarzyszy fosforylacja, w wyniku której energia utleniania zostaje przekształcona w energię wiązania pirofosforanowego w ATP.

Zakładając, że po dostarczeniu energii mogłoby nastąpić odwrócenie procesu utleniania, tj. przeniesienie elektronów w kierunku substratu i redukcja związków o niższym potencjale oksydoredukcyjnym, Krebs i wsp. (55, 109) rozważali możliwość odwracalności następującej reakcji:



Wzrost stężenia ATP (powstającego w I i III miejscu fosforylacji w łańcuchu oddechowym) przesuwałby równowagę reakcji w kierunku na lewo. Wiązanie pirofosforanowe ATP spełniałoby tu rolę energetycznego łącznika między różnymi układami oksydoredukcyjnymi, przy czym ilość

* Doc. dr, Kierownik Zakładu Enzymatyki Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

** Mgr, asystent Zakładu Enzymatyki Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Wykaz stosowanych skrótów: PMS — metylosiarczan N-metylofenazyliowy, TPMD — tetrametylo-*p*-fenylenodwuamina, DNP — 2,4-dwunitrofenol, TTA — 4,4,4-trójfluoro-1-(2-tiofeno)-1,2-butan-1,3-dion, NQNO — N-tlenek hydroksychinoliny.

energii uwolnionej w reakcji zamiany ATP na ADP zależałyby od stosunku $[ATP]/[ADP]$.

Chance i Williams (46) podjęli próby potwierdzenia tego przypuszczenia dla pokrewnej reakcji:



Próby odwrócenia tej reakcji nie powiodły się jednak nawet przy stosunku $[ATP]/[ADP]$ rzędu 10^4 , a szybkość i wydajność fosforylacji oksydacyjnej okazała się niezależna od stosunku $[ATP]/[ADP]$ w granicach 10^2 — 10^4 . Uzyskane wyniki skłoniły autorów do podtrzymania panującej wówczas teorii, że reakcja między ADP i nośnikami łańcucha jest zasadniczo nieodwracalna, mimo że fakty te były sprzeczne z wynikami badań nad odwracalnością reakcji cząstkowych oksydacyjnej fosforylacji, jak wymiana między ATP i ^{32}P , ATP—ADP i $^{18}O_2$ — H_2O (119, 120) (por. artykuł Wojtczaka 168).

Z obliczeń termodynamicznych dla reakcji w układach biologicznych zwyczajowo przyjmowano, że np. tworzenie NADH zachodzi w reakcji egzoergicznej, w której wolna energia układu oksydoredukcyjnego ($AH_2 \rightarrow A$) jest wystarczająco ujemna w stosunku do nukleotydów, aby redukcja NAD przebiegała bez dopływu energii z zewnątrz (13). Toteż obserwacja Chance'a i Hollungera (16, 32), że NAD^+ ($E'_0 = -0,32V$) ulega redukcji po dodaniu bursztynianu ($E'_0 = 0,00V$) była zaskakująca, ponieważ reakcja taka termodynamicznie jest niemożliwa bez wkładu energii. Spostrzeżenie to zapoczątkowało w latach 1959—1960 intensywne badania, prowadzone głównie w pracowniach Chance'a, Klingenberga, Slatera i Ernster'a, nad reakcjami przeniesienia elektronów w kierunku substratu wbrew różnicy potencjału oksydoredukcyjnego, przy wykorzystaniu energii ATP lub wysokoenergetycznych pośredników oksydacyjnej fosforylacji (por. artykuł Bryły i Gardasa (11)).

Badania nad tym procesem nazywanym potocznie „odwróceniem łańcucha oddechowego i oksydacyjnej fosforylacji” wykazały, nie tylko, że substraty o wyższym potencjale oksydoredukcyjnym mogą być wykorzystane do redukcji nukleotydów nikotynamidoadeninowych i innych układów oksydoredukcyjnych, ale również, że energia wysokoenergetycznych pośredników oksydacyjnej fosforylacji wytworzonych w jednych miejscach łańcucha oddechowego może być przeniesiona i wykorzystana w innych, z całkowitym pominięciem udziału ATP. Wskazuje to, zgodnie ze znanymi zależnościami termodynamicznymi, że odwrócenie przeniesienia elektronów jest związane z odwracalnością oksydacyjnej fosforylacji.

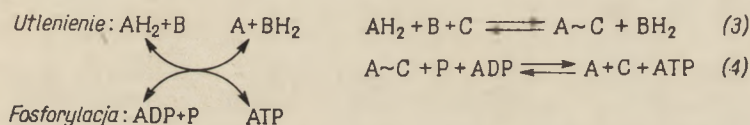
II. Odwracalność oksydacyjnej fosforylacji

1. Chemiczny mechanizm fosforylacji *)

Chemiczna teoria oksydacyjnej fosforylacji przyjmuje, że podobnie jak w przypadku fosforylacji substratowej energia reakcji oksydoredukcyj-

nych w łańcuchu oddechowym zostaje zachowana w formie związku bogatego w energię. W przeciwieństwie do tego, postulowana ostatnio przez Mitchella (126a-e) chemiosmotyczna teoria oksydacyjnej (i fotosyntetycznej) fosforylacji, tłumacząc te procesy na zupełnie odmiennym zasadzie, nie uznaje istnienia wysokoenergetycznych pośredników i przypisuje istotną rolę tzw. potencjałowi błony mitochondrialnej, który wykorzystywany jest do syntezy ATP. Chociaż obecnie nie ma dostatecznych danych pozwalających przyjąć, zgodnie z pierwszą lub drugą teorią, że energia jest gromadzona tylko w formie wysokoenergetycznych pośredników lub tylko potencjału błony mitochondrialnej, to jednak dotychczasowe badania nad odwracalnością łańcucha oddechowego są tłumaczone udziałem wysokoenergetycznych pośredników w tym procesie.

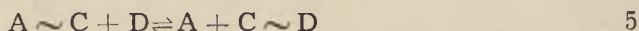
Podstawowym założeniem chemicznej teorii fosforylacji jest pogląd, że wysokoenergetyczne związki zawierające składniki łańcucha oddechowego są pośrednikami w łańcuchu reakcji prowadzącym od utleniania do syntezy ATP. Mechanizm tego procesu można wyrazić ogólnym schematem zaproponowanym jeszcze w 1953 r. przez Slatera (144) i przedstawianym również obecnie (147, 148, 149).



Rys. 1. Sprzężenie utleniania z fosforylacją (148)

Związek C jest potrzebny do przeniesienia wodoru z donora AH_2 na akceptor B. Utleniony produkt A pozostaje związany w formie wysokoenergetycznego pośrednika $\text{A} \sim \text{C}$, który w obecności ADP i P rozpada się na A i C z utworzeniem ATP.

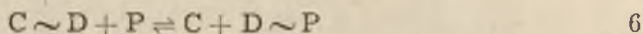
Dalsze badania wykazały, że reakcja 4 jest sumą reakcji cząstkowych. Fakt, że arsenian w przeciwieństwie do DNP nie cofa zahamowania oddychania przez oligomycynę doprowadziły Estabrooka (66) oraz Huijinga i Slatera (83) do wniosku, że $\text{A} \sim \text{C}$ nie reaguje bezpośrednio z P i że w procesie oksydacyjnej fosforylacji bierze udział drugi pośrednik D:



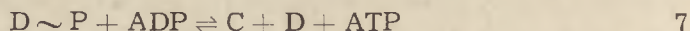
Większość badaczy przyjmuje obecnie, że wysokoenergetyczny pośrednik typu $\text{C} \sim \text{D}$ również nie reaguje bezpośrednio z P i ADP, ale że tworzy się najpierw ufosforylowany pośrednik $\text{D} \sim \text{P}$, (określany często również jako $\text{X} \sim \text{P}$)**.

* Szczegółowy przegląd badań nad mechanizmem oksydacyjnej fosforylacji ogłosił ostatnio Slater (149a).

** Wysokoenergetyczne pośredniki oksydacyjnej fosforylacji oznaczone przez Slatera (83, 149) $\text{A} \sim \text{C}$, $\text{C} \sim \text{D}$ i $\text{D} \sim \text{P}$ odpowiadają poprzednim symbolom



który dopiero w reakcji z ADP tworzy ATP



Zatem między pierwotną, dostarczającą energii reakcją oksydoredukcyjną a syntezą ATP istnieją przynajmniej dwa wysokoenergetyczne pośredniki nieufosforylowane ($\sim C$ i $\sim D$) i jeden ufosforylowany ($\sim P$). Przyjmuje się, że zasadniczo w każdym miejscu łańcucha oddechowego reakcje oksydacyjnej fosforylacji przebiegają według tego samego mechanizmu. Wskazuje na to między innymi możliwość wykorzystania energii pośredników wytworzonych w jednym miejscu do odwrócenia reakcji oksydoredukcyjnych w innym miejscu łańcucha oraz wyniki badań z zastosowaniem czynników rozprzegających i inhibitorów przenoszenia energii.

2. Wpływ czynników rozprzegających i inhibitorów

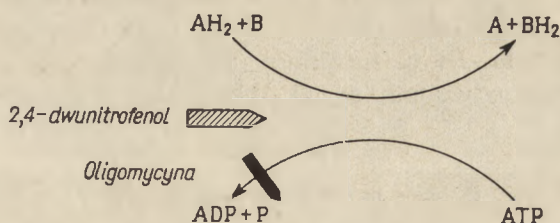
Od dawna wiadomo było, że dwunitrofenol stymuluje oddychanie całych komórek a równocześnie hamuje różne ich funkcje wymagające energii (146), jednak dopiero w 1948 r. Loomis i Lipmann (122) wykazali, że dwunitrofenol rozprzega fosforylację od utleniania. Utlenianie przebiega wówczas z maksymalną szybkością również w nieobecności ADP i P, ale nawet w ich obecności fosforylacja nie zachodzi (122). Można to wytłumaczyć przyjmując pogląd (113), że DNP powoduje rozpad wysokoenergetycznego pośrednika nieufosforylowanego, wskutek czego ADP i P nie są potrzebne w reakcji oddychania. Ponieważ reakcja pośrednika z ADP i P jest odwracalna, dwunitrofenol aktywuje ATP-azę i powoduje rozpad ATP (114).

Oligomycyna zastosowana po raz pierwszy w 1958 roku przez Lady'ego i wsp. (115) jest silnym inhibitorem oddychania w ściśle sprzężonych mitochondriach, hamując przede wszystkim fosforylację, natomiast zahamowanie utleniania jest wtórnym skutkiem działania na sprzężone z oddychaniem reakcje fosforylacji. W luźnie sprzężonych lub rozprzężonych mitochondriach, a także w cząstkach submitochondrialnych oligomycyna nie hamuje transportu elektronów (66, 83). Antybiotyk ten hamuje katalizowane przez mitochondria reakcje wymiany między fosforanem nieorganicznym i ATP (112, 115) oraz tlenu między resztą fosforanową a wodą (112), a także reakcje ATP-azy aktywowanej przez różne czynniki (112) między innymi przez arsenian (5).

Jeśli przyjąć, że oligomycyna hamuje reakcję 6, wówczas DNP musi działać przed etapem, w którym P bierze udział w ciągu reakcyjnym

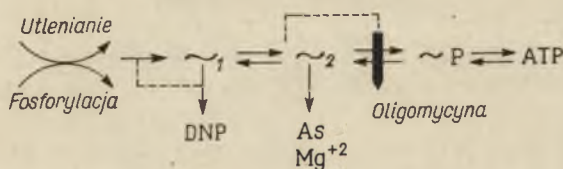
Myersa i Slatera (127) $A \sim I, I \sim X$ i $X \sim P$ oraz Chance'a i Williamsa (46) pierwszy: $NADH \sim I, b^{+2} \sim I, c^{+2} \sim I$, drugi $X \sim I$ i trzeci $X \sim P$ oraz Ernster'a (60) $C \sim I, I \sim X, X \sim P$.

(112). Wskazuje na to fakt, że w obecności dwunitrofenolu oligomycyna nie hamuje oddychania, ponieważ przebiega ono niezależnie od fosforylacji (rysunek 2), hamuje natomiast ATP-azę aktywowaną przez DNP, gdyż hamuje reakcję między ATP a nieufosforylowanym wysokoenergetycznym pośrednikiem.



Rys. 2. Wpływ oligomycyny w obecności 2,4-dwunitrofenolu (148)

Dowodami istnienia w oksydacyjnej fosforylacji pośrednika typu $\sim P$ są obserwacje Crane'a i Lipmanna (15) potwierdzone ostatnio przez Ter Wellego i Slatera (164), że w nieobecności ADP fosforan hamuje stymulowane arsenianem utlenianie. Dodanie DNP lub ADP cofa zahamowanie. Arsenian i fosforan współzawodniczą więc o miejsce w oksydacyjnej fosforylacji. Ponieważ fosforan reaguje aktywniej, arsenian w obecności fosforanu ma niewielki wpływ na stosunek P : O. Arsenian aktywuje ATP-azę, jednak działa ona wolno w porównaniu z ATP-azą aktywowaną dwunitrofenolem lub w porównaniu z szybkością oddychania w obecności arsenianu i ADP. Te wyniki zdają się jednocześnie wskazywać, że trwały związek typu $\sim P$ powstaje jako pośrednik w reakcji 6. Arsenian rozprzega więc reagując z nieufosforylowanym wysokoenergetycznym pośrednikiem (149). Jednak w przeciwieństwie do dwunitrofenolu (115) arsenian nie znosi hamującego wpływu oligomycyny na oddychanie ściśle sprzężone (66, 83, 146), oligomycyna zaś, jak wspomniano, hamuje ATP-azę stymulowaną arsenianem (5). Te cechy wskazują, że również oligomycyna działa przed wejściem w reakcję P i pozwalają zróżnicować przypuszczalne miejsca działania czynników rozprzegających (rysunek 3).



Rys. 3. Przypuszczalne miejsca działania 2,4-dwunitrofenolu, arsenianu i oligomycyny

Zdaniem S a n a d i e g o (141) jest możliwe, że fosforan, arsenian i oligomycyna działają w tym samym miejscu a różnica polega tylko w ich powinowactwie do enzymu i pośrednika.

Zarówno DNP jak i oligomycyna wydają się działać na wszystkie trzy miejsca fosforylacji w łańcuchu oddechowym, w odróżnieniu od bardziej specyficznego działania amytału (38) i alkiloguanidyn (136) hamujących w pierwszym miejscu fosforylacji, NQNO i hydrolapacholu (2-hydroksy-3/3-metylo-2-butylo/-1,4-naftochinon) (82) hamujących w drugim i syntalinu (dekametylenodwuguanidyna) (71) — hamującym w trzecim miejscu fosforylacji.

3. Stany metaboliczne mitochondriów

Szybkość oddychania i fosforylacji zależy nie tylko od stężenia substratu i tlenu, ale także od stężenia ADP, P i produktu reakcji ATP. Analizując wpływ tych czynników na aktywność oddechową mitochondriów i stan oksydoredukcyjny składników łańcucha C h a n c e i W i l l i a m s (43, 46) wyróżnili pięć stanów metabolicznych mitochondriów. Stan 1 charakteryzuje się brakiem substratu i ADP. Stan 2 — to warunki, w których brak tylko substratu zarówno egzogenego jak i endogenego. W tym stanie mitochondria są „labilne”, a składniki łańcucha prawie całkowicie utlenione. W obecności wszystkich niezbędnych składników mitochondria są w stanie 3. Jest to stan intensywnego oddychania i fosforylacji określane często jako „stan aktywny”. Czynnikiem ograniczającym oddychanie jest sam łańcuch oddechowy. Mimo znacznych zmian poziomu ADP stan oksydoredukcyjny cytochromów pozostaje stały. Stan 4 określane przez Chance'a jako „stan spoczynku”, a przez Klingenberga jako „stan kontrolowany” charakteryzuje się powolnym oddychaniem, ponieważ brak jest ADP. W warunkach beztlenowych mitochondria są w stanie 5. W warunkach dynamicznej równowagi w stanie 3 nośniki są w pośrednim stopniu zredukowane, przy czym stopień zredukowania maleje od nukleotydów nikotynamidoadeninowych do tlenu. Znacznie wyższy stopień redukcji nośników obserwuje się w stanie 4 (kontrolowanym), a w nieobecności tlenu nośniki są całkowicie zredukowane. Stan 3 i 4 oraz przejście jednego w drugi są ważne doświadczalnie.

4. Kontrola oddechowa

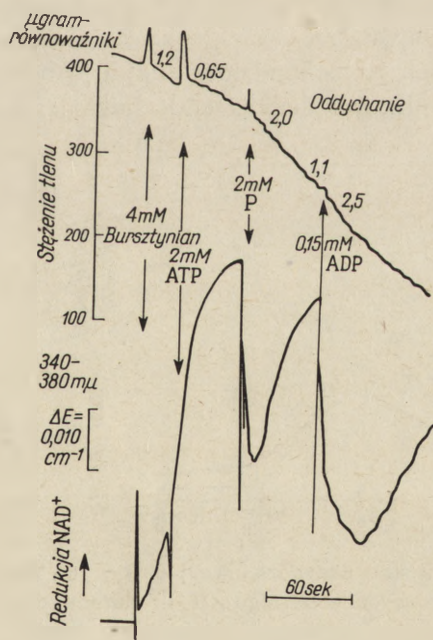
Zaobserwowana przez L a r d y ' e g o i W e l l m a n a (114) zależność szybkości oddychania od stężenia ADP została następnie szczegółowo zbadana przez C h a n c e ' a i W i l l i a m s a (43, 46), którzy regulację oddychania przez ADP (lub P) określili jako „kontrolę oddechową”. Zjawisko to tłumaczono jako nagromadzanie się w stanie kontrolowanym pośredników niezdolnych do transportu elektronów. Rozpad tych połączeń pod wpływem ADP i P lub czynników rozprzegających przywraca

oddychanie (17, 46). Obserwacje te skłoniły Chance'a (17) do zaproponowania mechanizmu regulacji opartego na kinetyce reakcji.

Miarą kontroli oddechowej jest stosunek szybkości oddychania w stanie aktywnym (po dodaniu ADP) do szybkości w stanie kontrolowanym gdy w wyniku wyczerpania ADP oddychanie zmalało. Ściśle sprzężone mitochondria mają bardzo wysoką kontrolę oddechową np. przy utlenianiu glutaminianu stosunek ten wynosi od 5 do 10 a przy utlenianiu bursztynianu od 3 do 4 (31). Mitochondria luźno sprzężone mają niewielką kontrolę oddechową lub zupełnie nie reagują na dodanie ADP. Nie ma jednak ścisłego związku ilościowego między kontrolą oddechową a stosunkiem P : O (120). Wysoka wartość kontroli oddechowej jest lepszym kryterium nienaruszalności struktury mitochondriów niż wysoki stosunek P : O (120).

Klingenberg wykazał, że również stężenie ATP może regulować oddychanie. Stwierdził on, że niską kontrolę oddechową w przypadku utleniania np. fosforanu glicerolu lub bursztynianu można zwiększyć dodając najpierw ATP, które częściowo przyhamowuje oddychanie (z równoczesnym zwiększeniem redukcji NAD^+) a następnie dodając ADP lub P (87, 96) (rysunek 4).

Na tej podstawie Klingenberg uważa (87, 90, 96, 97), że kontrola oddechowa ma charakter termodynamiczny, tzn. w mitochondriach utrzymuje się równowaga dynamiczna pomiędzy równowagą oksydoredukcyjną składników łańcucha oddechowego a tzw. „potencjałem fosforylacyjnym” tj.



Rys. 4. Wpływ ATP na kontrolę oddechową i redukcję NAD^+ (96)
Liczby nad krzywą zapisu polarograficznego wyrażają szybkość oddychania w μgramat ach tlenu na sekundę

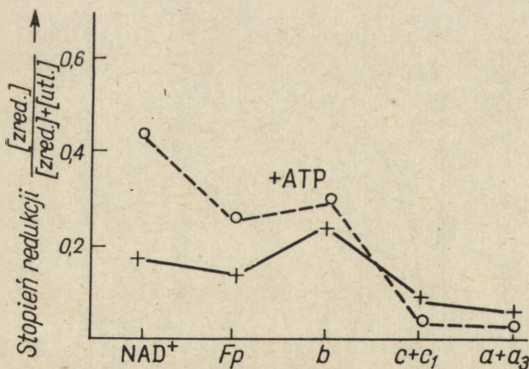
stosunkiem $[ATP]/[ADP]$ [P]. Stąd też wynika jego pogląd, że kontrola oddechowa jest ważnym fizjologicznym przykładem odwracalności oksydacyjnej fosforylacji.

5. Wpływ ATP na stan oksydoredukcyjny składników łańcucha oddechowego

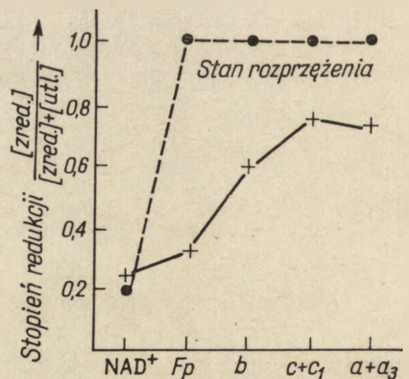
Badania stopnia redukcji poszczególnych składników łańcucha w różnych stanach metabolicznych okazały się pomocne w zrozumieniu równowagi oksydoredukcyjnej w całym łańcuchu uwarunkowanej ATP. Rysunek 5 przedstawia wpływ ATP na stan oksydoredukcyjny składników łańcucha. W nieobecności ATP stopień redukcji składników łańcucha spada tylko nieznacznie od NAD^+ do cytochromu *a*. Pod wpływem ATP, tj. przy częściowym zahamowaniu oddychania, stopień zredukowania składników maleje dość wyraźnie od NAD^+ do cytochromu *a* (zstępujący typ gradientu).

Inny obraz obserwuje się gdy oddychanie jest zahamowane (np. w obecności -CN lub w warunkach beztlenowych). Wówczas w obecności ATP i substratu utleniającego NADH (rysunek 6) łańcuch oddechowy zostaje „otwarty” dla przyjęcia równoważników redukcyjnych przez substrat. W tych warunkach składniki łańcucha wykazują wstępujący gradient zredukowania tym większy im niższe jest stężenie ATP. W doświadczeniach tego typu wykazano między innymi odwrócony transport elektronów w rejonie enzymów flawinowych i cytochromów z wyjątkiem cytochromu a_3 (22, 23, 99, 102).

Metaboliczny stan mitochondriów znajduje odbicie w stanie oksydoredukcyjnym składników łańcucha oddechowego. Jak widać z rysunku 7

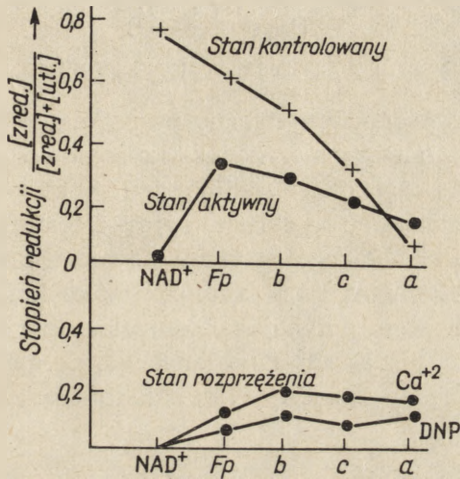


Rys. 5. Wpływ ATP na stan oksydoredukcyjny składników łańcucha oddechowego (101) Mitochondria wątroby szczura utleniające α -glicero fosforan

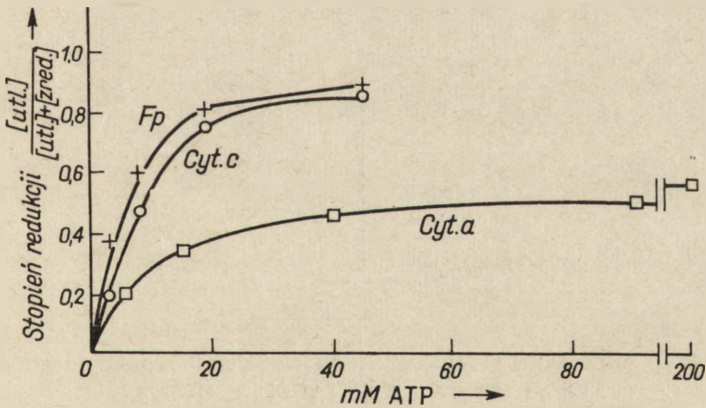


Rys. 6. Wpływ ATP na stan oksydoredukcyjny składników łańcucha w układzie „zamkniętym” (cyjankiem) mitochondriów wątroby szczura (102). Jako akceptora elektronów użyto szczawiooctanu

w stanie rozprężonym obserwuje się gradient wstępujący, natomiast zarówno w stanie kontrolowanym jak i aktywnym — zstępujący (12, 94). Według Klingenberga i Schollmeyera (98) zstępujący gradient zarówno w stanie aktywnym jak i w stanie kontrolowanym dowodzi, że w obu stanach o kontroli oddechowej i stanie oksydoredukcyjnym łań-



Rys. 7. Stopień zredukowania składników łańcucha oddechowego w różnych stanach metabolicznych mitochondriów mięśni skrzydłowych owadów utleniających α -glicerofosforan (94)



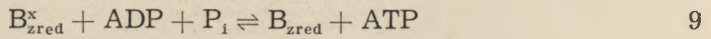
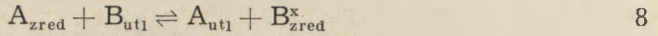
Rys. 8. Wpływ stężenia ATP na stopień utlenienia cyt. a, cyt. c i flawoproteidów w mitochondriach wątroby (102)

Oddychanie zahamowane cyjankiem, wobec szczawiooctanu jako akceptora elektronów

cucha oddechowego decyduje ten sam mechanizm uwarunkowany stężeniem ATP, przy czym jak widać z rysunku 8 do utlenienia cytochromu a potrzeba znacznie więcej energii w postaci ATP niż do utlenienia flawoproteidu i cytochromu c (102). Tak więc równowaga oksydoredukcyjna całego łańcucha oddechowego zależy od stężenia ATP.

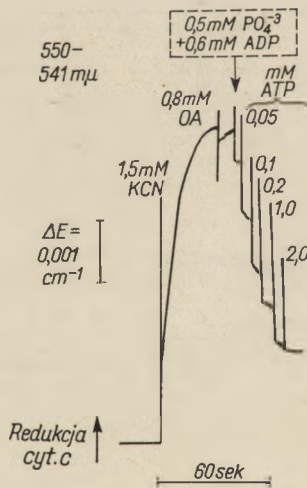
6. Stan oksydoredukcyjny cytochromu c jako funkcja potencjału fosforylacyjnego

Odwracalność oksydacyjnej fosforylacji opiera się na uwarunkowanej udzialem energii reakcji oksydoredukcyjnej między dwoma składnikami łańcucha oddechowego A i B. W tej złożonej reakcji można wyróżnić dwie reakcje podstawowe: oksydoredukcyjną i przeniesienie energii:



gdzie B^x — oznacza wysokoenergetyczny pośrednik.

Według Klingenberga i Schollmeyera (90, 98, 102) istnieją dwa rodzaje równowagi: oksydoredukcyjna, w której składniki reakcji mają jednakowy potencjał oksydoredukcyjny i fosforylacyjna, w której składniki łańcucha oddechowego są w równowadze z układem nukleotydów adeninowych. Zdaniem tych autorów w reakcji fosforylacji B_{zred}^x wytworzony pod wpływem potencjału fosforylacyjnego tak przesuwa potencjał oksydoredukcyjny składników łańcucha, że ustala się równowaga oksydoredukcyjna między sąsiadującymi składnikami.



Rys. 9. Przykład oznaczania zależności stanu oksydoredukcyjnego cytochromu c od ilorazu $[ATP]/[ADP][P]$ (102)

Mitochondria wątroby szczura, zahamowane cyjankiem oddechanie wobec szczawiooctanu OA jako akceptora elektronów

Teoretycznie zależność stanu oksydoredukcyjnego cytochromu c od stężenia ATP wyraża równanie:

$$\frac{B_{zred} + B_{zred}^x}{B_{utl}} = \frac{A_{zred}}{A_{utl}} \cdot K_1 \left[1 + K_2 \frac{[ADP][P]}{[ATP]} \right] \quad 10$$

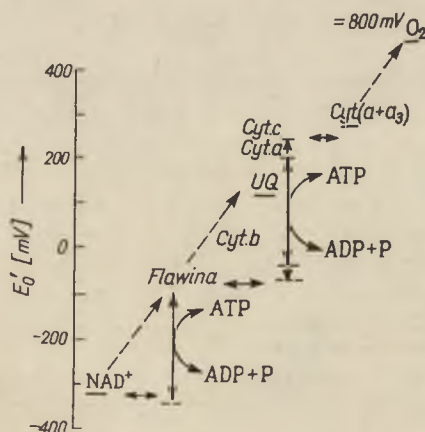
gdzie: $K_1 = \frac{A_{utl} \cdot B_{zred}^x}{A_{zred} \cdot B_{utl}}$, $K_2 = \frac{B_{zred} \cdot [ATP]}{B_{zred}^x \cdot [ADP] \cdot [P]}$

Doświadczalnie badano wpływ ATP w obecności P i ADP na stan oksydoredukcyjny cytochromu c w sposób zilustrowany na rysunku 9.

Stwierdzono, że zależność między stosunkiem cyt. $c_{zred}/\text{cyt. } c_{utl}$, a odwrotnością stężenia ATP wyraża się prostą, której nachylenie wzrasta ze stężeniem ADP. Te fakty, zgodne z teoretycznie wyprowadzonym równaniem stały się podstawą poglądu o istnieniu równowagi opartej na odwracalności oksydacyjnej fosforylacji.

Na podstawie stałej równowagi K_2 wyliczonej ze stosunku $[\text{ATP}]/[\text{ADP}][\text{P}]$, przy którym obserwuje się połowę maksymalnego utlenienia cytochromu c ($B_{zred}/B_{zred}^x = 1$), Klingenberg (88) obliczył wolną energię wysokoenergetycznego pośrednika $G'_0 = 12,8$ kcal, która odpowiada różnicy potencjału oksydoredukcyjnego 280mV. Jeśli potencjał oksydoredukcyjny składnika oddechowego zmieni się o tę wartość, możliwa staje się równowaga oksydoredukcyjna między cytochromem c i flawoproteidem oraz między flawoproteidem a NAD^+ . Pozwala to przypuszczać, że przeniesienie 2 elektronów z cytochromu c na NAD^+ będzie wymagać wkładu energetycznego odpowiadającego 2 molom ATP (schemat 1).

Jak dotąd nie udało się jednak wykazać odwracalności oksydacyjnej fosforylacji w rejonie oksydazy cytochromowej. Przyczyną tego jest prawdopodobnie nie tylko duża różnica potencjału oksydoredukcyjnego między cytochromem c (lub a), a tlenem ($E'_0 = 420\text{—}520\text{mV}$ (90)), do pokonania której potrzebna jest energia dwu cząsteczek ATP, ale także brak układu enzymatycznego, powodującego rozbitcie cząsteczki wody w celu dostarczenia równoważników redukcyjnych, analogicznie jak w fotolizie wody w procesie fotosyntezy.



Schemat 1. Równowaga oksydoredukcyjna i fosforylacyjna w łańcuchu oddechowym wg Klingenberga (90, 102)

Składniki łańcucha oddechowego umieszczono zgodnie z ich normalnym potencjałem (pH 7). Strzałki poziome ↔ oznaczają zmiany równowagi oksydoredukcyjnej, strzałki pionowe ↕ — zmiany równowagi fosforylacyjnej. Linia przerywana oznacza nieodwracalny transport elektronów po rozprzęgnięciu oksydacyjnej fosforylacji

III. Metodyka badań

1. Materiał doświadczalny

Jednym z podstawowych warunków wykazania odwracalności przenoszenia elektronów i energii był odpowiedni dobór materiału doświadczalnego. Początkowo reakcje tego typu badano w całych mitochondriach, później zastosowano również preparaty submitochondrialne. Tablica I zawiera wykaz preparatów mitochondrialnych stosowanych w tych badaniach.

Tablica 1

Preparaty mitochondrialne stosowane w badaniach nad odwracalnością reakcji przenoszenia elektronów i energii

Preparat		Pochodzenie	Uwagi	Literatura
Mitochondria		Serce gołębia	szczególnie reagują na ADP i P	31
		Serce gołębia	poddane 24 godz. starzeniu	20,30, 84
		Serce królika		154
		Serce szczura	pozbawione ES*	32, 33, 34, 133, 134
		Serce wołu		99
		Mięśnie piersiowe gołębia	poddane starzeniu	99
		Mięśnie szkieletowe szczura		96
		Mięśnie skrzydłowe owadów		23, 34, 94 96, 98
		Nerka świnki morskiej		105
		Wątroba szczura	pozbawione ES	31, 34, 167
	Wątroba szczura	pozbawione ES	4, 7	
Cząstki submitochondrialne	przenoszące elektrony (ETP)	Serce wołu	brak NAD ⁺	125, 126, 143
	preparowane wg Keilina i Hartree		brak NAD ⁺	72
	digitoninowe	Serce gołębia		29
	digitoninowe	Serce wołu		29
	digitoninowe	Wątroba szczura	niska zawartość ES	23, 31, 118

* endogenne substraty

Szczególnie niepożądaną jest obecność w mitochondriach endogennych substratów, ponieważ są one źródłem zarówno elektronów przenoszonych w kierunku tlenu, jak i wysokoenergetycznych pośredników. Niektóre typy preparatów charakteryzują się bardzo małą zawartością endogennych substratów. Należą do nich mitochondria serca królika (154), nerki świnki

morskiej (34, 105), mięśni szkieletowych szczura (96), mięśni skrzydłowych owadów i serca gołębia (31, 36). Te ostatnie okazały się najbardziej odpowiednie (31), gdyż cechuje je znaczna kontrola oddechowa, wysoka wydajność fosforylacji i duża zawartość enzymów oddechowych, co ułatwia śledzenie zmian cytochromów, UQ i nukleotydów. Niska zawartość endogennych substratów ułatwia badanie specyfiki substratowej. Poza tym mitochondria serca gołębia nie zawierają NADP^+ a w obecności substratów zachowują zdolność do fosforylacji nawet po 1—2 dniach „starzenia” w warunkach aerobowych.

Natomiast mitochondria wątroby szczura zawierają znaczne ilości endogennych substratów (100). Zawartość NADP^+ w tym materiale przeważa nad NAD^+ , odwrotnie niż w mitochondriach serca szczura (105) i nerki świnki morskiej (34, 108). Redukcja NADP^+ nie tylko towarzyszy redukcji NAD^+ (12, 34, 70), ale jest od niej wydajniejsza (31, 103, 105). Wynika to zapewne z dużej zawartości dehydrogenazy glutaminianowej (5⁰% białka mitochondrialnego) (34), która w mitochondriach reaguje wg Klingenberg (104) z NADP^+ a nie NAD^+ . Różne typy preparatów submitochondrialnych posiadają mało endogennych substratów i nie zawierają NAD^+ .

2. Eliminowanie wpływu endogennych substratów

W niektórych badaniach sam dobór materiału nie wystarcza i konieczne jest hamowanie utleniania endogennych substratów odpowiednimi inhibitorami, bądź stosowanie czynników, które uniemożliwiają tworzenie lub wykorzystanie wysokoenergetycznych pośredników.

Utlenianie endogennych substratów można hamować malonianem (31, 96) lub arseninem (154). Skuteczność arseninu zależy prawdopodobnie od pochodzenia mitochondriów. W mitochondriach serca królika, zawierających niewiele endogennych substratów, arsenin był skutecznym inhibitorem (154), natomiast w mitochondriach szczura okazał się niewystarczający (85). Inhibitor ten został z powodzeniem użyty dla zahamowania redukcji NAD^+ przez aldehyd betainy powstający w wyniku redukcji NAD^+ przez cholinę w odwróconym transporcie elektronów (156).

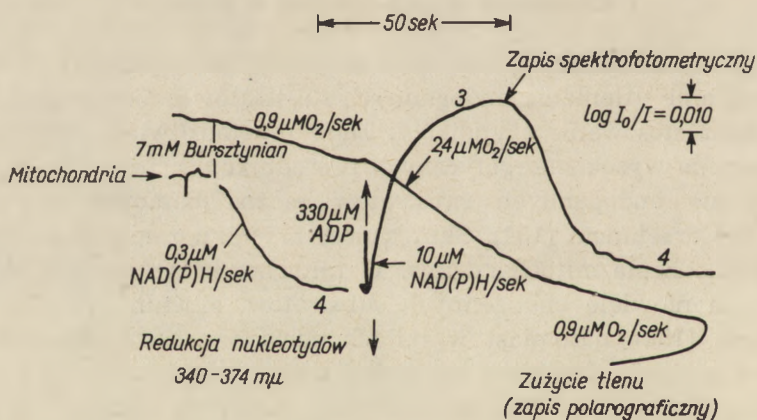
W celu usunięcia wysokoenergetycznych pośredników inkubuje się mitochondria z czynnikami rozprzegającymi — arsenianem, 2,4-dwunitrofenolem lub dwukumarolem (33), bądź też stosuje się preinkubację mitochondriów (97), starzenie (20) lub zmianę ich stanu metabolicznego (35). Inkubacja z czynnikami rozprzegającymi zmniejsza utlenianie bursztynianu, które jest znacznie aktywowane przez ATP (4). Arsenian jest wprawdzie w porównaniu z DNP słabym czynnikiem rozprzegającym (23), skutecznie pozbawia jednak mitochondria wysokoenergetycznych pośredników. Starzenie preparatów mięśni piersiowych gołębia (31, 36) rów-

niez mniejsza utlenianie bursztynianu, a ich 24-godzinna inkubacja w warunkach tlenowych usuwa zarówno endogenne substraty jak i wysokoenergetyczne pośredniki.

3. Oznaczanie zmian oksydoredukcyjnych składników łańcucha oddechowego

W badaniach nad odwracalnością łańcucha oddechowego niezwykle użyteczną okazała się aparatura opracowana przez Chance'a. Jest to połączenie spektrofotometru umożliwiającego pomiary absorpcji przy dwu długościach fal (tzw. *double-beam*) (14, 15), fluorymetru do pomiarów fluorescencji przy jednej długości fali (48) i urządzenia do polarograficznych pomiarów zużycia tlenu z zastosowaniem wibrującej elektrody platynowej (45). Wszystkie trzy pomiary wykonywane równocześnie w tej samej kiuwecie są automatycznie rejestrowane, co umożliwia śledzenie współzależności zmian. Aparat ten pozwala mierzyć zmiany absorpcji z dokładnością do 10^{-4} i śledzić zmiany zachodzące w czasie krótszym niż jedna minuta.

Rysunek 10 jest przykładem doświadczenia, w którym stosując opisaną aparaturę równocześnie śledzono zmiany dwu czynników — spektrofotometrycznie redukcję i utlenianie nukleotydów nikotynamidoadeninowych i polarograficznie zużycie tlenu.



Rys. 10. Równoczesne zużycie tlenu i redukcja nukleotydów nikotynamidoadeninowych przez mitochondria wątroby (34)

Wzrost krzywej zapisu spektrofotometrycznego wyraża utlenianie NADH, spadek — redukcję, oznaczane zwykle strzałką z podaniem kierunku zmian np. „ \uparrow — redukcja NADH”. Powolny wzrost krzywej w wyniku utlenienia NADH, charakterystyczny dla mitochondriów w stanie 1 jest spowodowany stopniowym wyczerpywaniem endogennych substratów. Dodanie 7 μmoli bursztynianu powoduje gwałtowny spadek krzywej odpowiadający powstawaniu NADH. Jednocześnie zapis elektrody platynowej wykazuje, że szybkość utleniania endogennego po dodaniu bursztynianu wzrasta tylko o $0,6 \mu\text{mola}/\text{sek}$ do $0,9 \mu\text{mola}/\text{sek}$ i pozostaje na tym poziomie w czasie redukcji nukleotydów do osiągnięcia po około 40 sek stanu 4 (kontrolowanego). Dodanie następnie ADP powoduje gwałtowne utlenianie NADH zarejestrowane jako wzrost krzywej zapisu spektrofotometrycznego. Jest to przejście ze stanu 4 do 3. Aktywność oddechowa wzrasta również do $2,4 \mu\text{mola O}_2/\text{sek}$ i utrzymuje się przez około 50 sek aż dodany ADP zostanie całkowicie ufosforylowany do ATP. W tym momencie aktywność oddechowa spada do wartości stanu 4 i dalsza redukcja nukleotydu nie następuje

Składniki łańcucha można oznaczać w ilościach katalitycznych (np. bezpośrednio oznaczanie spektrofotometryczne cytochromów) lub w ilościach substratowych po ich uprzedniej ekstrakcji (np. nukleotydy nikotynamidoadeninowe, UQ) oznaczając je następnie spektrofotometrycznie lub enzymatycznie.

W oznaczeniach spektrofotometrycznych poszczególnych składników łańcucha oddechowego mierzy się zwykle absorpcję przy długości fali odpowiadającej maksimum prążka α . W celu zmniejszenia interferencji innych składników pomiary odnosi się do absorpcji przy odpowiednio wybranej długości fali (15, 46, 93, 157) — por. tablica 2.

Tablica 2

Długości fal pomiaru i odniesienia w spektrofotometrycznych oznaczeniach składników łańcucha oddechowego w preparatach mitochondrialnych (15, 21, 46, 93, 94, 157)

Składnik	NADH i NADPH		UQ		Fp		b		c	a	a ₃
	*	**	*	**	*	**	*	**	*	*	*
Maksimum prążka α (m μ)	340	340	275	280	465	468	564	432	550	605	445
Długość fali odniesienia (m μ)	374	312 (380)	300	289	510	500	575	500	540	630 (590)	455

* — Długości fal stosowane przez Chance'a

** — Długości fal stosowane przez Klingenberga.

Cyfry w nawiasach oznaczają dodatkowe długości fali odniesienia.

NADH i *NADPH*. Oznaczenia spektrofotometryczne zredukowanych form nukleotydów przy 340m μ w odniesieniu do absorpcji przy 374m μ często uzupełnia się lub zastępuje oznaczeniem fluorymetrycznym. Wówczas do wzbudzenia fluorescencji stosuje się światło o długości fali 365 m μ , a emisję oznacza się przy 450 m μ . Oznaczenia fluorymetryczne są niezbędne w badaniach mitochondriów serca, zawierających związki silnie absorbujące w okolicy 320m μ . Interferowanie tych związków ujawnia się szczególnie w badaniach przejścia ze stanu 4 do 3 (27, 28, 105). Poza tym metoda fluorymetryczna jako bardziej czuła jest polecana wówczas, gdy mitochondria zostały częściowo pozbawione nukleotydów nikotynamidoadeninowych (33), gdy metodą chemiczną nie udaje się wykazać odpowiednich zmian (105) lub gdy znacznie większa w porównaniu z nukleotydami zawartość cytochromów utrudnia pomiar spektrofotometryczny (np. w mitochondriach mięśni skrzydłowych *Musca domestica*).

Flawiny. Zawartość i zmiany oksydoredukcyjne flawoproteidów oznacza się spektrofotometrycznie na podstawie spadku absorpcji towarzyszącego redukcji. Interferencja prążka Soreta cytochromu a₃ zmniejsza się,

jeśli absorpcję zmierzoną przy $455\text{m}\mu$ odnosi się do absorpcji przy $445\text{m}\mu$. Interferencję cytochromu *a* można zmniejszyć przyjmując falę odniesienia o długości $500\text{m}\mu$ lub $510\text{m}\mu$ (46). Oznaczanie zmian oksydoredukcyjnych flawin w mitochondriach jest mimo to utrudnione ze względu na obecność wielu związków interferujących.

Ubichinon (UQ). Bezpośrednie oznaczanie UQ w mitochondriach przy długości fali poniżej $300\text{m}\mu$ wymaga specjalnej techniki umożliwiającej zmniejszenie wpływu rozproszenia światła przez zawiesinę (18, 21, 26, 157). Stosuje się również oznaczanie UQ po uprzedniej ekstrakcji (26, 138a 157). Chance (21) oznaczał UQ przy długości fal $275\text{--}300\text{m}\mu$, co pozwalało uzyskać maksymalną różnicę ekstynkcji, a w przypadku równoczesnego powstawania w próbie NADH, uwzględniał poprawkę dla absorpcji NADH. Szarkowska i Klingenberg (157) polecają oznaczanie UQ przy długości fal $280\text{--}289\text{m}\mu$, gdyż NADH interferuje wówczas tylko w 15%, podczas gdy w metodzie Chance'a (21, 31) do 40%. Stosowanie mitochondriów serca (najlepiej serca gołębia) pozwala uniknąć wpływu NAD^+ (26). Interferującą absorpcję egzogenego ADP i ATP można ominąć wykorzystując endogenną syntezę ATP z ADP i fosforanu kreatyny pod wpływem mitochondrialnej kinazy kreatyny (92).

Cytochromy. Zmiany oksydoredukcyjne cytochromów są stosunkowo łatwiejsze do oznaczenia dzięki wyraźnym różnicom absorpcji form utlenionych i zredukowanych. Cytochromy *c* i *c*₁ łatwo odróżnia się spektrofotometrycznie od cytochromu *b* przy podanych w tablicy długościach fal. Cytochrom *c*₁ można po usunięciu cytochromu *c* oznaczać przy $554\text{--}540\text{m}\mu$. Przy oznaczaniu cytochromu *a* na podstawie prążka α przeszkadza niewielka absorpcja wywołana przez cytochrom *a*₃. Można ją usunąć stosując falę odniesienia o długości $590\text{m}\mu$ (46).

4. Stopień utlenienia i redukcji składników

Oznaczenie stopnia zmian oksydoredukcyjnych poszczególnych składników łańcucha oddechowego wymaga określenia stanu całkowitego ich utlenienia lub zredukowania. Wg Chance'a (23) nośniki można uważać za całkowicie utlenione jeśli po dodaniu amytału do zawiesiny mitochondriów w warunkach tlenowych nie obserwuje się utleniania nośników. Jako całkowicie zredukowane traktuje Chance nośniki w mitochondriach znajdujących się w warunkach beztlenowych w obecności glutamianu i bursztynianu. Nawet dodanie podsiarczynu nie powoduje wówczas wyższego stopnia redukcji.

W mitochondriach mięśni skrzydłowych owadów obserwowano największy stopień utleniania składników łańcucha bezpośrednio po utlenieniu endogennych substratów, natomiast cytochromy były najbardziej zredukowane po wyczerpaniu tlenu lub po rozprężeniu CaCl_2 (94). Stopień

zredukowania UQ zależy w znacznej mierze od rodzaju substratu. Jabłczan (w obecności KCN) redukuje UQ tylko w 50—70%, bursztynian zaś (w nieobecności inhibitora) nawet w 90% (157). Określenie stopnia zredukowania flawin utrudnia poza wspomnianą już interferencją innych związków również fakt, że nawet po zahamowaniu łańcucha część flawin nie jest zredukowana. Przyjmuje się więc umownie, że suma absorpcji po zahamowaniu antymycyną odpowiada całkowicie zredukowanej flawinie (93, 101).

Na podstawie pomiarów utlenienia i redukcji składników nie można jednak wnioskować o ich ilości. Odnosi się to zwłaszcza do nukleotydów nikotynamidoadeninowych, ponieważ oznaczenia chemiczne po wydzieleniu z mitochondriów dają wyższe wyniki niż oznaczenia spektrofotometryczne *in situ* (34). Chance (34) rozważa to zjawisko według dwu kryteriów — jakościowego i ilościowego. Wg pierwszego znaczne ilości NAD znajdujące w mitochondriach mogą pochodzić z utleniania NADH w czasie oznaczania albo też mitochondria mogą zawierać NAD, który w tych warunkach nie jest redukowany. Wówczas prawdziwe byłyby wyniki oznaczeń spektrofotometrycznych, zaś wnioszek (105), że w stanie 4 nukleotydy nikotynamidoadeninowe są nieznacznie redukowane byłby niesłuszny (34). Jeśli natomiast prawidłowe są wyniki uzyskiwane metodą chemiczną, to należałoby przyjąć, że część nukleotydów jest niedostępna dla enzymów oddechowych. Kryterium ilościowe opiera się na porównaniu szybkości utleniania i redukcji nukleotydów z szybkością przeniesienia elektronów przez łańcuch. Ta ostatnia znacznie się różni w stanie metabolicznym mitochondriów 4 i 3.

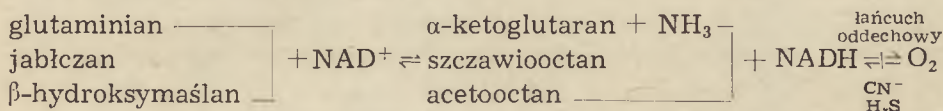
5. Warunki pomiarów odwracalności

Odwracalność oksydacyjnej fosforylacji badano w trzech podstawowych układach:

1) w układzie „otwartym”, tj. przy ciągłym przepływie elektronów z substratów na tlen;

2) w układzie „otwartym” dla jednego substratu, którego utlenienie dostarcza energii i „otwartym” dla drugiego substratu przekazującego równoważniki redukcyjne innemu substratowi o niższym potencjale oksydoredukcyjnym (w celu rozdzielenia obu układów hamuje się transport elektronów, najczęściej antymycyną);

3) w układzie, którego łańcuch oddechowy zahamowany inhibitorami jest „zamknięty” dla tlenu i „otwarty” dla przeniesienia wodoru w kierunku substratów utleniających NADH:



1. Odwracalność kosztem energii ATP

Odwracalność przepływu elektronów w układach I typu obserwowano zarówno podczas oddychania jak i wtedy gdy było ono zahamowane. Aby wykazać odwracalność podczas oddychania stężenie egzogenego ATP nie może przewyższać stężeń wysokoenergetycznych pośredników (23). Usuwanie tych pośredników czynnikami rozprzegającymi nie jest jednak wskazane, ponieważ mogłyby one hydrolizować również dodany ATP (23, 33). W tym przypadku celowe jest używanie preparatów mitochondrialnych nie zawierających endogennych substratów, a więc niezdolnych do wytwarzania znacznych ilości wysokoenergetycznych pośredników. W tabelicy 3 zestawiono stosowane w tych warunkach donory wodoru, przy czym akceptorem elektronów był w tych wszystkich przypadkach wewnątrz mitochondrialny NAD^+ .

Tabela 3

Donory elektronów stosowane w badaniach odwracalności kierunku przenoszenia elektronów kosztem energii ATP w warunkach tlenowych.

Donor	Mitochondria	Literatura
Bursztynian	serca	7, 19, 20, 21, 22, 24, 30, 31, 35, 36, 37, 40, 41, 49, 87, 105
Bursztynian	nerek	21, 32, 105
Bursztynian	mięśni szkieletowych	87
Bursztynian	wątroby	33, 37, 105
Bursztynian	mózgu	105
α -glicerofosforan	mięśni szkieletowych	87, 101
α -glicerofosforan	mięśni skrzydłowych	12, 87, 94, 105
Kapronian	serca	87

Badanie odwracalności przepływu elektronów jest łatwiejsze w warunkach, w których oddychanie jest uniemożliwione (23, 95, 104). Zahamowany przepływ elektronów w kierunku tlenu nie utrudnia obserwacji procesu odwrotnego (95, 104). Zahamowanie oddychania nie tylko hamuje powstawanie wysokoenergetycznych pośredników, ale nawet prowadzi do ich gwałtownej hydrolizy (23). Jako donory elektronów stosowano w doświadczeniach substraty endogenne, lub substraty łańcucha oddechowego. W tabelicy 4 zestawiono donory i akceptory elektronów stosowane w tych warunkach.

Próbowano też uzyskać odwrócenie kierunku przenoszenia elektronów kosztem energii innych nukleotydów niż ATP i stwierdzono, że GTP,

UTP, ITP ani CTP nie powodują znacznej redukcji nukleotydów nikotynamidoadeninowych, co wskazywałoby na specyficzność działania ATP w tym procesie (24, 124, 125, 126).

T a b l i c a 4

Donory i akceptory elektronów stosowane w badaniach odwracalności kierunku przenoszenia elektronów kosztem energii ATP w warunkach beztlenowych

Donor	Akceptor	Typ preparatu*	Literatura
Bursztynian	endogeny NAD ⁺	mit. serca	22, 23, 24, 35, 37
	endogeny NAD ⁺	mit. wątroby	37, 156
	egzogenny NAD ⁺	cz. submit. serca	77, 78, 79, 80, 81, 124, 125, 126, 142, 143
	α -ketoglutaran + NH ₃	mit. wątroby	88, 98, 100, 102, 104, 151, 152, 160
	szczawiooctan acetooctan	mit. wątroby mit. wątroby	88, 98, 100, 102 88, 95, 98, 100, 102
Cholina	endogeny NAD ⁺	mit. wątroby	156
Sarkozyna	endogeny NAD ⁺	mit. wątroby	156
Askorbinian + TMPD	egzogenny NAD	cz. submit. serca	123, 126
Askorbinian + PMS	egzogenny NAD ⁺	cz. submit. serca	126
Askorbinian + UQ ₁	egzogenny NAD ⁺	cz. submit. serca	140, 143
Askorbinian + witamina K ₃	egzogenny NAD ⁺	cz. submit. serca	140, 143
Egzogeny cytochrom <i>c</i>	egzogenny NAD ⁺	cz. submit. serca	116
	endogeny NAD	cz. digitoninowe mit. serca	29
	endogeny NAD ⁺	mit. mózgu	23
	endogeny NAD	mit. wątroby	24
	egzogenny NAD ⁺	mit. mięśni skrzydłowych	23
Endogeny cytochrom <i>c</i>	endogeny NAD ⁺	mit. serca	22, 23, 24, 37
	egzogenny NAD ⁺	mit. wątroby	23, 37, 100
	endogeny NAD ⁺	cz. digitoninowe mit. wątroby	23
	endogeny NAD ⁺	cz. digitoninowe mit. serca	23, 29
Endogeny cytochrom $\alpha + \alpha_3$ Flawoproteid	endogeny NAD ⁺	mit. serca	151
	endogeny NAD ⁺	mit. serca	22, 23

* mit. = mitochondria

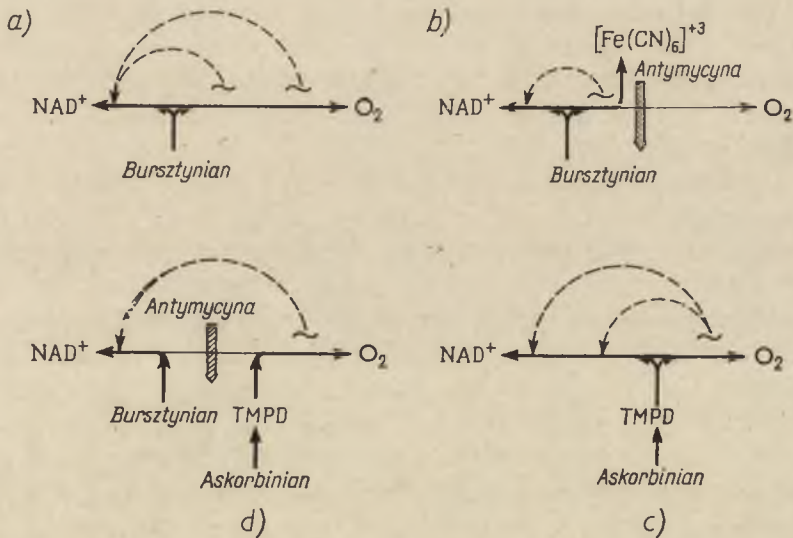
cz. submit. = cząstki submitochondrialne

2. Odwracalność kosztem energii wysokoenergetycznych pośredników

Ten typ odwracalności polega na wykorzystaniu wysokoenergetycznych pośredników wytwarzanych w jednym odcinku łańcucha oddechowego do odwrócenia kierunku przenoszenia w innym odcinku. W ten sposób badano wykorzystanie wysokoenergetycznych pośredników:

a) wytwarzanych w II i III miejscu oksydacyjnej fosforylacji — do odwrócenia kierunku przenoszenia elektronów w odcinku łańcucha oddechowego obejmującym I miejsce syntezy ATP; np. redukcję NAD^+ (bez lub w obecności metabolitu utleniającego NADH) przez bursztynian (3, 8, 22, 34, 39, 56, 57, 58, 59, 62, 64, 87, 95, 96, 98, 101, 103, 105, 150, 151, 152, 153, 154, 159, 160), α -glicerofosforan (87, 96, 98, 101, 103, 105) lub cholinę (9), sprzężoną z aerobowym utlenianiem tych substratów (schemat 3a),

b) wytwarzanych w II miejscu oksydacyjnej fosforylacji — do odwrócenia kierunku przenoszenia elektronów w odcinku związanym z I miejscem syntezy ATP, np. redukcję NAD^+ lub acetoocetanu przez bursztynian sprzężoną z utlenianiem tego substratu przez żelazocyjanek (56, 57) (schemat 3b),



Schemat 3. Wykorzystanie wysokoenergetycznych pośredników do odwracania kierunku przenoszenia elektronów na poszczególnych odcinkach łańcucha oddechowego wg Slatera (148) z uzupełnieniem autorów — schemat b

c) wytwarzanych w końcowym odcinku łańcucha oddechowego — do odwrócenia kierunku przenoszenia elektronów w odcinku obejmującym dwa pierwsze miejsca oksydacyjnej fosforylacji, np. redukcję NAD^+ lub α -ketoglutaranu (+ NH_3) przez układ askorbinian + TMPD (128, 129, 130, 133, 134, 150, 161, 162) (schemat 3c),

d) wytwarzanych w końcowym odcinku łańcucha oddechowego — do odwrócenia kierunku przenoszenia elektronów w odcinku obejmującym I miejsce syntezy ATP, np. redukcję NAD^+ (α -ketoglutaranu + NH_3) przez bursztynian (130, 131, 133, 151, 161, 162) lub askorbinian + TMPD (132) sprzężoną z aerobowym utlenianiem askorbinianu + TMPD w obecności antymycyny A (schemat 3d).

3. Redukcja substratów o potencjale niższym niż donor

Badania odwracalności przepływu elektronów były oparte w większości przypadków na pomiarze redukcji endogennego NAD^+ mitochondriów jako końcowego akceptora wodoru. W tych warunkach obserwowany wzrost stężenia NADH mógłby być miarą raczej zakłócenia stanu równowagi niż wzrostu ilości zredukowanego NAD^+ wywołanego badanym substratem. Zastosowanie substratów o niższym potencjale, utleniających nieprzerwanie powstający NADH, pozwoliło na znaczne przesunięcie równowagi, co w dużym stopniu ułatwiło badanie tego procesu. Obserwacje tego rodzaju przeprowadzone na mitochondriach wątroby szczura (szczególnie bogatych w dehydrogenazy redukujące te substraty), zarówno w warunkach beztlenowych kosztem energii ATP (59, 88, 95, 98, 100, 102, 104) jak i w warunkach tlenowych kosztem wysokoenergetycznych pośredników wytwarzanych w II i III (56, 58, 59, 95, 151, 152, 160) lub tylko w III miejscu oksydacyjnej fosforylacji w łańcuchu oddechowym (151, 152, 160).

a) *Redukcja acetoctanu.* Szczególnie dużo sporów wywołały badania nad redukcją acetoctanu przez bursztynian. Er n s t e r i w s p. (56, 57) stwierdzili, że reakcja ta katalizowana przez izolowane mitochondria jest wrażliwa na amytal i DNP i na tej podstawie wnioskowali, że redukcja acetoctanu przez bursztynian jest wynikiem odwrócenia kierunku przenoszenia elektronów z bursztynianu do acetoctanu. Natomiast K r e b s i w s p. (106, 110, 111) prowadząc badania na homogenatach tkankowych zaobserwowali, że reakcja redukcji acetoctanu przez bursztynian jest stymulowana amytalem, a przy niskich stężeniach DNP szybkość jej prawie nie ulega zmianie. Stąd wnioskowali, że proces ten nie jest wynikiem przenoszenia elektronów przez łańcuch oddechowy, lecz reakcji dysmutacji. Według Krebsa i w s p. NAD^+ jest redukowany przez produkty utleniania bursztynianu np. jabłczan, pirogronian, izocytrynian lub α -ketoglutaran. Ponieważ droga przenoszenia elektronów z bursztynianu i NADH w kierunku tlenu jest wspólna na odcinku cytochromowym, elektrony pochodzące z bursztynianu mogłyby blokować transport elektronów z NADH. W wyniku tego zredukowane nukleotydy nikotynamidoadeninowe mogłyby być wykorzystywane do redukcji acetoctanu.

Sprzeczności między interpretacjami tych dwóch autorów, a zwłaszcza niezrozumiały brak wrażliwości procesu katalizowanego przez homogenaty

tkankowe na amytal i DNP zostały wyjaśnione w oparciu o doświadczenia, w których badano wpływ supernatantu otrzymanego po odwirowaniu mitochondriów na mitochondrialną redukcję acetoctanu przez bursztynian (58). Dane doświadczalne przedstawione w tablicy 5 wskazują, że reakcja redukcji hamowana amytalem w izolowanych mitochondriach, jest stymulowana przez ten związek po dodaniu supernatantu.

Tablica 5

Wpływ supernatantu na zahamowaną amytalem redukcję acetoctanu przez bursztynian (58)

Układ	Amytal	Zredukowany acetoctan (μ mole)	Zużycie tlenu (μ gramo-równoważniki)
Mitochondria	—	1,9	5,1
Mitochondria	+	0,2	5,3
Mitochondria + Supernatant	—	1,9	10,6
Mitochondria + Supernatant	+	2,3	10,4

W oparciu o otrzymane wyniki Ernster wnioskował, że we frakcji supernatantu znajduje się substrat, być może szczególnie aktywny w obecności bursztynianu, powodujący redukcję acetoctanu do β -hydroksymasłanu. Substratem tym mogłyby być pirogronian, produkt cytoplazmatycznej glikolizy.

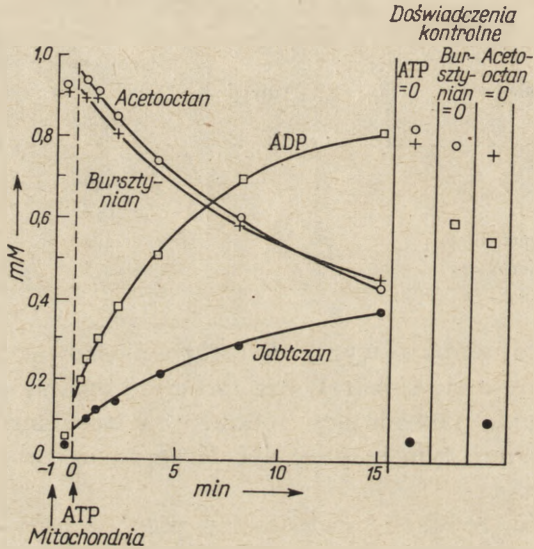
Niewrażliwość redukcji acetoctanu przez bursztynian na amytal i DNP zauważono również w doświadczeniach z izolowanymi mitochondriami (108). A z z o n e i wsp. (8) wykazali jednak, że zjawisko to jest prawdopodobnie związane z brakiem kontroli oddechowej stosowanych preparatów. Fakt ten podkreślany również przez A v i - D o r a i wsp. (3) wskazuje na znaczenie nienaruszalności struktury mitochondriów przy ustalaniu, która droga redukcji NAD^+ (acetoctanu) przez bursztynian jest bardziej prawdopodobna.

Za poglądem, że bursztynian jest bezpośrednim źródłem elektronów dla redukcji NAD^+ przemawiają obserwacje dotyczące drogi przenoszenia znakowanego wodoru z bursztynianu na NAD^+ (69, 76) oraz spostrzeżenia, że ilość NAD^+ zredukowanego przez bursztynian jest 3—4 razy większa niż ilość NAD^+ zredukowanego przez substraty utleniane przy udziale NAD^+ (105). Szczególnie przekonujących dowodów dostarczyli K l i n g e n b e r g i v. H a e f e n (89, 95). Wykazali oni (rysunek 11), że podczas redukcji acetoctanu przez bursztynian w warunkach beztlenowych kosztem energii ATP ilości utlenionego bursztynianu i zredukowanego acetoctanu są równoważne.

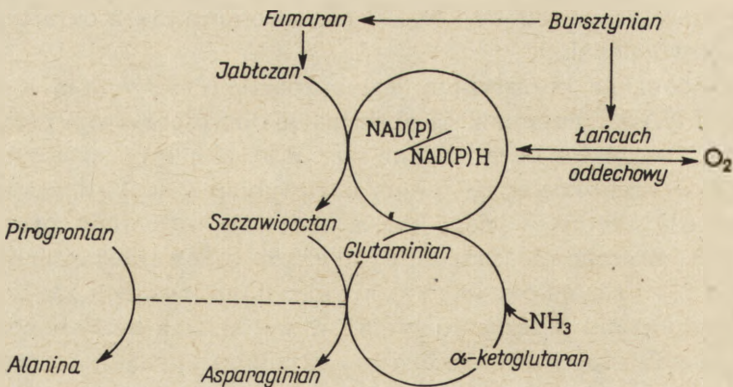
Ponadto stwierdzili, że głównym produktem utleniania bursztynianu jest jabłczan, wytwarzany również w ilościach stechiometrycznych. Ob-

serwowany równocześnie większy, niż wynikałoby to z rozważań teoretycznych, ubytek ATP (mierzony powstawaniem ADP) wyjaśniły doświadczenia kontrolne przeprowadzone w nieobecności acetoocetanu lub bursztynianu. Powstawanie w tych warunkach ADP wskazuje na hydrolizę ATP w wyniku działania innych reakcji, niż odwracanie kierunku przenoszenia elektronów.

b) *Redukcja α -ketoglutaranu (+ NH_3)*. Użycie α -ketoglutaranu + NH_3 jako końcowego akceptora elektronów pozwoliło śledzić w mitochondriach

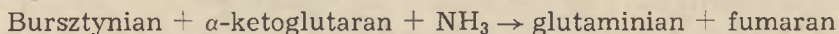


Rys. 11. Bilans substratowy reakcji redukcji acetoocetanu przez bursztynian w warunkach beztlenowych pod wpływem ATP (95)



Schemat 4. Synteza aminokwasów z ketokwasów i amoniaku przy udziale odwróconego transportu wodoru (104)

syntezę glutaminianu drogą redukcijnej aminacji katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową:



Włączanie NH_3 przy pomocy tego enzymu jest uzależnione od donorów wodoru. Stwierdzono, że ilość włączanego NH_3 jest największa wówczas, gdy donorami są bursztynian lub jabłczan (104, 151, 159). Badania prowadzono w obecności arseninu celem uniemożliwienia utleniania α -ketoglutaranu (104, 151, 159, 160). W reakcjach transaminacji następujących po redukcijnej aminacji wytwarzane są inne aminokwasy. Kolejność ich powstawania ilustruje schemat 4.

Redukcja α -ketoglutaranu ($+ \text{NH}_3$) może być wynikiem przenoszenia elektronów z bursztynianu (104, 151, 159, 160), TMPD (151, 152, 162) czy jabłczanu (104, 151, 159) kosztem energii ATP lub wysokoenergetycznych pośredników.

V. Udział składników łańcucha oddechowego w procesie odwrócenia kierunku przenoszenia elektronów

Najmniej wyjaśniona i najbardziej dyskusyjna jest droga przenoszenia elektronów z bursztynianu na NAD^+ . Ustalono, że w redukcji NAD^+ przez bursztynian bierze udział dehydrogenaza bursztynianowa i dehydrogenaza NADH . Nie ma jednak pewności co do drogi przenoszenia elektronów między tymi dwoma flawoproteidami — czy oddziaływanie między enzymami jest bezpośrednie, czy też pośredniczą w reakcji dodatkowe nośniki: UQ i cytochrom *b*.

W badaniu tego zagadnienia duże znaczenie miało zastosowanie inhibitorów łańcucha oddechowego: amytału, rotenonu, TTA (4,4,4-trójfluoro-1-(2-tiofeno)-1,2-butan-1,3-dion), a w szczególności antymycyny.

1. Cytochrom *b*

Na udział cytochromu *b* w redukcji NAD^+ wskazywały badania Chance'a i Hollungera (33). Wykazali oni, że antymycyna A hamuje redukcję NAD^+ przez bursztynian. Ponieważ antymycyna A działa między cytochromem *b* i c_1 (46, 65), a poza tym wg sugestii Chance'a i Williamsa (46) inhibitor ten może łączyć się ze zredukowanym cytochromem *b*, nie wydawało się prawdopodobne utlenienie cytochromu *b* ani przez cytochrom c_1 ani przez dehydrogenazę NADH . Ponadto stwierdzono (23, 77, 78, 80), że dodanie ATP do zawiesiny mitochondriów, których oddychanie było zahamowane Na_2S , powodowało redukcję NAD^+ i cytochromu *b*, podczas gdy cytochromy *c* i *a* pozostawały w formie utlenionej. Obserwacje te przyjęto za dowód, że cytochrom *b* jest

nośnikiem elektronów między dehydrogenazą bursztynianową, a dehydrogenazą NADH.

Sugestiom tym przeczyły jednak wyniki doświadczeń Lōwa i wsp. (124, 125, 126) wskazujące, że antymycyna A w ilości wystarczającej do całkowitego zahamowania oksydazy bursztynianowej (0,17 μ g na mg białka) nie wpływa na ilość zredukowanego NAD⁺ przez bursztynian. Zastosowanie antymycyny A w ilościach 20-krotnie wyższych niż trzeba do zahamowania redukcji NAD⁺ przez układ askorbinian + TMPD (123), powodowało częściowe zahamowanie redukcji NAD⁺ przez bursztynian. Podobne wyniki otrzymali inni autorzy (56, 57, 131, 140, 143, 160). Ponieważ badania Estabrooka (67) wykazały, że ilość moli antymycyny A konieczna do zahamowania oksydazy bursztynianowej w mitochondriach wątroby szczura odpowiada około 1/3 ilości moli obecnego w nich cytochromu b wydawało się prawdopodobne, że antymycyna A działa na żelazo niehemowe, zgodnie z wcześniejszymi sugestiami Tappela (163). Jeżeli zatem działanie antymycyny A polegałoby na chelatowaniu niehemowego żelaza związanego z kompleksem cytochrom b-c₁, wówczas wg Ernster'a (61) duża ilość antymycyny mogłaby oddziaływać również z żelazem niehemowym związanym z dehydrogenazami NADH i bursztynianową hamując proces redukcji NAD⁺ przez bursztynian. Lōw i wsp. (125) natomiast tłumaczą nieznaczne hamowanie tego procesu przez antymycynę A jej działaniem rozprzegającym, na które proces odwracania kierunku przenoszenia elektronów jest szczególnie wrażliwy (92).

Przeciwno udziałowi cytochromu b w reakcji przenoszenia elektronów z bursztynianu na NAD⁺ przemawiają również wyniki Ernster'a i wsp. (64). Autorzy ci zauważyli znaczny spadek szybkości redukcji acetoctanu przez bursztynian i towarzyszący jej równoczesny wzrost pobierania tlenu w obecności katalitycznych ilości witaminy K₃ (menadionu) odbierającej elektrony z wrażliwego na dwukumarol flawoproteidu — DT-diaforazy (63). Wykazano już wcześniej, że DT-diaforaza w obecności witaminy K₃ przenosi elektrony z nukleotydów nikotynamidoadeninowych na cytochrom b (50). Jeżeli zatem elektrony z dehydrogenazy bursztynianowej wchodziłyby do łańcucha oddechowego na poziomie cytochromu b, wówczas przeniesienie elektronów z NADH na cytochrom b przy udziale DT-diaforazy i witaminy K₃ nie mogłoby zmniejszać ilości zredukowanego acetoctanu przez bursztynian, bowiem elektrony z NADH musiałyby wchodzić do łańcucha oddechowego w tym samym miejscu i mogłyby być przenoszone ponownie w kierunku NAD⁺. Ponieważ jednak w obecności witaminy K₃ obserwowano spadek szybkości redukcji acetoctanu, Ernster i wsp. (64) wyciągnęli stąd wniosek, że wejście elektronów z dehydrogenazy bursztynianowej do łańcucha oddechowego jest zlokalizowane po stronie substratowej cytochromu b oraz, że cytochrom b nie znajduje się na drodze elektronów z bursztynianu do NAD⁺. Sanadi (141) natomiast tłumaczy obniżenie szybkości redukcji aceto-

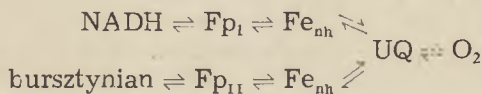
octanu przez bursztynian w opisanych warunkach rozprzegającym działaniem menadionu, ponieważ związek ten hamuje w warunkach beztlenowych redukcję NAD^+ przez bursztynian kosztem energii ATP (169).

Ostatnie badania Tylera i wsp. (166) wskazują, że ilość cytochromu *b* zredukowana w nienaruszonych mitochondriach serca jest taka sama bez względu na to czy donorem elektronów jest askorbinian + TMPD, czy bursztynian. Natomiast w obecności antymycyny A autorzy ci obserwowali redukcję tylko połowy tej ilości cytochromu *b* jaką bursztynian zredukował w warunkach beztlenowych (165). Te obserwacje wydawałyby się popierać sugestie Chance'a (23) i Hommesa (79), że cytochrom *b* jest pośrednikiem przenoszenia elektronów z bursztynianu na NAD^+ .

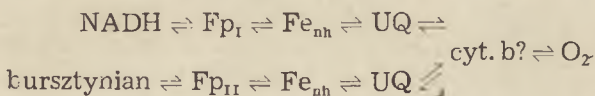
Ostateczne ustalenie czy cytochrom *b* jest elektronowym nośnikiem podczas redukcji NAD^+ przez bursztynian jest w dużym stopniu zależne od ustalenia roli UQ w łańcuchu oddechowym oraz w procesie odwrócenia kierunku przenoszenia elektronów.

2. Ubichinon

Po raz pierwszy na udział UQ w procesie odwróconego transportu elektronów zwrócił uwagę Chance (21, 22) badając redukcję NAD^+ przez bursztynian. Następnie Sanadi i wsp. (143) oraz Penefsky (133, 134) wykazali, że UQ jest nośnikiem elektronów również podczas redukcji NAD^+ przez askorbinian + TMPD. Szybkość redukcji UQ w procesie odwracania kierunku transportu elektronów jest według Chance'a (21) oraz Klingenberga i Krögera (92) taka sama, jak szybkość redukcji NAD^+ , natomiast według Penefsky'ego jest trzy razy większa (134). Löw i wsp. (125) stwierdzili, że TTA (inhibitor oksydoreduktazy bursztynian: UQ) (170) i amytal hamują przenoszenie elektronów z bursztynianu, natomiast antymycyna i NQNO (w stężeniach hamujących transport elektronów w kierunku tlenu) nie wpływają na tę reakcję i przyjęli na tej podstawie, że elektrony z bursztynianu na NAD^+ przenoszone są poprzez UQ jako wspólny pośrednik łączący obydwie dehydrogenazy, zgodnie ze schematem proponowanym przez Hatfielda i wsp. (73):



Przestrzenne rozmieszczenie UQ w mitochondriach obserwowane przez Szarkowską i Klingenberga (157) wskazywałoby na możliwość połączenia dehydrogenaz poprzez oddzielne przedziały UQ z cytochromem *b* jako punktem wspólnym:



Według obserwacji Szarkowskiej i Klingenberg'a (157), UQ jest redukowany w szerokich granicach tylko przez bursztynian (w przeciwieństwie do substratów utlenianych przy udziale NAD^+), a stopień jego redukcji zwiększa się w mitochondriach ściślej sprzężonych. Te wyniki wskazują, że redukcja UQ przez bursztynian (podobnie jak redukcja NAD^+) zależy od sprawności fosforylacyjnej mitochondriów. Zależność ta nie jest jasna ze względu na zbliżony potencjał oksydoredukcyjny obu związków. Według Szarkowskiej (155) jest ona, być może, wyrazem zapotrzebowania energii dla przezwyciężenia barier stworzonych przez kompartmentację. Zebrane dotychczas dowody nie pozwalają na ostateczne stwierdzenie, czy w przeniesieniu elektronów pośredniczy cytochrom b. Wydaje się, że antymycyna A nie hamuje tego przeniesienia (157).

VI. Odwracalność przenoszenia energii

Badania mechanizmu odwracalności kierunku przenoszenia elektronów w łańcuchu oddechowym zmierzały do ustalenia 1) czy odwróconemu przeniesieniu elektronów kosztem energii ATP towarzyszy odwrócenie oksydacyjnej fosforylacji, 2) jakiego rodzaju wysokoenergetyczne pośredniki są wykorzystywane gdy energia jest dostarczana podczas przenoszenia elektronów od substratu do tlenu. Odpowiedzi na obydwa pytania uzyskano po zbadaniu wpływu oligomycyny na proces odwracania (tablica 6).

Wyniki przedstawione w tablicy wskazują, że oligomycyna hamuje odwrócenie kierunku przenoszenia elektronów przebiegające kosztem energii ATP, natomiast nie hamuje odwrócenia zachodzącego kosztem

Tablica 6

Wpływ oligomycyny i DNP na redukcję acetoocetanu przez bursztynian w warunkach beztlenowych pod wpływem ATP i w warunkach tlenowych kosztem wysokoenergetycznych pośredników wytwarzanych podczas utleniania bursztynianu (8, 64, 95)

Warunki	Dodatki	Pobieranie tlenu ($\mu\text{gramorównoważniki}$)	Redukcja acetoocetanu (μmole)
Betzlenowe			4,1
	+ Oligomycyna		0,3
	+ DNP		0,2
Tlenowe	+ Oligomycyna	9,8	4,7
		9,1	5,7
	+ DNP	36,0	18,9
		50,8	1,4

energii pośredników. Brak redukcji acetoctanu w obecności DNP potwierdza endoergiczny charakter procesu.

Brak zahamowania przez oligomycynę sugerował, że energia wytwarzana podczas utleniania substratów oddechowych, a wymagana dla odwrócenia kierunku, pochodzi najprawdopodobniej z nieufosforylowanych wysokoenergetycznych pośredników lub uogólniając — przenoszenie i wykorzystywanie pośredników w mitochondriach może przebiegać bez udziału reakcji fosforylacji w ścisłym słowa tego znaczeniu. Doświadczalnych dowodów na potwierdzenie tej sugestii dostarczyli w tym samym czasie *Ernster* (56, 57, 59) i w laboratorium *Slatera S noswell* (153, 154). Wykazali oni, że redukcja NAD^+ przez bursztynian przebiega ze stałą szybkością w obecności akceptora fosforanu w mitochondriach, których oddychanie było ograniczone brakiem endogennego fosforanu. Wyniki otrzymane przez *S noswella* (154) przedstawia tablica 7.

Tablica 7

Wpływ usunięcia fosforanu na redukcję mitochondrialnego NAD^+ przez bursztynian (154)

Warunki	NAD^+	NADH
	μmole/mg białka	
Świeże mitochondria	8,9	0,9
Świeże mitochondria + oligomycyna + bursztynian	4,5	2,7
Mitochondria pozbawione fosforanu + oligomycyna + bursztynian	3,6	2,4
Mitochondria pozbawione fosforanu + oligomycyna + bursztynian + fosforan	4,6	1,9

Wykorzystywanie energii nieufosforylowanych pośredników do odwracania kierunku przenoszenia elektronów potwierdziły wyniki badań nad wpływem arsenianu na szybkość tego procesu. *S noswell* (154) i *Ernster* (59) stwierdzili, że arsenian hamuje redukcję NAD^+ przez bursztynian i że oligomycyna znosi to zahamowanie w przeciwieństwie do hamowania DNP. Potwierdza to równocześnie sugestie (66, 87) odnośnie miejsca działania oligomycyny w stosunku do miejsca działania arsenianu i DNP.

Odwracalność kierunku przenoszenia elektronów kosztem wysokoenergetycznych pośredników wytwarzanych w „otwartym” łańcuchu oddechowym obserwowano do niedawna tylko w nienaruszonych mitochondriach i fosforylujących cząstkach submitochondrialnych. Wykorzystywanie wysokoenergetycznych pośredników do procesów wymagających energii, np. redukcji NADP^+ przez NADH nie tylko w cząstkach submitochondrialnych (52, 53, 54, 117), ale nawet w niefosforylujących preparatach (118) sugerowało możliwość wykorzystywania energii tych pośredników

również w odwracaniu kierunku przenoszenia elektronów w niefosforylujących cząstkach submitochondrialnych. Przypuszczenia te potwierdził w roku 1964 H a s (72), badając preparaty z mięśnia sercowego. Wykazał on, że w obecności ATP bursztynian nie redukuje egzogenego NAD^+ , natomiast gdy źródłem energii są wysokoenergetyczne pośredniki powstające podczas utleniania askorbinianu + TMPD (w obecności antymycyny) NAD^+ jest redukowany szczególnie intensywnie w obecności oligomycyny. Wskazuje to, że w preparacie są wytwarzane wysokoenergetyczne pośredniki wykorzystywane w procesach wymagających energii, ale ich energia nie może być przekształcona w energię ATP.

Reakcję odwracania kierunku przenoszenia elektronów wykorzystali S a n a d i (1, 2, 140, 143) oraz R a c k e r (135, 137, 138) do badania aktywności czynników sprzęgających.

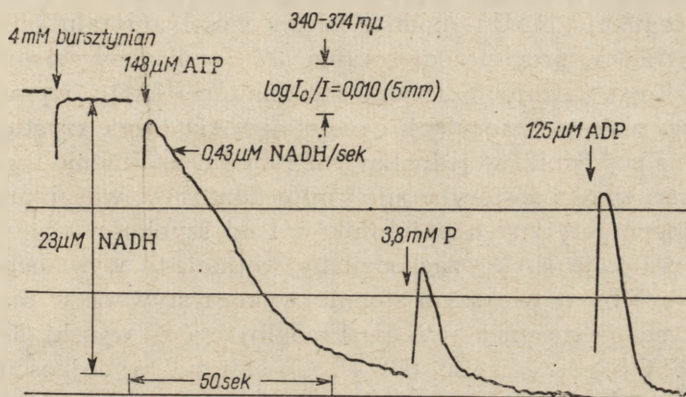
Wpływ jonów Mg^{++} . Jony Mg^{++} hamują proces odwracania kierunku przenoszenia elektronów kosztem ATP w nienaruszonych mitochondriach i digitoninowych cząstkach submitochondrialnych (24, 95, 102). Natomiast w cząstkach submitochondrialnych otrzymanych przy pomocy ultradźwięków obecność Mg^{++} jest warunkiem procesu odwrócenia (124). Mechanizm tego zjawiska nie został wyjaśniony. C h a n c e (25) oraz K l i n g e n b e r g i v o n H a e f e n (95) są zdania, że jony Mg^{++} działają hamująco, ponieważ kompleksują ATP, co obniża potencjał fosforylacyjny (36, 102). C h a n c e (25) uważa ponadto, że układ enzymatyczny cząstek submitochondrialnych w przeciwieństwie do mitochondriów, może oddziaływać ze związanym ATP, co tłumaczyłoby odmienne działanie jonów Mg^{++} w obu rodzajach preparatów. E r n s t e r (61) natomiast przypuszcza, że w reakcji ATP z enzymem transfosforylującym tworzy się trwały kompleks enzym-Mg z ADP, który nagromadza się w nienaruszonych mitochondriach oraz w cząstkach digitoninowych; w cząstkach submitochondrialnych otrzymanych w wyniku działania ultradźwiękami, ADP byłby tylko luźno związany w kompleksie. Taki sposób tłumaczenia mógłby również wyjaśnić fakt, że jony Mg^{++} hamując proces odwracania oksydacyjnej fosforylacji nie wpływają na reakcję wymiany $\text{ATP} \rightarrow \text{P}$ (59).

VII. Stechiometria

Dalsze badania mechanizmu odwracalności kierunku przenoszenia elektronów zmierzały do ustalenia zależności między ilością zredukowanych nukleotydów nikotynamidoadeninowych a ilością wysokoenergetycznych pośredników koniecznych do redukcji. Wielkość stosunku \sim/NADH oznaczano z ilości katalitycznych (pomiaru redukcji wewnątrzmitochondrialnego NAD^+) lub z ilości substratowych stosując metabolity utleniające wytwarzany NADH.

1. Oznaczanie stosunku \sim /NADH z ilości katalitycznych

Badania tego rodzaju prowadzono głównie w pracowni Chance'a (19, 33, 37, 40, 41, 49). Ilość związków wysokoenergetycznych koniecznych dla zredukowania jednej cząsteczki NAD^+ ustalano na podstawie pomiarów ilości hydrolizowanego ATP.



Rys. 12. Oznaczanie stosunku \sim /NADH spektrofotometrycznie metodą Chance'a (20) Ilość ADP wytworzonego z ATP oblicza się przez porównanie powierzchni pod krzywą obrazującą zmiany absorpcji NAD^+ po dodaniu fosforanu z powierzchnią pod krzywą otrzymaną po dodaniu znanych ilości ADP. W tym przypadku ilość ADP wynosi 61 μmoli . Ponieważ, jak widać z zapisu spektrofotometrycznego dodanie ATP indukowało utworzenie 23 μmoli NADH, zatem stosunek \sim /NADH wynosi 2,7

Chance i Hollunger (37, 19) mierzyli ilości ADP wytwarzanego z ATP metodą zilustrowaną na rysunku 12. Oznaczanie stosunku tą metodą wymaga jednak spełnienia następujących warunków: 1) mitochondria powinny być pozbawione endogennych wysokoenergetycznych pośredników, 2) bursztynian nie może bez dodania ATP powodować redukcji nukleotydów nikotynamidoadeninowych, 3) badania muszą być prowadzone na mitochondriach ściśle sprzężonych. Gdy te wszystkie warunki były spełnione wartości stosunku \sim /NADH wahały się od 1,8—2,7, natomiast gdy stosowano mitochondria poddane starzeniu otrzymywano wartości w zakresie od 4,4—5,4. Ponieważ Chance i Hollunger nie uwzględniali poprawek dla ATP zużywanego w innych reakcjach niż redukcja NAD^+ , otrzymane przez nich wartości są prawdopodobnie zbyt wysokie (64, 88, 96, 152).

Obliczali oni również wielkość stosunku \sim /NADH na podstawie zmian oksydoredukcyjnych cytochromu *a* w obecności azydku. W takim układzie po dodaniu bursztynianu następowała redukcja NAD^+ a równocześnie cytochrom *a* był utleniany i redukowany. Zmiany oksydoredukcyjne cytochromu *a* spowodowane wykorzystywaniem związków wysokoenergetycznych do redukcji obserwowano również po dodaniu ADP. Wielkość po-

wierzchni pod krzywą obrazującą redukcję cytochromu *a* w czasie jest miarą ilości elektronów przenoszonych przez łańcuch oddechowy w kierunku tlenu (pobierania tlenu) i jest proporcjonalna do ilości dodanego ADP. Dlatego można z niej wyliczyć ilość związków wysokoenergetycznych wykorzystywanych do redukcji NAD^+ przez bursztynian. Stosunek \sim/NADH otrzymany tą metodą wynosił 2,5. Po uwzględnieniu poprawki na wykorzystanie związków wysokoenergetycznych także w innych reakcjach niż redukcja NAD^+ (pomiar w obecności amytału eliminującego redukcję NAD^+ w procesie odwracania (37)) wyliczony stosunek obniżył się do 1,7. Tego rodzaju obliczanie stosunku \sim/NADH wymaga jednak założenia, że reakcje fosforylacji i redukcji NAD^+ wykorzystują wysokoenergetyczne pośredniki w jednakowym stopniu. Spełnienie tego założenia zależy od sprawności fosforylacyjnej mitochondriów, warunkującej trwałość wysokoenergetycznych pośredników i od szybkości obydwu reakcji. Jeżeli np. redukcja NAD^+ zachodziłaby wolniej, to wysokoenergetyczne pośredniki byłyby w większym stopniu wykorzystywane w reakcji fosforylacji i uzyskany stosunek \sim/NADH mógłby być za wysoki (64).

Ostatnio *Chance* i wsp. (40, 41, 49) obliczali wydajność reakcji odwracania na podstawie pomiaru ilości rozkładanego ATP zmianą *pH*. Stosunek \sim/NADH otrzymany w takich warunkach wynosił 2,8. Ponieważ jednak szybkość hydrolizy wzrastała tylko dwukrotnie po dodaniu bursztynianu, *Chance* (49) przyjął, że połowa rozkładanego ATP jest zużywana do redukcji NAD^+ i doszedł do wniosku, że na zredukowanie 1 mola NAD^+ konieczne jest 1,4 mola ATP.

2. Obliczanie stosunku \sim/NADH z ilości substratowych

Wydawało się, że zastosowanie akceptorów wodoru utleniających nieprzerwanie powstający NADH pozwoli na dokładniejsze obliczenie stosunku \sim/NADH z uwagi na operowanie ilościami substratowymi oznaczanych metabolitów.

Metodę tego rodzaju zastosował *Ernster* (56, 57) mierząc wzrost oddychania po dodaniu acetoctanu do mitochondriów utleniających bursztynian w nieobecności akceptora fosforanu i porównując tę wartość z ilością zredukowanego acetoctanu. Oznaczył on stosunek \sim/NADH jako równy jedności. Stosunek wyliczono zakładając, że 1) aerobowe utlenianie bursztynianu jest sprzężone z wytwarzaniem dwóch związków wysokoenergetycznych na każdy atom pobranego tlenu, 2) redukcja acetoctanu przez bursztynian zachodzi wyłącznie kosztem związków wysokoenergetycznych wytwarzanych podczas utleniania bursztynianu, a nie pod wpływem jabłczanu powstającego z bursztynianu, 3) szybkość oddychania preparatu bez acetoctanu, do której odnoszono wzrost wywołany acetoctanem nie zmienia się w czasie doświadczenia. Rozważania *Slatera* podważają jednak słuszność tych założeń (152).

Ernster zastosował zatem do badania wydajności procesu odwracania inną metodę, która nie wymaga przyjmowania żadnych założeń (64). Polega ona na porównaniu ilości redukowanego acetoctanu z pobieraniem fosforanu w warunkach, kiedy wzrost oddychania wywoływano dodaniem ATP, glukozy i niewielkich ilości heksokinazy. Otrzymana wartość \sim/NADH wynosiła 1,19, co potwierdza, że redukcja 1 cząsteczki NAD^+ przez bursztynian wymaga dostarczenia 1 wiązania wysokoenergetycznego.

Niezależnie od Ernster'a, Slater i Tager (152) doszli do takiego samego wniosku badając redukcję α -ketoglutaranu ($+\text{NH}_3$). Według nich ilość wysokoenergetycznych pośredników wykorzystywanych do przeprowadzenia syntezy glutaminianu odpowiada zmniejszeniu syntezy ATP (mierzonej ilością tworzonego glukozo-6-fosforanu) po dodaniu α -ketoglutaranu i NH_3 . Zależność tę wyraża stosunek $-\Delta\sim/\Delta\text{glu}$, w którym Δ wylicza się z różnicy między ilością glukozo-6-fosforanu wytworzoną w obecności i nieobecności α -ketoglutaranu $+\text{NH}_3$. Stosunek ten oznaczano jako bliski jedności również wtedy, gdy energia do redukcji NAD^+ przez bursztynian była dostarczona przez utlenienie askorbinianu $+\text{TMPD}$ w obecności antymycyny (162).

Klingenberg (91) wykorzystał do oznaczania stosunku \sim/NADH proces włączania amoniaku do mitochondrialnych aminokwasów. Porównując ilości hydrolizowanego ATP z ilością syntetyzowanego glutaminianu i asparagianu wykazał on zużywanie 0,6—1,2 mola NH_3 w obecności bursztynianu. Obniżenie wartości stosunku $\sim/\Delta\text{NH}_3$ tłumaczy Klingenberg istnieniem ubocznych reakcji włączania NH_3 , przebiegających przy udziale jabłczanu wytwarzanego z bursztynianu. Reakcje te mają mniejsze wymagania energetyczne niż badane reakcje przebiegające przy udziale bursztynianu. Sugestia ta jest zgodna z wnioskiem Slater'a i Tager'a (152, 158), że w obecności jabłczanu na każdą cząsteczkę zużywanego związku wysokoenergetycznego, syntetyzuje się kilka cząsteczek aminokwasów.

Próbowano również oznaczać stosunek \sim/NADH podczas odwracania kierunku przenoszenia elektronów na odcinku łańcucha oddechowego obejmującego więcej niż jedno miejsce oksydacyjnej fosforylacji. Löw i wsp. (126) stwierdzili, że ilość hydrolizowanego ATP jest dwukrotnie większa przy zastosowaniu askorbinianu $+\text{TMPD}$ jako układu redukującego NAD^+ , niż w przypadku użycia bursztynianu. Obserwacja ta potwierdza, że wartość stosunku \sim/NADH dla redukcji NAD^+ przez bursztynian jest równa jedności, natomiast dla redukcji NAD^+ przez askorbinian $+\text{TMPD}$ wynosi 2.

VIII. Uwagi końcowe

Przedstawione tutaj zagadnienia związane z odwracalnością oksydacyjnej fosforylacji i wynikające z niej odwrócenie transportu elektronów

można rozpatrywać z dwóch punktów widzenia: 1) nowych danych dotyczących mechanizmu oksydacyjnej fosforylacji, oraz 2) znaczenia odwracalności tych reakcji w ogólnym metabolizmie komórki i powszechności tego zjawiska.

1. Mechanizm i nowe fakty

O ile początkowo wnioski o odwróconym transporcie elektronów oparte tylko na podstawie spektrofotometrycznych pomiarów stanu równowagi składników łańcucha oddechowego mogły budzić wątpliwości, to dalsze badania Ernster'a, Klingenberg'a i Slater'a nad redukcją szczawiooctanu, α -ketoglutaranu (+ NH_3), acetoctanu i egzogenego NAD^+ są przekonującym dowodem istnienia odwracalności oksydacyjnej fosforylacji.

Stwierdzenie, że w łańcuchu oddechowym elektrony są przenoszone również w kierunku substratów pozwoliło postulować (121) istnienie dwóch łańcuchów — utleniającego, który dostarcza energii w postaci ATP i wysokoenergetycznych pośredników, oraz redukującego, który wykorzystując ich energię biegnie w kierunku przeciwnym. W warunkach fizjologicznych istotne znaczenie dla metabolizmu komórki ma prawdopodobnie tylko odwrócony transport elektronów z UQ, który gromadząc równoważniki elektronowe z szeregu mitochondrialnych flawoproteidów, może przekazywać je na NAD^+ i substraty utleniające NADH.

Przyjęty obecnie pogląd o szybkości oddychania i odwracalności oksydacyjnej fosforylacji uwarunkowanych potencjałem fosforylacyjnym, poprzedziło szereg obserwacji odnośnie wpływu ATP jako czynnika biorącego udział w: a) redukcji NAD^+ przez substraty flawoproteidów (bursztynian, α -glicerofosforan, cholina) i sztuczne donory elektronów np. askorbinian + TMPD, b) indukowanej przez ATP kontroli oddechowej i hamowanie oddychania przez ATP, c) stanie oksydoredukcyjnym składników łańcucha oddechowego — od NAD^+ do cytochromu *a* włącznie, d) stanie oksydoredukcyjnym składników łańcucha oddechowego w obecności substratów utleniających NADH w mitochondriach z zahamowanym oddychaniem.

Dla poznania mechanizmu oksydacyjnej fosforylacji za niezwykle cenne należy uznać stwierdzenie istnienia i wykazanie roli wysokoenergetycznych pośredników w wielu reakcjach związanych z przenoszeniem energii (również w roślinach 10, 127a). Ich powstawanie w obecności oligomycyny, gdy synteza ATP jest uniemożliwiona oraz w nieobecności fosforanu dowodzą, że nieufosforylowane wysokoenergetyczne pośredniki oksydacyjnej fosforylacji mogą spełniać funkcje przypisywane dotąd wyłącznie ATP. Biorą one również udział we włączaniu aminokwasów do białka w mitochondriach i pobieraniu jonów. Co więcej, pośredniki te są tworzone nawet w preparatach mitochondrialnych, w których w wyniku zniszczenia struktury nie zachodzi oksydacyjna fosforylacja i synteza

ATP. Zdaniem Slatera (148) ATP można obecnie uważać za mitochondrialny fosfagen, natomiast hipotetyczne dotychczas pośredniki oksydacyjnej fosforylacji umieścić na piedestale zajmowanym przedtem przez ATP. Jest to niewątpliwie jedno z największych osiągnięć w tej dziedzinie biochemii.

2. Odwracalność oksydacyjnej fosforylacji a metabolizm komórki

Rozpatrując odwracalność oksydacyjnej fosforylacji na poziomie komórki nasuwają się dwa pytania: a) jak ważny ilościowo jest ten proces, b) czy jest to proces zachodzący w różnych organizmach?

Szybkość odwrotnego transportu elektronów zależy od stanu metabolicznego mitochondriów. W stanie kontrolowanym jest tego samego rzędu jak przeniesienie elektronów w kierunku tlenu. Odpowiada to około 10% szybkości utleniania w stanie aktywnym (33) zarówno w pomiarach ilości katalitycznych jak i substratowych np. dla redukcji acetoctanu (95). Utlenianie cytochromu c (w układzie zamkniętym) indukowane przez ATP jest równie szybkie jak w układzie otwartym (90), chociaż wcześniejsze doświadczenia Chance'a (31) wykazywały, że stanowi ono tylko 5% szybkości utleniania w układzie otwartym.

W tkankach roślinnych i drobnoustrojach odwrócony transport elektronów aktywowany ATP może być zdaniem Chance'a (23) bardziej ściśle związany z fotosyntezą niż się zwykle uważa. Tak np. w organizmach fotosyntetyzujących utlenianie cytochromów pod wpływem światła i redukcja nukleotydów jest analogiczna do utleniania cytochromu c w tkankach zwierzęcych pod wpływem ATP. Najlepszym jednak przykładem odwróconego transportu elektronów jest fosforylacja fotosyntetyczna (74) (por. artykuł Lassoty 115a), w której NADP^+ jest redukowany wbrew potencjałowi oksydoredukcyjnemu, pod wpływem energii świetlnej. Energia ta umożliwia również wytwarzanie wysokoenergetycznych pośredników do przeprowadzenia fosforylacji redukcyjnej (75).

Wpływ odwracalności oksydacyjnej fosforylacji na metabolizm obrazuje redukcja acetoctanu do β -hydroksymaślanu w wyniku odwróconego transportu elektronów. Klingenberg i Haefen (95) uważają, że stosunek β -hydroksymaślanu do acetoctanu jest odbiciem stosunku NADH/NAD^+ , a ten z kolei jest miarą potencjału fosforylacyjnego. Autorzy ci sugerują, że układ β -hydroksymaślan/acetoctan w charakterystyczny sposób odzwierciedla potencjał fosforylacyjny i jest „chemicznym messengerem” między mitochondriami wątroby, a krwiobiegiem. Porównują go więc do układu mleczan/pirogronian, który jest wyrazem równowagi fosforylacyjnej glikolizy.

Potwierdzeniem fizjologicznego charakteru odwracalności oksydacyjnej fosforylacji są badania przy użyciu całych komórek (42) oraz skrawków tkankowych (47, 139).

Ostatnio Krebs (107a) wyraził pogląd, że jeżeli nawet odwracalność oksydacyjnej fosforylacji w tkankach zwierzęcych nie jest zbyt wydajnym mechanizmem dla tworzenia NADH, to jednak może być bardzo pożyteczna dla komórek umożliwiając w zasadzie 100%-owe wykorzystanie energii.

LITERATURA

1. Andreoli T. E., Lam K. W., Sanadi D. R., *J. Biol. Chem.* **240**, 2644 (1965).
2. Andreoli T. E., Pharo R. L., Sanadi D. R., *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 16 (1964).
3. Avi-Dor Y., Lamdin E., Kaplan N. O., *J. Biol. Chem.* **238**, 2518 (1963).
4. Azzone G. F., Ernster L., *Nature* **187**, 65 (1960).
5. Azzone G. F., Ernster L., *J. Biol. Chem.* **236**, 1510 (1961).
6. Azzone G. F., Ernster L., *J. Biol. Chem.* **236**, 1518 (1961).
7. Azzone G. F., Ernster L., Klingenberg M., *Nature* **188**, 552 (1961).
8. Azzone G. F., Ernster L., Weinbach E. C., *J. Biol. Chem.* **238**, 1825 (1963).
9. Bianchi G., F., *J. Biol. Chem.* **239**, 3947 (1964).
10. Bonner W. D., *Plant Physiol.* **39**, Suppl. 1x (1964).
11. Bryła J., Gardas A., *Post. Biochem.* **11**, 395 (1965).
12. Bücher Th., Klingenberg M., *Angew. Chem.* **70**, 552 (1958).
13. Burton K., Krebs H. A., *Biochem. J.* **54**, 94 (1953).
14. Chance B., *Rev. Sci. Instr.* **22**, 634 (1951).
15. Chance B., *Science* **120**, 767 (1954).
16. Chance B., w *The Enzymes: Units of Biological Structure and Function*, red. O. H. Gaebler, Academic Press, New York 1956, str. 347.
17. Chance B., Ciba Foundation Symposium on the Regulation of Cell Metabolism, J. and A. Churchill, Londyn 1959, str. 91.
18. Chance B., *Fed. Proc.* **19**, 39 (1960).
19. Chance B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 10 (1960).
20. Chance B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 6 (1960).
21. Chance B., Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport, J. and A. Churchill, London 1961, str. 327.
22. Chance B., Symp. Biological Structure and Function, red. T. W. Goodwin i O. Lindberg, tom II, Academic Press, New York 1961, str. 119.
23. Chance B., *J. Biol. Chem.* **236**, 1544 (1961).
24. Chance B., *J. Biol. Chem.* **236**, 1569 (1961).
25. Chance B., Johnson Foundation Colloquium on Energy-Linked Functions of Mitochondria red. B. Chance, Academic Press, New York 1963, str. 17 (dyskusja).
26. Chance B., w *Biochemistry of Quinones*, red. R. A. Morton, Academic Press, Londyn 1965, str. 459.
27. Chance B., Baltscheffsky H., *Biochem. J.* **63**, 283 (1958).
28. Chance B., Baltscheffsky H., *J. Biol. Chem.* **233**, 736 (1958).
29. Chance B., Fugmann U., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 317 (1961).
30. Chance B., Hagihara B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 1 (1960).
31. Chance B., Hagihara B., Vth International Congress of Biochemistry (Moscow 1961), tom V, red. E. C. Slater, Pergamon Press, London 1963, str. 3.
32. Chance B., Hollunger G., *Fed. Proc.* **16**, 163 (1957).
33. Chance B., Hollunger G., *Nature* **185**, 666 (1960).

34. Chance B., Hollunger G., *J. Biol. Chem.* **236**, 1534 (1961).
35. Chance B., Hollunger G., *J. Biol. Chem.* **236**, 1555 (1961).
36. Chance B., Hollunger G., *J. Biol. Chem.* **236**, 1562 (1961).
37. Chance B., Hollunger G., *J. Biol. Chem.* **236**, 1577 (1961).
38. Chance B., Hollunger G., *J. Biol. Chem.* **238**, 418 (1963).
39. Chance B., Hollunger G., *J. Biol. Chem.* **238**, 445 (1963).
40. Chance B., Ito T., *Nature* **195**, 150 (1962).
41. Chance B., Ito T., *J. Biol. Chem.* **238**, 1509 (1963).
42. Chance B., Maitra P. K., w *Control Mechanism in Respiration and Fermentation*, red. B. Wright, Ronald Press 1963, str. 307.
43. Chance B., Williams R. G., *Nature* **176**, 250 (1955).
44. Chance B., Williams R. G., *J. Biol. Chem.* **217**, 383 (1955).
45. Chance B., Williams R. G., *J. Biol. Chem.* **217**, 409 (1955).
46. Chance B., Williams R. G., *Adv. Enzymol.* **17**, 65 (1956).
47. Chance B., Colon P., Jobsis F., Schoener B., *Science* **137**, 499 (1962).
48. Chance B., Conrad H., Legallais V., Program and Abstr. Meeting of Biophys. Soc., Cambridge Mass. 1958, str. 44 (cyt. wg 32).
49. Chance B., Ito T., Maitra P. K., Oshino R., *J. Biol. Chem.* **238**, 1516 (1963).
50. Conover T., Ernster L., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 189 (1962).
51. Crane R. K., Lipmann F., *J. Biol. Chem.* **201**, 235 (1953).
52. Danielson L., Ernster L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 91 (1963).
53. Danielson L., Ernster L., Johnson Foundation Colloquium on Energy-Linked Functions of Mitochondria (Philadelphia 1963), red. B. Chance, Academic Press, New York 1963, str. 157.
54. Danielson L., Ernster L., *Biochem. Z.* **338**, 188 (1963).
55. Davis R. E., Krebs H. A., *Biochem. Soc. Symp.* **8**, 77 (1951).
56. Ernster L., Symp. Biological Structure and Function, red. T. W. Goodwin, O. Lindberg, tom II, Academic Press, New York 1961, str. 139.
57. Ernster L., Vth International Congress of Biochemistry (Moscow 1961) tom V, red. E. C. Slater, Pergamon Press, London 1963, str. 115.
58. Ernster L., *Nature* **193**, 1050 (1962).
59. Ernster L., Symp. Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle (Rottach-Egern 1962), Springer Verlag, Berlin 1963, str. 98.
60. Ernster L., Lee C. P., Janda S., w *Biochemistry of Mitochondria*, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak, Academic Press i PWN, Londyn-Warszawa, 1966, str. 29.
61. Ernster L., Lee C. P., *Ann. Rev. Biochem.* **33**, 729 (1964).
62. Ernster L., Dallner G., Azzone G. F., *J. Biol. Chem.* **238**, 1124 (1963).
63. Ernster L., Danielson L., Ljungren M., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 171 (1962).
64. Ernster L., Azzone G. F., Danielson L., Weinbach E. C., *J. Biol. Chem.* **238**, 1834 (1963).
65. Estabrook R. W., *J. Biol. Chem.* **227**, 1093 (1957).
66. Estabrook R. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 89 (1961).
67. Estabrook R. W., *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 236 (1962).
68. Frisell W. R., Cronin J. R., Mackiewicz G., w *Flavins and Flavoproteins* (Amsterdam 1965), red. E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 367.
69. Gawron O., Glaid A. J., Nobel S., Gan M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 432 (1964).
70. Glock G. E., Maclean P., *Biochem. J.* **61**, 381 (1955).

71. Guillory R. J., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **105**, 221 (1965).
72. Haas D. W., *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 543 (1964).
73. Hatefi Y., Haavik A. G., Griffiths D. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 447 (1961).
74. Hill R., Bonner W. D., w *Light and Life*, red. McElroy W. D., Glass B., Johns Hopkins Press, Baltimore 1961, str. 424. (cyt. wg (121)).
75. Hill R., Walker D. A., *Plant Physiol.* **34**, 240 (1959).
76. Hoberman H. D., Prosky L., Hempstead P. G., Arfin W. W., *Biochem. Biophys. Res. Com.* **17**, 490 (1964).
77. Hommes F. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 248 (1962).
78. Hommes F. A., *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 595 (1963).
79. Hommes F. A., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 173 (1963).
80. Hommes F. A., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 183 (1963).
81. Hommes F. A., Johnson Foundation Colloquium on Energy-Linked Functions of Mitochondria (Philadelphia 1963), red. B. Chance, Academic Press, New York 1963, str. 39.
82. Howland J. L., *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 665 (1963).
83. Huijing F., Slater E. C., *J. Biochem.* (Tokyo) **49**, 491 (1961).
84. Jones E. A., Gutfreund H., *Biochem. J.* **87**, 639 (1963).
85. Kaniuga Z., Bryła J., *Bull. Acad. Polon. Sci. s. Sci. biol.* **13**, 489 (1965).
86. Klingenberg M., w *Mosbacher Koloquium Freie Nucleotide und Ihre biologische Bedeutung*, Springer, Berlin-Heidelberg 1961, str. 82.
87. Klingenberg M., Symp. Biological Structure and Function, red. T. W. Goodwin, O. Lindberg, tom II, Academic Press, New York 1961, str. 227.
88. Klingenberg M., *Biochem. Z.* **335**, 263 (1961).
89. Klingenberg M., Symp. Redoxfunktionen cytoplasmatischer Structuren, Wien 1962, str. 163.
90. Klingenberg M., *Angew. Chem.* **75** 900 (1963).
91. Klingenberg M., *Biochem. Z.* **343**, 479 (1965).
92. Klingenberg M., Kröger A., w *Biochemistry of Mitochondria*, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak, Academic Press, PWN, Londyn-Warszawa, 1966, str. 11.
93. Klingenberg M., Bucher Th., *Biochem. Z.* **331**, 312 (1959).
94. Klingenberg M., Bucher Th., *Biochem. Z.* **334**, 1 (1961).
95. Klingenberg M., von Haefen H., *Biochem. Z.* **337**, 120 (1963).
96. Klingenberg M., Schollmeyer P., *Biochem. Z.* **333**, 335 (1960).
97. Klingenberg M., Schollmeyer P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 38 (1961).
98. Klingenberg M., Schollmeyer P., Vth International Congress of Biochemistry (Moscow 1961), tom V, red. E. C. Slater, Pergamon Press, London 1963, str. 46.
99. Klingenberg M., Schollmeyer P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 43 (1961).
100. Klingenberg M., Schollmeyer P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 323 (1961).
101. Klingenberg M., Schollmeyer P., *Biochem. Z.* **335**, 231 (1961).
102. Klingenberg M., Schollmeyer P., *Biochem. Z.* **335**, 243 (1961).
103. Klingenberg M., Slenczka W., *Biochem. Z.* **331**, 486 (1959).
104. Klingenberg M., von Haefen H., Wenske G., *Biochem. Z.* **343**, 452 (1965).
105. Klingenberg M., Slenczka W., Ritt E., *Biochem. Z.*, **332**, 47 (1959).
106. Krebs H. A., *Biochem. J.* **80**, 275 (1961).

107. Krebs H. A., w Horizons in Biochemistry, red. M. Kasha, B. Pullman, Academic Press, New York 1962, str. 285.
- 107a. Krebs H. A., w Biochemistry of Mitochondria, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak, Academic Press, PWN, Londyn-Warszawa, str. 105.
108. Krebs H. A., Eggleston L. V., *Biochem. J.* **82**, 134 (1962).
109. Krebs H. A., Kornberg G. L., *Ergebn. Physiol.* **49**, 271 (1957).
110. Krebs H. A., Eggleston L. V., D'Allesandro A., *Biochem. J.* **79**, 537 (1961).
111. Kulka R. G., Krebs H. A., Eggleston L. V., *Biochem. J.* **78**, 95 (1961).
112. Lardy H. A., Symp. Biological Structure and Function, red. T. W. Goodwin, O. Lindberg, tom II, Academic Press, New York, 1961, str. 265.
113. Lardy H. A., Elvehjem C. A., *Ann. Rev. Biochem.* **14**, 1 (1945).
114. Lardy H. A., Wellman H., *J. Biol. Chem.* **195**, 215 (1952).
115. Lardy H. A., Johnson O., McMurray W. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **78**, 587 (1958).
- 115a. Lassota Z., *Post. Biochem.* **6**, 145 (1960).
116. Lee C—P., *Fed. Proc.* **22**, 2190 (1963).
117. Lee C—P., Ernster L., *Biochem. Biophys. Acta* **81** 187 (1964).
118. Lee C—P., Azzone G. F., Ernster L., *Nature* **201**, 152 (1964).
119. Lehninger A. L., Vth International Congress of Biochemistry (Moscow 1961), tom V, red. E. C. Slater, Pergamon Press, Londyn 1963, str. 239.
120. Lehninger A. L., w The Mitochondrion, Benjamin Press, New York 1964, str. 136.
121. Lieberman M., Baker J. E., *Ann. Rev. Biochem.* **16**, 343 (1965).
122. Loomis W. F., Lipman F., *J. Biol. Chem.* **173**, 807 (1948).
123. Löw H., Vallin I., *Biophys. Res. Comm.* **9**, 307 (1962).
124. Löw H., Vallin I., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 361 (1963).
125. Löw H., Kruger H., Ziegler D. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 231 (1961).
126. Löw H., Vallin I., Alm B., Johnson Foundation Colloquium on Energy-Linked Functions of Mitochondria (Philadelphia 1963), red. B. Chance Academic Press, New York 1963, str. 5.
- 126a. Mitchell P. *Nature*, **191**, 144 (1961).
- 126b. Mitchell P., *Symp. Biochem. Soc.* **22**, 142 (1962).
- 126c. Mitchell P., Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Bodmin, Cornwall, Glynn Research Ltd. 1966.
- 126d. Mitchell P., *Biol. Rev.* **41**, 445 (1966).
- 126e. Mitchell P. Moyle J., w Biochemistry of Mitochondria, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga L. Wojtczak, Academic Press—PWN, London—Warsaw, 1966.
127. Myers D. K., Slater E. C., *Biochem. J.* **67**, 572 (1957).
128. Packer L., *Fed. Proc.* **20**, 45 (1961).
129. Packer L., *J. Biol. Chem.* **237**, 1327 (1962).
130. Packer L., *Biochim. Biophys. Acta* **74**, 127 (1963).
131. Packer L., Deuton N. D., *Fed. Proc.* **21**, 53 (1962).
132. Packer L., Mustafa M. G., *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 1 (1966).
133. Penefsky H., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 619 (1962).
134. Penefsky H., Johnson Foundation Colloquium on Energy-Linked Functions of Mitochondria (Philadelphia 1963), red. B. Chance, Academic Press, New York 1963, str. 87.
135. Prairie R. L., Conover T. E., Racker E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 422 (1963).
136. Presmann C., *J. Biol. Chem.* **238**, 401 (1963).

137. Racker E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1659 (1962).
138. Racker E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 435 (1963).
- 138a. Redfearn E. R., Whittaker P. A., *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 413 (1966).
139. van Rossum G. D., *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 198 (1964).
140. Sanadi D. R., *J. Biol. Chem.* **238**, PC482 (1963).
141. Sanadi D. R., *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 21 (1965).
142. Sanadi D. R., Fluharty L., Andreoli T. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **8**, 200 (1962).
143. Sanadi D. R., Andreoli T. E., Pharo R. E., Vyas S. R., Johnson Foundation Colloquium on Energy — Linked Functions of Mitochondria, (Philadelphia 1963), red. B. Chance, Academic Press, New York 1963, str. 26.
144. Slater E. C., *Nature* **172**, 575 (1953).
145. Slater E. C., *Rev. Pure Appl. Chem.* **8**, 221 (1958).
146. Slater E. C., Vth International Congress of Biochemistry (Moscow, 1961), tom V, red. B. C. Slater, Pergamon Press, London 1963, str. 325.
147. Slater E. C. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* **107**, 1 (1963).
148. Slater E. C., *Arch. Biol.* **76**, 235 (1965).
149. Slater E. C., w Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, red. J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 166.
- 149a. Slater S. C., w Comprehensive Biochemistry, red. M. Florkin i E. H. Stütz, tom 14, Elsevier, Amsterdam, 1966, str. 327.
150. Slater E. C., Tager J. M., Snoswell A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 177 (1962).
151. Slater E. C., Tager J. M., Johnson Foundation Colloquium on Energy-Linked Functions of Mitochondria (Philadelphia 1963), red. B. Chance, Academic Press, New York 1963, str. 97.
152. Slater E. C., Tager J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 276 (1963).
153. Snoswell A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **52**, 216 (1961).
154. Snoswell A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 143 (1962).
155. Szarkowska L., *Post. Biochem.* **10**, 77 (1964).
156. Szarkowska L., Erecińska M., *Acta Biochem. Polon.* **12**, 179 (1965).
157. Szarkowska L., Klingenberg M., *Biochem. Z.* **338**, 674 (1963).
158. Tager J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 258 (1963).
159. Tager J. M., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 227 (1963).
160. Tager J. M., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 246 (1963).
161. Tager J. M., Howland J. L., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 616 (1962).
162. Tager J. M., Howland J. L., Slater E. C., Snoswell A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 266 (1963).
163. Tappel A. L., *Biochem. Pharmacol.* **3**, 289 (1960).
164. Ter Welle H. F., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 385 (1964)
165. Tyler D. D., Estabrook R. W., Sanadi D. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 264 (1965).
166. Tyler D. D., Estabrook R. W., Sanadi D. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **114**, 239 (1966).
167. Williams G. R., *Canad. Fed. Biol. Soc.* **3**, 53 (1960).
168. Wojtczak L., *Post. Biochem.* **8**, 73 (1962).
169. Wu C. H., Ling C. S., *Acta Biochim. Biophys. Sinica* **4**, 117 (1964).
170. Ziegler D. M., Symp. Biological Structure nad Function, red. T. W. Goodwin, O. Lindberg, tom II, Academic Press, New York 1961, str. 253.

WŁODZIMIERZ ZAGÓRSKI*

Transport elektronów u bakterii tlenowych

Electron Transport in Aerobic Bacteria

PANU PROFESOROWI JOZEFOWI HELLEROWI
Z OKAZJI 70-TEJ ROCZNICY URODZIN

The respiratory system of aerobic bacteria is reviewed. The nature and function of dehydrogenases, quinones and cytochromes present in bacterial membrane are discussed.

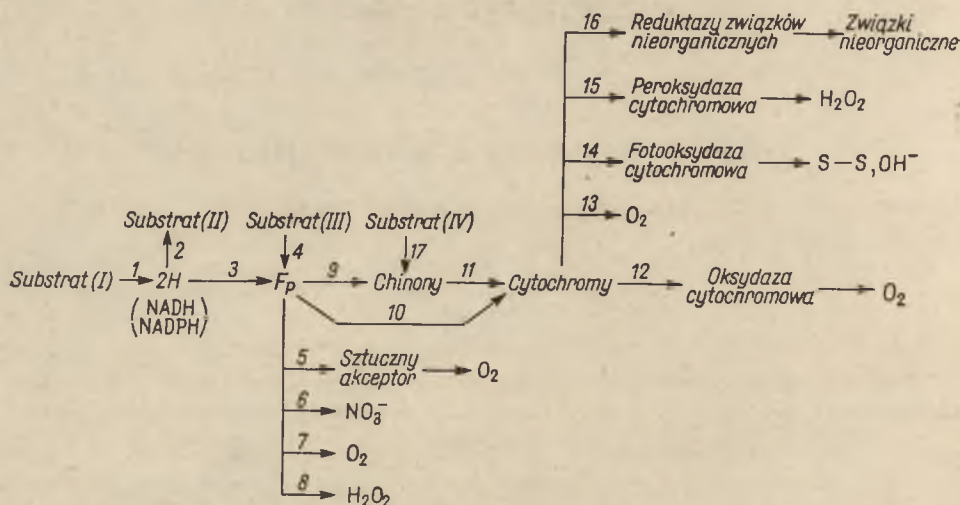
Proces utleniań biologicznych polega na przeniesieniu elektronów z substratu oddechowego na tlen lub innego rodzaju akceptor o wyższym potencjale oksydoredukcyjnym niż substrat. W przeciwieństwie do zwierząt i roślin wyższych, bakterie charakteryzuje zmienność dróg utlenień, związana ze zdolnością przystosowywania się do środowiska.

Schemat 1 przedstawia główne drogi utleniań bakteryjnych. Uwzględniono w nim reakcje katalizowane zarówno przez enzymy rozpuszczalne, zlokalizowane w cytoplazmie, jak i przez enzymy łańcucha oddechowego. Podano również miejsca reakcji poszczególnych substratów i akceptorów.

Reakcje odwodorowania substratów zachodzą przy współudziale enzymów posiadających różnorodne koenzymy. Substraty odwodorowywane przez dehydrogenazy związane z NAD^+ oznaczono na schemacie ogólnie jako Substrat (I). Należy tu np. β -hydroksymaślan (1, 41), jabłczan (1, 14), pirogronian czy α -ketoglutaran (48). Elektrony z substratu (I) mogą być przeniesione na Substrat (II) o wyższym stopniu utlenienia, np. w procesie fermentacji. Substraty (III) np. bursztynian (1, 49), DL-mleczan (15), jabłczan (8, 25) są odwodorowywane przy współudziale flawoproteidu. Substraty (IV) są odwodorowywane przez dehydrogenazy, których grupą czynną jest układ chinonowy. U niektórych bakterii substratem takim może być glukoza (37).

* Mgr, str. asystent Zakładu Enzymatyki Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Ten sam substrat może być u różnych bakterii odwodorowywany przy współdziałaniu dehydrogenaz o różnych koenzymach. Toteż w przypadku bakteryjnych układów oddechowych nie można podać ogólnej reguły mówiącej, które substraty są odwodorowywane przy współdziałaniu nukleotydów pirydynowych, a które przy współdziałaniu flawin czy też pochodnych chinonowych.



Schemat 1. Przebieg utleniania bakteryjnych (wg 20, z uzupełnieniem autora)
1—16 — kolejne etapy reakcji oksydoredukcyjnych. Dalsze objaśnienia w tekście

Elektrony odłączone od substratu przechodzą następnie na przenośniki oksydoredukcyjne łańcucha oddechowego. Pomimo braku mitochondriów u bakterii rodzaj przenośników i ich uszeregowanie są podobne jak w mitochondriach ssaków (20, 63, 64). Są to flawoproteidy (lub metaloflawoproteidy), chinony i cytochromy (schemat 1). Oddechowe układy bakteryjne wykazują jednak znaczne zróżnicowanie dotyczące budowy chinonów i cytochromów występujących w łańcuchu oddechowym.

Badając enzymy oksydoredukcyjne często śledzi się przebieg redukcji sztucznych akceptorów np. egzogenego cytochromu c, żelazicyjanku, 2,6-dwuchlorofenoloindofenolu, soli tetrazolowych, błękitu metylenowego i chinonów (22, 46). Wymienione sztuczne akceptory mogą reagować przede wszystkim ze zredukowanymi flawoproteidami. Niektóre z nich mogą reagować również i z innymi składnikami łańcucha (46). Sztuczne akceptory reagują zarówno z należącymi do łańcucha oddechowego, jak i z rozpuszczalnymi flawoproteidami. Przy współdziałaniu takich akceptorów jak menadion lub błękit metylenowy, elektrony odłączone od substratu (I) lub (III) mogą nieenzymatycznie reagować z tlenem — przechodząc zaznaczoną na schemacie 1 drogą 1—3—5 lub 4—5 (2, 90).

Bakterie dzieli się w zależności od zdolności do przeżywania w warunkach tlenowych i beztlenowych na trzy typy fizjologiczne: bezwzględne

tlenowce, względne tlenowce i bezwzględne beztlenowce. Podział ten znajduje jednocześnie odbicie w poważnych różnicach dotyczących budowy, składu i akceptorów układów oddechowych. Bezwzględne beztlenowce nie mogą rosnąć w obecności tlenu. Jedne z nich nie zawierają cytochromów — elektrony przenoszone są drogą 1—2 i 1—3—5; drugie mają cytochromy i przeniesienie elektronów zachodzi drogą 1—3—10—16. Względne tlenowce mogą rosnąć zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. U tych spośród nich, które nie zawierają cytochromów, utleniania w beztlenowych warunkach hodowli mogą przebiegać drogami 1—2 i 1—3—5; zaś w warunkach tlenowych — drogami 1—3—5, 1—3—7 i 1—3—8. Natomiast względne tlenowce zawierające cytochromy w warunkach beztlenowych prowadzą utlenianie drogami 1—2 i 1—3—9—11—16 a w warunkach tlenowych — drogami: 1—3—9—11—12 i 1—3—7. Przeniesienie elektronów u bezwzględnych tlenowców zachodzi wyłącznie drogą 1—3—9—11—12.

Zespoły enzymatyczne katalizujące reakcje przedstawione na schemacie 1 można podzielić na dwie grupy — „rozpuszczalną” i „nierozpuszczalną”. Termin „rozpuszczalność” i „nierozpuszczalność” oznacza tu zachowanie się danego enzymu lub zespołu enzymów w trakcie 2-godzinego ultrawierowania — przy przyspieszeniu 78 000 g, lub 1-godzinnego przy 144 000 g (1, 50, 65). Układy enzymatyczne sedymentujące w tych warunkach nazywa się nierozpuszczalnymi, układy pozostające w supernatancie — rozpuszczalnymi. Jako regułę można podać, że układy zawierające cytochromy, występują po ultrawierowaniu w osadzie (65, 80).

Omówienie, choćby pobieżne, przebiegu utleniania u wszystkich trzech fizjologicznych typów bakterii przekracza ramy artykułu monograficznego. Z tego względu, jak również ze względu na możliwość porównania omawianych układów z dobrze poznanym łańcuchem oddechowym ssaków, zostanie omówiony tylko łańcuch oddechowy bakterii tlenowych.

I. Lokalizacja łańcucha oddechowego w komórce bakteryjnej

Istnieją dwie możliwości określenia lokalizacji enzymów oddechowych w komórce bakteryjnej. Jedną z nich jest metoda cytochemiczna, drugą — rozbicie komórek i rozdzielenie homogenatu przy pomocy wirowania na frakcje. Brak wyraźnych struktur w komórkach bakterii (jądra, mitochondriów, *reticulum*) ogranicza możliwość stosowania pierwszej metody, trudno bowiem wykazać określone zlokalizowanie w komórce produktu reakcji cytochemicznej (65). Przykładem mogą być próby zastosowania jako wskaźników lokalizujących enzymy oksydoredukcyjne soli tetrazolowych, które ulegają redukcji do formazanów. Stwierdzono, że u *Bacillus megaterium* formazany występują w komórce jako skupienia rozrzucone w cytoplazmie. Sugerowano, że skupienia te związane są z istnieniem

w cytoplazmie gran — organelli homologicznych z mitochondriami. Po rozbiciu komórek udało się skupienia te odwirować i wykazać, że nie są to grana, a tylko strąty nierozpuszczalnego formazanu. Enzymy oddechowe były zlokalizowane w supernatancie otrzymanym po odwirowaniu formazanu (84).

Drugą metodą badania umiejscowienia enzymów oddechowych jest rozbicie komórek bakteryjnych, wirowanie homogenatu i określenie, z którą frakcją związana jest badana aktywność. Metodą tą trudno jest jednak dokładnie ustalić z jakich części komórki pochodzą poszczególne frakcje. Ponadto enzymy oddechowe mogą występować w różnych frakcjach, co jest uzależnione przede wszystkim od sposobu homogenizowania. Sposoby otrzymywania preparatów łańcucha oddechowego bakterii różnią się od sposobów ich otrzymywania z mitochondriów (6, 40, 63). Z częściej stosowanych sposobów homogenizowania bakterii należy wymienić: a) rozcieranie świeżych lub liofilizowanych bakterii z materiałami ściernymi, np. tlenkiem glinu lub proszkiem szklanym (19, 39, 50, 53, 94); b) rozbicie w prasie Frencha lub Hughesa (25, 79); c) trawienie lizosomem ścian komórkowych i rozbicie protoplastów szokiem osmotycznym (21, 79); d) rozbicie bakterii ultradźwiękami, najpowszechniej obecnie stosowane (1, 13, 21, 41, 47). Zaletą tej ostatniej metody jest nie tylko wydajne rozbicie komórek, ale również możliwość uzyskania jednolitej wielkości fragmentów błon komórkowych, w których występują enzymy łańcucha oddechowego (30, 65, 66, 76). Przy zastosowaniu ultradźwięków do rozbicia komórek udaje się odnaleźć enzymy oddechowe w jednej lub dwu frakcjach. Natomiast podczas homogenizacji z materiałami ściernymi błona zostaje rozbita na fragmenty różnej wielkości, a związane z nią enzymy oddechowe znajdujemy w wielu kolejnych frakcjach sedymentujących w zakresie od 6 000 g do 144 000 g (79, 80, 81). Tablica 1 podaje typowe schematy otrzymywania preparatów oddechowych bakterii tlenowych przy zastosowaniu wymienionych poprzednio metod homogenizacji.

Podkreślić należy, że w każdym procesie homogenizacji ważne jest utrzymanie odpowiedniego stosunku bufor : mokra masa bakteryjna. Stosunek ten zwykle waha się w zakresie od 4 : 1 do 1 : 1. Zbyt duża ilość buforu w stosunku do masy bakteryjnej obniża znacznie wydajność homogenizacji (19). W niektórych przypadkach homogenat przed wirowaniem rozcieńcza się buforem ekstrakcyjnym (50, 83). Do otrzymywania bakteryjnych preparatów oddechowych stosuje się zwykle rozcieńczone bufony (0,005M — 0,04M) o pH od 7,0 do 7,6 — a więc podobne jak w przypadku izolowania mitochondriów. Ponieważ bakteryjne cząstki oddechowe nie wykazują właściwego mitochondriom pęcznienia w roztworach o niskiej sile jonowej, nie stosuje się zwykle przy ich izolowaniu środowisk zawierających sacharozę.

Ponieważ różne sposoby homogenizacji dają fragmenty błony komórkowej o różnej wielkości, sposób wirowania homogenatu w celu otrzymania

Tablica 1

Otrzymywanie bakteryjnych preparatów oddechowych

Gatunek bakterii (literatura)	Homogenizacja*	Fracjonowanie homogenatu*	Aktywność
<i>Escherichia coli</i> (80, 81, 82)	roztarcie z tlenkiem glinu w 0,005M buforze tris, pH 7,3	wirowanie przy 6 000g fracjonowanie supernatantu przy przyspieszeniach od 8 000—100 000g	we wszystkich osadach z wyjątkiem pierwszego
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (89)	roztarcie z tlenkiem glinu w 0,01M buforze tris z dodatkiem 0,25M sacharozy, pH 7,0	wirowanie przy 26 000 g, supernatant wirowany przy 145 000 g	w drugim osadzie
<i>Azotobacter vinelandii</i> (41, 42)	rozbicie w prasie Frencha w 0,025M buforze fosforanowym, pH 7,4	wirowanie przy 10 000 g, wirowanie supernatantu przy 35 000 g (osad dużych cząstek, wirowanie supernatantu przy 105 000 g (osad małych cząstek)	w drugim i trzecim osadzie
<i>Rhodospirillum rubrum</i> (wzrost heterotroficzny) (79)	zamrożenie i rozmrożenie komórek, 30 min. trawienie lizozymem w 0,04M buforze tris, pH 7,3, dodanie sacharozy do końcowego stężenia 0,2M	wirowanie przy 800 g, trawienie osadu DN-azą, wirowanie przy 8 000 g, rozbicie osadu w prasie Frencha, wirowanie przy 25 000 g (osad dużych cząstek), wirowanie supernatantu przy 80 000 g (osad małych cząstek)	we wszystkich osadach
<i>Pseudomonas ovalis v. chester</i> (25, 26, 59)	rozbicie zamrożonych komórek w prasie Hughesa, po rozmrożeniu trawienie DN-azą w 0,01M buforze fosforanowym, pH 7,2	wirowanie przy 12 000 g, zebranie wierzchniej warstwy osadu i ponowne wirowanie przy 25 000 g	w osadzie (preparat błony komórkowej)
<i>Pseudomonas sp.</i> (59)	rozbicie ultradźwiękami w 0,01M buforze fosforanowym, pH 7,2	wirowanie przy 12 000 g, wirowanie supernatantu przy 100 000 g	w drugim osadzie
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (62)	zamrożenie i rozmrożenie komórek, rozbicie ultradźwiękami w 0,1M buforze fosforanowym, pH 8,0	wirowanie przy 8 500 g, wirowanie supernatantu przy 100 000 g	w drugim osadzie
<i>Escherichia coli</i> (48, 49)	rozbicie ultradźwiękami w 0,04M buforze tris, pH 7,3	wirowanie przy 16 000 g, wirowanie supernatantu przy 39 000 g (osad dużych cząstek), wirowanie supernatantu przy 144 000 g (osad małych cząstek)	w dużych cząstkach oksydazy bursztynianowej, w małych cząstkach oksydazy NADH i bursztynianowej

Tablica 1 (cd)

Gatunek bakterii (literatura)	Homogenizacja	Fracjonowanie homogenatu	Aktywność
<i>Mycobacterium phlei</i> (1, 2, 10, 11)	rozbicie ultradźwiękami w 0,01M buforze tris zawierającym 0,15M KCl i 0,01M MgCl ₂ , pH 7,6	wirowanie przy 20 000 g, wirowanie supernatantu przy 144 000 g (osad małych cząstek)	w małych cząstkach — oksydazy, w supernatancie rozpuszczalne dehydrogenazy i oksydazy NADH i NADPH

* wszystkie czynności przeprowadzone w temperaturze 2—4°C

nia frakcji, zawierających aktywny łańcuch oddechowy zależy od zastosowanej metody homogenizacji. Jednak na podstawie przykładów podanych w tablicy można zaobserwować pewne ogólne reguły wirowania homogenatów. Pierwsze wirowanie ma za cel osadzenie nierozbitych komórek i dużych fragmentów błon komórkowych. Stosuje się wówczas przyspieszenie od 6 000 g do 16 000 g, czas wirowania wynosi średnio 30 minut. Drugie wirowanie przy 20 000 g — 40 000 g w ciągu 30 min. osadza frakcję tzw. „dużych cząstek” (*large particles*). Trzecie wirowanie osadza „małe cząstki” (*small particles*) często też nazywane po prostu „cząstki” (*particles*) lub „cząstki oddechowe” (*respiratory particles*). Stosuje się tu przyspieszenie od 80 000 — 144 000 g w czasie 40 min. do 2,5 godzin.

Aktywności enzymów oddechowych występują zarówno w dużych, jak i małych cząstkach, niekiedy obserwuje się jednak różnice w składzie enzymatycznym tych frakcji. Na przykład u *Pseudomonas ovalis* v. *chester* aktywność właściwa oksydazy L-jabłczanowej w błonach komórkowych wynosi 1,70 μmola utlenionego substratu /min/mg białka, zaś w „małych cząstkach” 2,82 μmola/min/mg białka (25). W „dużych cząstkach”, pochodzących z *Escherichia coli* występuje oksydaza bursztynianowa, brak zaś oksydazy NADH, natomiast „małe cząstki” wykazują obie aktywności, jak również zdolność do katalizowania oksydacyjnej fosforylacji (48, 49). Skłoniło to Kashketa i Brodiego (48) do wysunięcia tezy, że „małe cząstki” są natywnymi składnikami komórki, luźno związanymi z błoną komórkową i dającymi się od niej oderwać przy odpowiedniej homogenizacji (1). Duże cząstki byłyby więc fragmentami błony komórkowej z zachowaną częścią małych cząstek lub ich fragmentów. Inni autorzy uważają, jednak, że zarówno „duże cząstki”, jak i „małe cząstki” są fragmentami błony komórkowej — co najwyżej w różnym stopniu odzielonymi od towarzyszących białek nieenzymatycznych (65, 66).

II. Rozpuszczalne i nierozpuszczalne enzymy łańcucha oddechowego

Supernatanty otrzymane po odwirowaniu cząstek oddechowych nie wykazują aktywności oksydaz. Również i cząstki choć zdolne są utleniać NADH i bursztynian (czasem również inne substraty) tlenem, nie utleniają wielu substratów, które łatwo są utleniane przez nierozbite bakterie czy homogenaty przed wirowaniem (25, 57).

Tablica 2
Utlenianie β -hydroksymaślanu tlenem cząsteczkowym przez różne frakcje z komórek *Azotobacter vinelandii* (wg 41)

Frakcja	Aktywność próbki w μ molach utlenionego substratu				
	—	+NAD	+NADP	+FMN	+FAD
Ekstrakt bezkomórkowy (4,96 mg białka)	0,021	0,587	0,048	0,023	0,024
Małe cząstki (1,82 mg białka)	0,005	0,016	—	—	—
Supernatant (0,93 mg białka)	0,015	0,044	—	—	—
Małe cząstki (1,82 mg białka) + supernatant (0,93 mg białka)	0,016	0,326	—	—	—
Małe cząstki (1,82 mg białka) + częściowo oczyszczona dehydrogenaza β -hydroksymaślanowa z supernatantu (0,15 mg białka)	0,013	0,861	0,030	0,015	0,011

W tablicy 2 podano przebieg utleniania tlenem cząsteczkowym β -hydroksymaślanu we frakcjach otrzymanych z *Azotobacter vinelandii*. Koenzymem tej reakcji jest NAD. Utlenianie β -hydroksymaślanu przebiega w bezkomórkowych ekstraktach oraz w mieszaninie małych cząstek oddechowych i supernatantu. Oddzielnie żadna z tych frakcji nie utlenia substratu, ponieważ ultrawirowanie oddziela do siebie dwa składniki katalizujące reakcję β -hydroksymaślan \rightarrow tlen. Dehydrogenaza zawarta jest w supernatancie, zaś łańcuch oddechowy związany jest z małymi cząstkami osiadającymi w trakcie ultrawirowania.

Proces utleniania β -hydroksymaślanu przez *Azotobacter vinelandii* przypomina przebieg utleniania substratów cyklu kwasów trójkarboksylowych przez mitochondria zwierzęce, w których dehydrogenazy występują w *matrix*, zaś oksydazy NADH i bursztynianowa w błonie mitochondrialnej lub w jej fragmentach, tj. cząstkach przenoszących elektrony (ETP). Nienaruszone mitochondria utleniają substraty cyklu kwasów

trójkarboksyłowych tlenem cząsteczkowym. Po zniszczeniu struktury mitochondrium i ultrawiirowaniu dehydrogenazy pozostaną w supernatancie, a ETP znajdują się w osadzie i obie frakcje będą pozbawione aktywności pewnych oksydaz (31, 63). U wielu bakterii niektóre dehydrogenazy są związane z cząstkami i przy ultrawiirowaniu przechodzą wraz z nimi do osadu. W tym wypadku cząstki katalizują utlenianie właściwych im substratów tlenem cząsteczkowym — bowiem w jednej frakcji zlokalizowane są dehydrogenazy i łańcuch cytochromowy. Rodzaj dehydrogenaz związanych z cząstkami oddechowymi zależy od szczepu bakteryjnego.

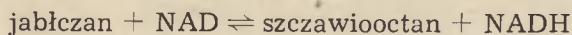
T a b l i c a 3

Lokalizacja niektórych dehydrogenaz bakteryjnych

Dehydrogenaza	Koenzym	Lokalizacja	Mikroorganizm
D, L- β -hydroksy- maślanowa	NAD	supernatant	<i>A. vinelandii</i> (41), <i>M. phlei</i> (1)
L-jabłczanowa	NAD	supernatant	<i>Bac. subtilis</i> (92), <i>A. vinelandii</i> (45) <i>E. coli</i> (48), <i>Pseudomonas</i> KB ₁ (56), <i>Pseudomonas B₂</i> aba (58, 25), <i>M. lysodeicticus</i> (14, 15), <i>M. phlei</i> (3)
„	FAD	cząstki	<i>M. lysodeicticus</i> (14, 15, 91), <i>M. avium</i> (50, 83), <i>Acetob. xylinum</i> (8, 9), <i>A. vinelandii</i> (41, 91), <i>Ps. ovalis var. chester</i> (27)
„	FAD	cząstki, a po długim roz- biciu ultra- dźwiękami- supernatant	<i>Ps. ovalis var. chester</i> (25, 29)
„	FAD	supernatant	<i>M. phlei</i> (3)
D-mleczanowa	flawina (FAD)	cząstki	<i>A. vinelandii</i> (41), <i>H. parainfluenzae</i> (86, 88)
L-mleczanowa	flawina (FAD)	cząstki	<i>A. vinelandii</i> (41), <i>H. parainfluenzae</i> (86, 88)
D-glukozy	pochod- na 1,4- naftochi- nonu	cząstki i su- pernatant	<i>B. anitratum</i> (35, 36, 37)

W tabelicy 3 podano przykłady trzech typów dehydrogenaz bakteryjnych, wyróżnionych na podstawie rodzaju koenzymu i lokalizacji. Do pierwszego typu należą enzymy, których koenzymem jest NAD — są to dehydrogenazy rozpuszczalne. Utleniają one jabłczan, β -hydroksy-maślan, pirogronian, α -ketoglutaran. Do drugiego typu należą enzymy, których koenzymem jest flawina — są one zwykle związane z cząstkami, tylko jeden z dotychczas poznanych enzymów tego typu występuje w supernatancie. Katalizują one utlenianie NADH, bursztynianu, jabłczanu i mleczanu. Do trzeciego typu należy wyizolowana z *Bacterium anitratum* de-

hydrogenaza glukozy, której koenzymem jest pochodna 1,4-naftochinonu. Znane są jej dwie formy — rozpuszczalna i związana z cząstkami (35). Zdaniem H a u g e i H a l l b e r g a (36, 37) dehydrogenazy i cytochromy bakteryjnego łańcucha oddechowego są kodowane przez osobne układy genetyczne i po zsyntetyzowaniu włączane do cząstek, a rozpuszczalna forma dehydrogenazy glukozy ma być właśnie fragmentem niedołączonym jeszcze do łańcucha cytochromowego. Być może pogląd ten jest słuszny również w odniesieniu do innych dehydrogenaz występujących jednocześnie w cząstkach i w cytoplazmie, a mających ten sam koenzym. Hipoteza Hauge i Hallberga nie tłumaczy jednak jednoczesnego występowania w bakteriach dwóch dehydrogenaz, odwodorowujących ten sam substrat, a posiadających różne koenzymy. Przykładem takich dehydrogenaz mogą być dehydrogenazy jabłczanowe. U wielu bakterii występuje wyłącznie rozpuszczalna dehydrogenaza jabłczanowa, której koenzymem jest NAD (25, 57, 59, 93). Jej własności są zbliżone do własności dehydrogenazy jabłczanowej w tkanek zwierzęcych (28, 74). Katalizuje ona odwracalną reakcję:



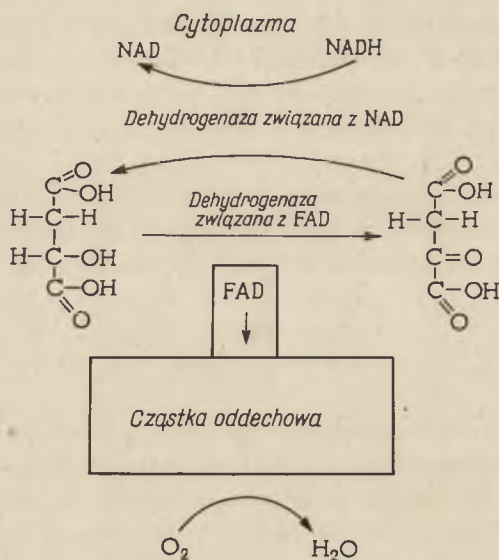
Równowaga reakcji przesunięta jest w kierunku redukcji szczawiooctanu. Dehydrogenaza ta bierze więc udział w regulacji szybkości spalań w cyklu kwasów trójkarboksylowych — przy nagromadzeniu się NADH szybkość utleniania w cyklu zostaje zwolniona wskutek zmniejszonej ilości szczawiooctanu. Jednocześnie bierze ona udział w syntezie szczawiooctanu w cyklu glioksalowym (57).

U *Pseudomonas ovalis v. chester* (25, 29), *Acetobacter xylinum* (8, 9), *Mycobacterium avium* (50, 83) występuje wyłącznie dehydrogenaza jabłczanowa cząstkowa, zawierająca jako koenzym FAD. Cząstki oddechowe otrzymane z tego typu bakterii utleniają jabłczan tlenem cząsteczkowym, tracą jednak tę zdolność po rozbiciu ultradźwiękami. Od łańcucha oddechowego odrywa się wówczas flawoproteid, który podczas ultrawirrowania przechodzi do supernatantu (27). Zależnie od sposobu homogenizacji można więc wykryć nierozpuszczalną oksydazę jabłczanową we frakcji cząstek lub rozpuszczalną dehydrogenazę jabłczanową w supernatancie.

Znane są mikroorganizmy, np. *Azotobacter vinelandii* (42, 43) i *Micrococcus lysodeicticus* (15, 16), w których obok dehydrogenazy jabłczanowej rozpuszczalnej, współdziałającej z NAD występuje też związana z cząstkami dehydrogenaza jabłczanowa zawierająca FAD jako koenzym. Jest rzeczą charakterystyczną, że u *Azotobacter vinelandii* aktywność właściwa cząstkowej dehydrogenazy jabłczanowej przewyższa około 30-krotnie aktywność dehydrogenazy rozpuszczalnej.

U *Mycobacterium phlei* stwierdzono natomiast występowanie dwóch rozpuszczalnych dehydrogenaz jabłczanowych: jednej współdziałającej z NAD, drugiej — współdziałającej z FAD. A s a n o i B r o d i e (1, 3)

uważają, że ta ostatnia stanowi składnik łańcucha utleniania jabłczanu, gdyż ma ona zdolność redukcji endogennej witaminy K_2 występującej w cząstkach oddechowych, a co za tym idzie — łańcucha cytochromowego. Autorzy ci uważają, że występujące obok siebie dwie rozpuszczalne dehydrogenazy jabłczanowe biorą udział w utlenianiu NADH powstającego w cytoplazmie (schemat 2).



Schemat 2. Utlenianie cytoplazmatycznego NADH przy współdziałaniu dehydrogenaz jabłczanowych u *Mycobacterium phlei*

Dehydrogenaza współdziałająca z FAD prowadzi reakcję odwodornienia jabłczanu do szczawiooctanu, przekazując elektrony przy współdziałaniu cząstek oddechowych na tlen. Powstający szczawiooctan jest zredukowany z powrotem do jabłczanu przez NADH gromadzący się w cytoplazmie. Tę reakcję katalizuje dehydrogenaza jabłczanowa współdziałająca z NAD (równowaga reakcji przesunięta ku redukcji szczawiooctanu). Schemat ten przypomina podany przez K r e b s a (60) przebieg zużywania cytoplazmatycznego NADH przez mitochondria zwierzęce. Być może, stosuje się on również do innych mikroorganizmów zawierających dwie dehydrogenazy jabłczanowe — rozpuszczalną związaną z NAD i cząstkową związaną z FAD.

Rozpuszczalna dehydrogenaza jabłczanowa z *Mycobacterium phlei* zawierająca jako koenzym FAD jest jedynym poznanym dotychczas enzymem tego typu. Jako ogólną regułę należy przyjąć, że dehydrogenazy, których koenzymem jest NAD występują w cytoplazmie, a dehydrogenazy zawierające jako koenzym flawinę lub chinon są strukturalnie i funkcjonalnie związane z cząstkami.

III. Bakteryjne cząstki oddechowe

Omówione dehydrogenazy bakteryjne współdziałają z łańcuchem oddechowym zlokalizowanym w cząstkach oddechowych. Dehydrogenazy, których koenzymem jest NAD, oddają elektrony na układ dehydrogenazy NADH, a dehydrogenazy z koenzymem flawinowym — na endogeny chinon cząstek oddechowych (1, 8, 35, 41).

W cząstkach oddechowych u bakterii, tak jak w mitochondrialnych cząstkach przenoszących elektrony występują flawoproteidy, chinony i cytochromy. Bakteryjny łańcuch oddechowy różni się od łańcucha mitochondrialnego rodzajem chinonów i cytochromów, oraz stechiometrią nośników oksydoredukcyjnych.

1. Udział chinonów w łańcuchach oddechowych

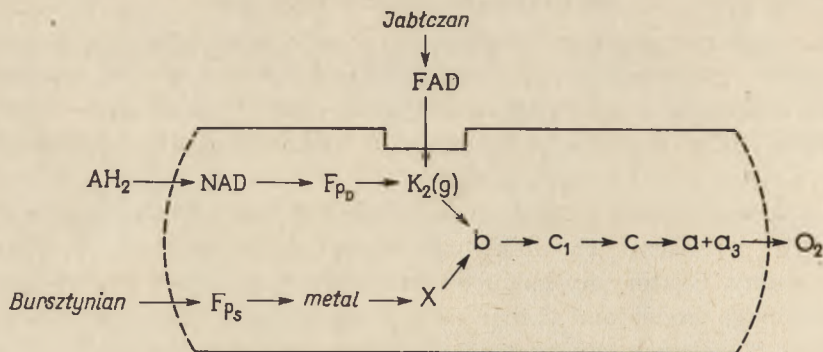
Ze względu na rodzaj chinonu występującego w łańcuchu oddechowym bakterie tlenowe można podzielić na trzy główne grupy. Do pierwszej należą mikroorganizmy zawierające jako jedyny składnik chinonowy łańcucha oddechowego pochodne naftochinonu (witaminę K₂), do drugiej — mikroorganizmy zawierające w łańcuchu oddechowym zarówno pochodne naftochinonu jak i ubichonon, do trzeciej, najliczniejszej — mikroorganizmy, u których w łańcuchu oddechowym występuje tylko ubichinon.

Do grupy zawierającej wyłącznie witaminę K₂ w łańcuchu oddechowym należą: *Mycobacterium phlei* (1, 10, 11, 12, 29), *Bacillus subtilis* (24) i *Bacillus stearothermophilus* (23). Stosunkowo najlepiej poznano jej rolę u *Mycobacterium phlei*. Witamina K₂ syntetyzowana przez tę bakterię ma w bocznym łańcuchu 9 jednostek izoprenoidowych (4, 5, 29). A s a n o i B r o d i e wykazali, że występuje ona w cząstkach oddechowych i bierze udział w transporcie elektronów przez łańcuch oddechowy (1, 3, 12).

Okazało się, że witamina K₂ bierze udział w utlenianiu β -hydroksymaślanu oraz jabłczanu i bursztynianu przez cząstki oddechowe *Mycobacterium phlei* (41). Naświetlanie cząstek światłem o długości fali 360m μ niszczące specyficznie chinony łańcucha oddechowego powoduje utratę zdolności utleniania tych substratów. Zdolność tę hamuje również dwukumarol. W obu wypadkach dodanie witaminy K przywraca aktywność.

Pomiar widm różnicowych przenośników oksydoredukcyjnych w cząstkach oddechowych z *Mycobacterium phlei* pozwolił ustalić sekwencję łańcucha oddechowego (schemat 3).

W skład tego łańcucha wchodzi dwie dehydrogenazy — dehydrogenaza NADH i bursztynianowa, witamina K₂ i chinon o podobnych własnościach biorący udział w utlenianiu bursztynianu oraz układ cytochromów, o charakterystyce widmowej identycznej z danymi dla układu cytochromowego w mitochondriach zwierzęcych. Witamina K₂ występująca w cząstkach oddechowych może być również zredukowana przez jabłczan — przy współudziale rozpuszczalnej dehydrogenazy jabłczanowej związanej z FAD.



Schemat 3. Łańcuch oddechowy w cząstkach z *Mycobacterium phlei* (wg 1)
 AH₂ — substraty odwodorowywane przy współudziale dehydrogenaz związanych z NADH : F_{pD}
 i F_{pS} — flawoproteiny dehydrogenaz NADH i bursztynianowej; K₂(g) — witamina K₂ o czter-
 dziestopięcio-węglowym łańcuchu bocznym; X — chinon o własnościach zbliżonych do witaminy
 K₁; b, c₁, c, a, a₃ — cytochromy

Do drugiej grupy mikroorganizmów, tj. takich, u których w łańcuchu oddechowym występują dwa rodzaje chinonów należą *Escherichia coli*. Jak wykazali Kashket i Brodie (47, 48, 49) są to: witamina K₂ /9/ i ubichinon (UQ₁₀). Stwierdzono, że „duże cząstki” i „małe cząstki” otrzymane z *Escherichia coli* różnią się znacznie własnościami enzymatycznymi, co przypisuje się obecności różnych składników chinonowych (48) (Tablica 4).

Tablica 4

Własności dużych i małych cząstek oddechowych
 izolowanych z *Escherichia coli* (wg 48)

Frakcja	Utlenianie bursztynianu		Utlenianie jabłczanu		Zawartość** ubichinonu	Zawartość** witaminy K
	zużycie* tlenu	stosunek P/O	zużycie* tlenu	stosunek P/O		
Duże cząstki	29,4	0,0	2,17	0,0	3,7·10 ⁻³	0,0
Małe cząstki	2,2	0,5	1,97	1,1	2,7·10 ⁻³	1,4·10 ⁻⁴

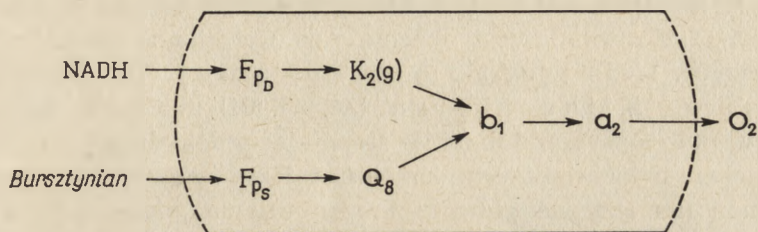
* w μgramoatomach O₂/10min/10mg białka

** w μmolach/mg białka

Duże cząstki zawierające tylko ubichinon utleniają aktywnie bursztynian słabiej zaś jabłczan, a nie katalizują oksydacyjnej fosforylacji. Małe cząstki zawierające ubichinon i witaminę K₂ utleniają bursztynian i jabłczan w tym samym stopniu, a także są zdolne do prowadzenia oksydacyjnej fosforylacji sprzężonej z utlenianiem tych substratów.

Zdaniem Kashketa i Brodiego w małych cząstkach witamina K jest składnikiem oksydazy NADH, ponieważ substraty, których odwodorowanie prowadzi do powstania NADH (np. jabłczan) powodują redukcję związanej w cząstkach witaminy K₂, zaś dwukumarol hamuje utlenianie tych

substratów. Autorzy ci wyizolowali z małych cząstek dehydrogenazę NADH aktywną tylko w stosunku do analogów witaminy K (49). Enzym ten nie redukował pochodnych ubichinonu. Z kolei na utlenianie bursztynianu przez małe cząstki dwukumarol nie wpływa, a wyizolowana z nich oksydoreduktaza bursztynian: cytochrom c, po naświetleniu w 360m μ może być reaktywowana wyłącznie przez analogi ubichinonu. Wyniki te wskazują, że w małych cząstkach łańcuchy utleniania NADH i bursztynianu zawierają różne chinony. Łańcuchy te łączą się ze sobą na poziomie cytochromu b₁. Schemat 4 przedstawia proponowany przez Kashketa i Brodiego układ łańcucha oddechowego w małych cząstkach *Escherichia coli*.



Schemat 4. Łańcuch oddechowy w małych cząstkach z *Escherichia coli* (wg 48, 49) Q₈ — ubichinon o czterdziestogłowym łańcuchu bocznym; pozostałe objaśnienia jak na schemacie 3

Przedstawicielem trzeciej grupy bakterii, u których składnikiem chinonowym łańcucha oddechowego jest wyłącznie ubichinon, może być *Azotobacter vinelandii*. Udział ubichinonu dobrze poznano w utlenieniach prowadzonych przez mitochondria zwierzęce (16, 17, 18, 32, 72). Przegląd tego zagadnienia podała Szarkowska w 1964 roku (78). U bakterii występują homologi ubichinonu zawierające w bocznym łańcuchu od 6 do 19 reszt izoprenoidowych (16, 18, 30, 41). Jones i Redfearn (41) wyizolowali z małych cząstek otrzymanych z *Azotobacter vinelandii* ubichinon o ośmiu resztach izoprenoidowych. Jego stężenie jest 6 razy wyższe od stężenia cytochromu b₁; ulega on redukcji substratami oddechowymi i podsiarczynem podobnie jak pozostałe nośniki oksydoredukcyjne zawarte w cząstkach. Pomiary widm różnicowych cząstek *Azotobacter vinelandii* po redukcji przenośników substratem wykazały, że istnieje tu następująca sekwencja przenośników elektronowych:



Ubichinon przejmuje więc elektrony od zredukowanych, związanych z cząstkami, dehydrogenaz flawinowych (u *Azotobacter vinelandii* są to dehydrogenazy NADH, bursztynianowa, DL-mleczanowa, L-jabłczanowa) i przenosi je na cytochrom grupy C (41, 42).

W *Agrobacterium tumefaciens* występuje ubichinon o dziesięciu resztach izoprenoidowych. Kurup i wsp. wykazali, że działa on w łańcuchu oddechowym utleniającym NADH, bowiem po ekstrakcji acetonem preparat enzymatyczny traci zdolność utleniania NADH, a dodatek ubichinonu

UQ₁₀ zdolność tę przywraca. U bakterii tych biorcą elektronów z UQ₁₀ jest specyficzny, słabo jeszcze poznany cytochrom, odznaczający się zdolnością do samoutleniania, nie należący do grupy C ani do grupy B (62).

Jakkolwiek bakterie tlenowe wykazują znacznie większe zróżnicowanie chinonów występujących w łańcuchu oddechowym niż zwierzęta, to jednak lokalizacja chinonów wydaje się być podobna u obu grup — stanowią one ogniwo pośrednie między dehydrogenazami flawinowymi a cytochromami. Biorcami elektronów z chinonów u różnych typów bakterii są różne rodzaje cytochromów — nie tylko cytochrom b₁. W bakteryjnych układach oddechowych — podobnie jak u ssaków chinon występuje w wyższych stężeniach niż pozostałe przenośniki oksydoredukcyjne.

Żywo dyskutowana jest obecnie rola ubichinonu w mitochondriach zwierzęcych. Według poglądu Szarkowskiej (78) rozwiniętego następnie przez Klingenberga (54, 55, 61) ubichinon tworzy swego rodzaju pulę oksydoredukcyjną zespalaającą dehydrogenazy flawinowe z łańcuchem cytochromowym. Natomiast Redfearn (71, 73) uważa, że ubichinon nie leży na głównej drodze utleniania, lecz stanowi czynnik zespalający ze sobą łańcuchy NADH i bursztynianowy, zapewniając możliwość przepływu elektronów między drogą utleniania NADH a drogą utleniania bursztynianu.

Wydaje się, że przynajmniej w przypadku układu występującego u *Escherichia coli* (prawdopodobnie również i u *Mycobacterium phlei*) schemat zaproponowany przez Redfearna nie da się zastosować. W układzie oddechowym *Escherichia coli* (schemat 4) składniki chinonowe obu dróg różnią się między sobą i nie zastępują się wzajemnie — istnieje tu więc nie tylko kompartmentacja chinonów dróg utleniania NADH i bursztynianu, ale i różnice w budowie między obu chinonami. Być może, rola chinonu w układach bakteryjnych przypomina rolę proponowaną dla ubichinonu przez Szarkowską i Klingenberga, to znaczy, że składniki chinonowe są ogniwem oksydoredukcyjnym łańcucha, łączącym różne dehydrogenazy flawinowe z łańcuchem cytochromowym.

2. Cytochromy bakteryjnego łańcucha oddechowego

Podstawą podziału cytochromów na trzy grupy — A, B i C są własności spektralne połączeń hemu z pirydyną. W przypadku pochodnych cytochromów A pasmo absorpcji α leży powyżej 570m μ , cytochromów B między 555 i 560m μ , a cytochromów C między 548 i 552 m μ . Dotychczas zbadane cytochromy bakteryjne również można zaliczyć do tych trzech grup. Pierwszą funkcją cytochromów podobnie jak w układzie oddechowym ssaków jest działanie jako przenośników w łańcuchu oddechowym, drugą — udział w redukcji tlenu. Cytochromy reagujące samorzutnie z tlenem pełnią funkcję oksydazy cytochromowej. W przeciwieństwie do układu oddechowego ssaków łańcuchy cytochromowe występujące u bakterii wykazują znaczne zróżnicowanie — rodzaj cytochromów zależy od

szczepu bakterii (20, 30, 65, 67, 68, 76). Na przykład u wszystkich ssaków oksydaza cytochromowa (cytochrom $a + a_3$) ma hem grupy A, natomiast u bakterii zależnie od gatunku oksydaza cytochromowa ma hem grupy A, B lub C. Cytochromy $a + a_3$ pełnią funkcję oksydaz u *Mycobacterium phlei* (1) i u *Corynebacterium diphtheriae* (53, 69), cytochrom a_2 u *Escherichia coli* (47, 48, 49), cytochrom B u *Agrobacterium tumefaciens* (62), cytochrom C w postulowanej oksydazie końcowej *Rhodospirillum rubrum* i *Rhodospirillum spheroides* (38, 39, 45).

Ciekawe, że w bakteryjnych układach oddechowych ilość cytochromów zależy od składu pożywki. Brak żelaza w pożywce powoduje w niektórych przypadkach całkowity zanik zdolności do syntezy cytochromów, podobny wpływ ma obniżanie ciśnienia tlenu nad pożywką (76). Kleczkowska, Wiaterowa i Bagdasarjan wykazali u *Corynebacterium diphtheriae* (53), gdzie oksydazą końcową jest cytochrom $a + a_3$, że stosunek cyt. a_3 /cyt. a dla szczepu C 24 w obecności żelaza w pożywce wynosił $4,1 \times 10^{-3}$, zaś bez żelaza $2,6 \times 10^{-3}$. Dla szczepu PW8 stosunki te wynosiły odpowiednio $1,0 \times 10^{-3}$ i $0,2 \times 10^{-3}$. Zatem zawartość cytochromów u tego samego gatunku zależy od rodzaju szczepu, a dla tego samego szczepu — od warunków hodowli.

Jak już wspomniano cytochromy biorące udział w oddychaniu tlenowym bakterii ulokowane są wyłącznie w błonie bakteryjnej. Wyjątkiem od tej reguły wydawał się system oddechowy *Rhodospirillum rubrum*, w skład którego wchodzi między innymi cytochrom zwany RHP (*Rhodospirillum rubrum haem protein*). Po rozbiciu komórki występuje on we frakcji rozpuszczalnej, nie jest więc związany ani z błoną komórkową ani z cząstkami (7, 79). Cytochrom RHP ma hem grupy C z pasmem absorpcji przy 545 m μ i masę cząsteczkową 12 900 (38). W formie zredukowanej wykazuje zdolność do samoutleniania tlenem cząsteczkowym, częściowo hamowaną przez tlenek węgla. Jednocześnie RHP posiada zdolność wiązania CO, wykazuje więc cechy oksydazy cytochromowej (39, 44, 45).

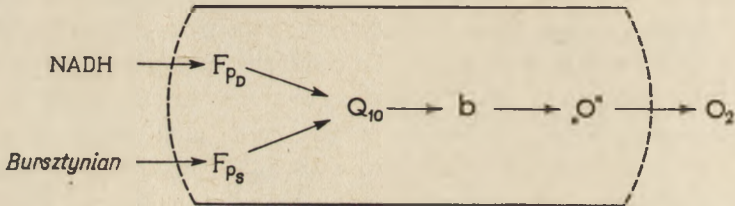
Horio i Kamenowi udało się wyizolować enzym redukujący RHP elektronami pochodzącymi z NADH. Enzym ten — reduktaza NADH: hemoproteid wykazywał aktywność w stosunku do cytochromu c, cytochromu c_2 (pochodzącego z *Rhodospirillum rubrum*), RHP i 2,6-dwuchlorofenolindofenolu (38, 39). Wyizolowany enzym jest flawoproteidem, którego grupą prostetyczną jest FMN. Jego masa cząsteczkowa wynosi 32 000. Podobnie jak RHP enzym ten nie jest związany z błoną, występuje on we frakcji rozpuszczalnej komórki. Według sugestii wymienionych autorów enzym ten współdziałając z RHP tworzy układ oksydazy NADH, utleniającej NADH w myśl równania:



Cechą wyraźnie odróżniającą ten układ od innych poznanych jest to, że składa się on z fragmentów rozpuszczalnych, niezwiązanych z błoną.

Smith (75) zwróciła jednak uwagę, że *Rhodospirillum rubrum* rosnąc w ciemności aktywnie zużywa tlen. W tak hodowanych komórkach nie udało się jej stwierdzić występowania widma kompleksu RHP-CO. Kikuchi, Saito i Mokotawa (52) uważają, że u *Rhodospirillum rubrum* i *Rhodospirillum spheroides* RHP nie pełni funkcji oksydazy cytochromowej, ponieważ stwierdzili w cząstkach otrzymanych z tych bakterii widmo funkcjonalne charakterystyczne dla oksydazy z hemem grupy A.

Aby wyjaśnić te sprzeczności w 1965 roku Taniguchi i Kamena (79) przebadali własności łańcucha oddechowego zawartego w komórkach *Rhodospirillum rubrum* rosnących w ciemności (wzrostowi heterotroficznie bez asymilacji towarzyszy u tych bakterii znacznie większe zużycie tlenu niż przy wzroście na świetle). Okazało się, że układy oksydazy NADH i oksydazy bursztynianowej zawarte są w błonie komórkowej, w której jako składnik hemowy występuje głównie cytochrom grupy B. Autorzy stwierdzili, że tylko 50% redukującego się substratami oddechowymi cytochromu b ma zdolność wiązania tlenu węgla, ponadto w niskich temperaturach otrzymali rozszczepienie pasm w widmie cytochromu b. Zdaniem Taniguchi i Kamena wskazuje to, że u *Rhodospirillum rubrum* występują dwa cytochromy B, z których jeden, posiadający zdolność wiązania CO, odgrywa rolę oksydazy cytochromowej.



Schemat 5. Łańcuch oddechowy w cząstkach z *Rhodospirillum rubrum* (wg 7)
„O” — cytochrom typu b, pełniący funkcję oksydazy cytochromowej; pozostałe objaśnienia jak w schemacie 3

Schemat 5 przedstawia zaproponowany ostatnio przez Taniguchiego i Kamena łańcuch oddechowy *Rhodospirillum rubrum*. W skład jego wchodzi flawoproteidy, ubichinon UQ₁₀ i cytochromy B, z których cytochrom oznaczony „O” posiada własności oksydazy cytochromowej. Okazało się więc, że RHP nie jest oksydazą końcową w oddychaniu bakteryjnym, a łańcuch oddechowy również w wypadku *Rhodospirillum rubrum* jest zlokalizowany w cząstkach, pochodzących z błony komórkowej.

IV. Wnioski końcowe

W bakteryjnych układach oddechowych występują te same typy przenośników, co w mitochondriach. Są to nukleotydy nikotynamidoadeninowe, flawiny i cytochromy. Tablica 5 podaje zawartość przenośników

T a b l i c a 5

Zawartość nośników elektronowych w preparatach oddechowych bakterijnych i zwierzęcych

Źródło preparatu	Rodzaj preparatu	w μmolech/mg białka					Lite- ratura
		Flawiny	Chinony	Cytochromy typu c	Cytochromy typu b	Cytochromy typu a	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Wyciąg bezko- mórkowy (homo- genat)	0,3	2,4	6,31	0,0	0,0	62
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Małe cząstki oddechowe	2,00	8,9	1,62	1,59	1,15	4
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Małe cząstki oddechowe	0,60	0,30	0,10—0,15	0,30—0,46	0,0	79
<i>Mycobacterium phlei</i>	Małe cząstki oddechowe	0,68	12,0	0,62	0,18	0,57	1
Serc wołu	Preparat Keilina-Hartree	0,35	4,0—6,0	0,56	0,59	a; 0,85 a ₃ ; 1,05	51
Serce wołu	Mitochondria	0,45	3,4—4,0	0,65	0,60	a; 0,80 a ₃ ; 1,13	51

* cytochrom spektralnie zaliczony do typu c, jednakże pochodna pirydynowa jego zredukowanej formy zbliżona do identycznych pochodnych typu b.

oksydoredukcyjnych występujących w niektórych bakteryjnych preparatach oddechowych. Wartości te zostały porównane z danymi odnoszącymi się do niefosforylującego preparatu oddechowego Keilina-Hartree z serca wołu oraz do mitochondriów z serca wołu.

Zawartość przenośników oksydoredukcyjnych w poszczególnych bakteryjnych preparatach oddechowych w przeliczeniu na mg białka (z wyjątkiem cząstek z *Azotobacter vinelandii*) zbliżona jest do wartości otrzymanych dla preparatów pochodzenia zwierzęcego.

Stalość stężeń przenośników i stosunków pomiędzy nimi w mitochondrium zwierzęcym, skłoniły Greena (31, 33) do postawienia ogólnie dziś przyjętej hipotezy, że enzymy zwierzęcego łańcucha oddechowego występują w mitochondriach zgrupowane w postaci kompleksów o stałych stosunkach składników (*electron transport particles* ETP). Błona mitochondrialna składa się według Greena (34) z białka strukturalnego inkrustowanego ETP. Poza tym w skład błony wchodzi lipidy, również w określonym stosunku stechiometrycznym do składników ETP. A zatem w strukturze mitochondriów powtarzają się identyczne kompleksy przenoszące elektrony.

W odniesieniu do bakterii podobną hipotezę stawiają Brodie i wsp. (1, 3, 48). Uważają oni, że błona bakteryjna odpowiada błonie mitochondrialnej i że do jej lipidowo-białkowej struktury dołączone są bakteryjne cząstki oddechowe — homologiczne z cząstkami ETP. Cząstki te w odpowiednich warunkach dają się oderwać od błony i one to stanowią tak zwane małe cząstki. Dużymi cząstkami są fragmenty błony z nieoderwanymi małymi cząstkami.

Znana zależność między ilością poszczególnych enzymów bakteryjnych a warunkami hodowli mikroorganizmu dotyczy również enzymów łańcucha oddechowego bakterii. White i Smith wykazali, że u *Haemophilus parainfluenzae* stosunki ilościowe między dehydrogenazami (86, 88), stężenia cytochromów w komórkach tej bakterii (85, 87) i w cząstkach oddechowych (88), zależne są od warunków hodowli. Interesującą cechą cząstek oddechowych otrzymanych z *Haemophilus parainfluenzae* jest duża łatwość uwalniania z ich struktury dehydrogenaz D-mleczanowej i L-mleczanowej. Cząstki oddechowe bakterii nie wykazują więc stałości składu enzymatycznego. W związku z tym White (86) przyjmuje, że w bakteryjnych układach oddechowych nie występuje wielokrotnie powtarzająca się jednostka transportu elektronów (ETP), zawierająca poszczególne przenośniki elektronów w stałym stechiometrycznym stosunku. Autor ten sugeruje, że tworzenie się bakteryjnego cząstkowego układu oddechowego zachodzi raczej przez zespalanie się ze sobą poszczególnych składników — dehydrogenaz i cytochromów w stosunkach zależnych od warunków hodowli (86). Zmienność składu bakteryjnego układu oddechowego — cecha zasadniczo różniąca go od układu mitochondrialnego — jest wyrazem znacznej plastyczności fizjologicznej mikroorganizmów.

Układ oddechowy bakterii tlenowych, zlokalizowany w błonie cytoplazmatycznej, chociaż znacznie bardziej zróżnicowany, spełnia podobną funkcję jak układ oddechowy mitochondriów.

LITERATURA

1. Asano A., Brodie A. F., *J. Biol. Chem.* **239**, 4280 (1964).
2. Asano A., Brodie A. F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 121 (1965).
3. Asano A., Kaneshiro T., Brodie A. F., *J. Biol. Chem.* **240**, 895 (1965).
4. Azerad R., Bleiler-Hill R., Lederer E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 194 (1965).
5. Azerad R., Guerin M., Lederer E., dane nieopublikowane (cyt. wg poz. 4).
6. Axelrod B., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, tom 1, Academic Press, New York, 1955, str. 19.
7. Bartsch R. G., Kamen M. D., *J. Biol. Chem.* **230**, 41 (1958).
8. Benziman M., Galanter Y., *J. Bacteriol.* **88**, 1010 (1964).
9. Benziman M., Perez L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 127 (1965).
10. Brodie A. F., *J. Biol. Chem.* **234**, 358 (1959).
11. Brodie A. F., Gray C. T., *J. Biol. Chem.* **218**, 853 (1956).
12. Brodie A. F., Russel P., J., *Proceedings of the Vth Internatl. Congress of Biochemistry (Moscow 1961)*, tom 5, Pergamon Press Oxford, PWN, Warszawa 1963, str. 89.
13. Brown J. W., *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 97 (1965).
14. Cohn D. V., *J. Biol. Chem.* **221**, 413 (1956).
15. Cohn D. V., *J. Biol. Chem.* **233**, 299 (1958).
16. Crane F. L., w *Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport*, red. G. E. W. Wolstenholme, C. M. O'Connor, J. and A. Churchill, Londyn 1961, str. 36.
17. Crane F. L., *Biochemistry* **1**, 510 (1962).
18. Crane F. L., w *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, tom II, cz. 2, red. R. T. Holman, Pergamon Press, New York 1964, str. 267.
19. Dockstader W. B., Halvorson H. O., *Science* **112**, 618 (1953).
20. Dolin M. I., w *The Bacteria*, tom 2; red. I. C. Gunsalus, R. Y. Stanier, Academic Press, New York 1961, str. 319.
21. Dolin M. I., w *Proceedings of the Symposium on Flavins and Flavoproteins*, Amsterdam, The Netherlands, June 10—15 1965, (w druku).
22. Dolin M. I., *Arch. Biochem. Biophys.* **55**, 415 (1955).
23. Downey R. J., *J. Bacteriol.* **84**, 953 (1964).
23. Downey R. J., *J. Bacteriol.* **88**, 904 (1964).
25. Francis M. J. O., Hughes D. E., Kornberg H. L., Phizackerley P. J. R., *Biochem. J.* **89**, 430 (1963).
26. Francis M. J. O., Phizackerley P. J. R., *Biochem. J.* **92**, 2 (1965).
27. Francis M. J. O., Phizackerley P. J. R., *Biochem. J.* **95**, 25P (1965).
28. England S., Breiger H. H., *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 571 (1962).
29. Gale P. H., Arison B. H., Trenner N. R., Page A. C. Jr., Folkers K., Brodie A. F., *Biochemistry* **2**, 200 (1963).
30. Gelman N. S., Łukojanowa M. A., Ostrowskij D. N., *Dichatielnyj aparat baktierij*, wyd. Nauka 1966.
31. Green D. E., Fleischer S., w *Methabolic Pathway*, tom 1, red. D. M. Greenberg, Academic Press, New York 1960, str. 41.

32. Green D. E., w Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport, red. G. E. W. Wolstenholme, C. M. O'Connor, J. and A. Churchill, Londyn 1961, str. 130.
33. Green D. E. w Horizons in Biochemistry, red. M. Kasha, B. Pullman, Academic Press, New York 1962, str. 381.
33. Green D. E. w Horizons in Biochemistry, red. M. Kasha, B. Pullman, Academic (Moscow 1961), tom 9, Pergamon Press Oxford, PWN Warszawa 1963, str. 9.
35. Hauge J. G., *J. Biol. Chem.* **239**, 3630 (1964).
36. Hauge J. G., Hallberg P. A., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 251 (1964).
37. Hauge J. G., Muller E. H., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 244 (1964).
38. Horio T., Kamen M. D., *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 382 (1960).
39. Horio T., Kamen M. D., *Biochemistry* **1**, 1141 (1962).
40. Hulme A. C., Jones J. D., w Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds — Proceedings of the Plant Phenolic Group Symposium red. J. B. Pridham, Pergamon Press, 1963, str. 120.
41. Jones C. W., Redfearn E. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **113**, 467 (1966).
42. Jones C. W., Redfearn E. R., Abstracts of Communications, Third Meeting of FEBS Warsaw, April 4-th-7th, Academic Press Londyn, PWN Warszawa 1966, str. 117.
43. Jurtschuk P., Denton C., Norrod E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (w druku).
44. Kamen M. D., w Biological Structure and Function — Proceedings of the first IUB/IUBS International Symposium, tom 2, Academic Press, New York 1960, str. 277.
45. Kamen M. D., Bortsch R. G., w Haematin Enzymes — Symposium of IUB, tom 1, red. J. E. Falk, R. Lemberg, R. K. Morton, Pergamon Press Oxford 1961, str. 419.
46. Kaniuga Z., *Post. Biochem.* **10**, 7 (1964).
47. Kashket E. R., Brodie A. F., *J. Bacteriol.* **83**, 1094 (1962).
48. Kashket E. R., Brodie A. F., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 52 (1963).
49. Kashket E. R., Brodie A. F., *J. Biol. Chem.* **239**, 2564 (1964).
50. Kimura T., Tobari J., *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 399 (1963).
51. King T. E., *J. Biol. Chem.* **239**, 1989 (1964).
52. Kikuchi G., Saito Y., Mokotawa Y., *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 1 (1965).
53. Kleczkowska H., Wiaterowa A., Bagdasarian G., *Acta Microbiologica Polonica* **14**, 117 (1965).
54. Klingenberg M., Symposium Biochemistry of Mitochondria, Third Meeting of FEBS, Warsaw, April 8th—9th 1966 (w druku).
55. Klingenberg M., Kroger A., Abstracts of Communications, Third Meeting of FEBS, Warsaw, April 4th—7th 1966, Academic Press Londyn, PWN Warszawa 1966, str. 108.
56. Kogut M., Podoski E. P., *Biochem. J.* **55**, 800 (1953).
57. Kornberg H. L., *Ann. Rev. Microbiol.* **13**, 49 (1959).
58. Kornberg H. L., Gotto A. M., *Biochem. J.* **78**, 69 (1961).
59. Kornberg H. L., Phizackerley P. J. R., *Biochem. J.* **79**, 10P (1961).
60. Krebs H. A., Abstracts of Communications, Third Meeting of FEBS, Warsaw, April 4th—7th 1966, Academic Press, Londyn, PWN Warszawa 1966, str. 143.
61. Kröger A., Klingenberg M., Abstracts of Communications, Third Meeting of FEBS, Warsaw April 4th—7th 1966, Academic Press, Londyn, PWN Warszawa 1966, str. 114.

62. Kurup C. K., Vaydyanthan C. S., Ramasarma T., *J. Biol. Chem.* (w druku).
63. Lehninger A. L., *The Mitochondrion*, W. A. Benjamin Inc. New York-Amsterdam 1964.
64. Lieberman M., Baker J. E., *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **16**, 343 (1965).
65. Marr A. G., *Ann. Rev. Microbiol.* **14**, 241 (1960).
66. Mitchell P., *Ann. Rev. Microbiol.* **13**, 407 (1959).
67. Newton W. J., Kamen M. D., w *The Bacteria*, tom 2, red. I. C. Gunslaus, R. Y. Stanier, Academic Press, New York 1961, str. 397.
68. Nichols P., w *The Enzymes*, tom 8, cz. B, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, Academic Press, New York 1965, str. 3.
69. Pappenheimer A. M., Howland J. L., Miller P. A., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 229 (1962).
70. Redfearn E. R., *Proceedings of Vth Internatl. Congress of Biochemistry (Moscow 1961)*, tom 5, Pergamon Press, Oxford, PWN Warszawa 1963, str. 69.
71. Redfearn E. R., *Symposium Biochemistry of Mitochondria, Third Meeting of FEBS, Warsaw, April 8th—9th 1966* (w druku).
72. Redfearn E. R., Pumphrey A. M., Fynn G. H., *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 404 (1960).
73. Redfearn E. R., Whittaker P. A., *Abstracts of Communications, Third Meeting of FEBS, Warsaw April 4th—7th 1966*, Academic Press Londyn, PWN Warszawa 1966, str. 113.
74. Siegel L., Englard S., *Biochim. Biophys. Acta* **54**, 67 (1961).
75. Smith L., dyskusja, Kamen M. D., Bortsch D. G., w *Haematin Enzymes-Symposium of IUB, Canberra 1959*, tom 1, red. J. E. Falk, R. Lemberg, R. K. Morton, Pergamon Press Oxford, 1961, str. 419.
76. Smith L., w *The Bacteria*, tom 2, red. I. C. Gunslaus, R. Y. Stanier, Academic Press, New York 1961, str. 365.
77. Smith L., White D. C., *J. Biol. Chem.* **237**, 1337 (1962).
78. Szarkowska L., *Post. Biochem.* **10**, 77 (1964).
79. Taniguchi S. Kamen M. D., *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 395 (1965).
80. Tissières A., w *Haematin Enzymes-Symposium of IUB, Canberra 1959*, tom 1, red. I. E. Falk, R. Lemberg, R. K. Morton, Pergamon Press Oxford 1961, str. 218.
81. Tissières A., Hovenkamp H. G., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 336 (1957).
82. Tissières A., Watson J. D., Schlessinger D., Hollingworth B. R., *J. Mol. Biol.* **1**, 221 (1959).
83. Tobari J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 50 (1964).
84. Weibull C., *J. Bacteriol.* **66**, 137 (1953).
85. White D. C., *J. Bacteriol.* **83**, 851 (1960).
86. White D. C., *J. Biol. Chem.* **239**, 2055 (1964).
87. White D. C., Smith L., *J. Biol. Chem.* **237**, 1332 (1962).
88. White D. C., Smith L., *J. Biol. Chem.* **239**, 3956 (1964).
89. Worcel A., Goldman D. S., Cleland W. W., *J. Biol. Chem.* **240**, 3399 (1965).
90. Wosilait W. D., *J. Biol. Chem.* **235**, 1196 (1960).
91. Yamanura Y., Kusunose E., *J. Biochem.* **41**, 513 (1954).
92. Yoshida A., *J. Biol. Chem.* **240**, 1113 (1965).
93. Yoshida A., *J. Biol. Chem.* **240**, 1118 (1965).
94. Zagórski W., Michalska-Trenkner E., Suchanek B., Kaniuga Z., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **13** (No 9) 495 (1965).

ANDRZEJ GARDAS *

Mechanizm działania enzymów flawinowych

Mechanism of Action of Flavin Enzymes

PANU PROFESOROWI JÓZEFOWI HELLEROWI
Z OKAZJI 70-TEJ ROCZNICY URODZIN

The recent developments in the study of action of some flavin enzymes are reviewed.

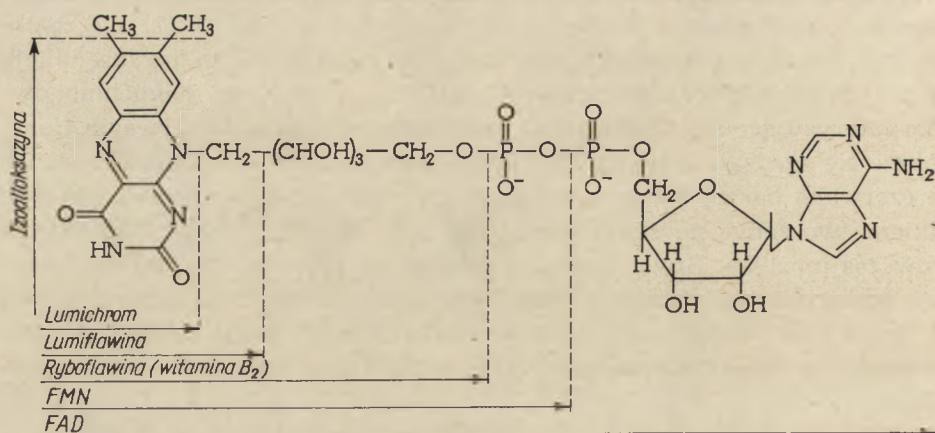
Od wyizolowania w 1932 roku przez Warburga i Christiana (100, 101) pierwszego enzymu z flawinowym koenzymem wyodrębniono około 60 flawoproteidów katalizujących różnorodne reakcje oksydoredukcji (25). Początkowo sądzono, że można wszystkim enzymom flawinowym przypisać wspólny mechanizm działania. Według tego mechanizmu utleniona flawina przyjmując dwa elektrony i dwa protony od substratu redukowałaby się do bezbarwnej formy, a następnie utleniała, oddając dwa elektrony i dwa protony akceptorowi. Już w 1937 roku stwierdzenie Haasa (31), że „stary żółty enzym Warburga” w reakcji z NADPH tworzy czerwono zabarwioną formę pośrednią podważyło słuszność proponowanego mechanizmu. Kilka lat wcześniej Michaelis (71, 72) opublikował teorię o jednoelektronowym przebiegu reakcji oksydoredukcji. W przypadku flawin utlenianie zachodziłoby przez formy semichinonowe charakteryzujące się silnym czerwonym zabarwieniem. Obserwacja Haasa dobrze się zgadzała z teorią Michaelisa, jednak doświadczalne wykazanie, że czerwona barwa formy pośredniej „starego żółtego enzymu” jest wynikiem tworzenia się semichinonu nie było ze względów metodycznych wówczas możliwe. Stwierdzono to dopiero po opracowaniu szybkich metod spektrofotometrycznych umożliwiających uchwycenie zmian widma w czasie kilku milisekund i zastosowaniu techniki spektroskopii elektro-nowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) do badania wolnych rodników.

* Mgr, st. asystent Zakładu Enzymatyki Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Wyniki prowadzonych od 10 lat badań Beinerta, Chansa, Hemmricha, Massey'a i wielu innych zostały podsumowane w 1965 roku na Sympozjum na temat Flawin i Flawoproteidów (44). Stwierdzono, że mechanizm reakcji jest różny dla różnych enzymów flawinowych i nie jest możliwe przyjęcie jakiegoś ogólnego schematu dla wszystkich flawoproteidów. Wykazano, że oprócz flawiny w wielu enzymach flawinowych w transporcie elektronów biorą udział inne przENOŚniki jak żelazo, molibden i grupy tiolowe. Również dawny spór o jedno lub dwuelektronowy przebieg reakcji stracił znaczenie jeżeli nie we wszystkich, to przynajmniej w wielu przypadkach. Wykazano, że flawina w niektórych flawoproteidach nie występuje w cyklu reakcji w formie całkowicie utlenionej lub całkowicie zredukowanej, natomiast reaguje jako całość układ flawina-żelazo lub flawina-grupy tiolowe. A zatem chociaż oksydoredukcja flawiny zachodzi jednoelektronowo, enzym katalizuje przeniesienie dwu elektronów w jednym cyklu reakcji. Równoczesne zastosowanie metod spektrofotometrycznych i techniki elektronowego rezonansu magnetycznego pozwoliło na określenie roli metali (żelazo, molibden) w niektórych enzymach flawinowych. Wydaje się, że mechanizm działania enzymów zawierających metal różni się od mechanizmu działania enzymów nie zawierających metalu. W artykule tym zostanie omówionych kilka najlepiej poznanych enzymów flawinowych obydwu grup ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów reakcji.

I. Niektóre własności fizyczne i chemiczne flawin i flawoproteidów

W materiale biologicznym występują głównie dwa związki flawinowe — mononukleotyd flawinowy (FMN) i dwunukleotyd flawinoadeninowy (FAD). W mleku, moczu, siatkówce oka znaleziono także wolną rybo-

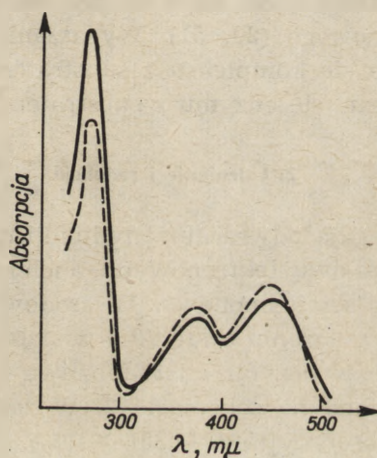


Schemat 1. Budowa i nomenklatura flawin i ich pochodnych

flawinę, która nie jest jednak koenzymem żadnego z dotąd poznanych enzymów. Ryboflawina jak również FAD i FMN pod wpływem światła hydrolizują do lumiflawiny w środowisku kwaśnym i lumichromu w środowisku zasadowym. Budowę oraz nomenklaturę flawin i ich pochodnych przedstawia schemat 1.

1. Absorpcja światła

Charakterystyczny żółty kolor flawin i flawoproteidów spowodowany jest pochłanianiem światła w fioletowej i niebieskiej części widma przez pierścień izoalloksazynowy (93). Maksima absorpcji występują przy długości fali 260, 370 i 450 m μ , boczne podstawniki wpływają tylko w niewielkim stopniu na położenie i wielkość maksimumów. Na rysunku 1 przedstawione jest widmo absorpcyjne obu nukleotydów flawinowych w formie utlenionej.

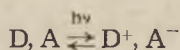


Rys. 1. Widmo absorpcyjne utlenionej formy nukleotydów flawinowych — FAD, — — — FMN

Widma flawoproteidów zwykle odbiegają od widm wolnych flawin, nawet wtedy, gdy porównujemy różnicowe krzywe absorpcji holo- i apoenzymu, pozwalające na wyeliminowanie pasm absorpcyjnych innych grup prostetycznych niż flawina. Przyczyną tego może być: a) samo powiązanie flawiny z białkiem, b) tworzenie się kompleksów przeniesienia ładunku z innymi grupami czynnymi enzymu.

Pierwsza przyczyna jest mniej istotna. Wywołane zmiany są zwykle niewielkie i polegają na poszerzaniu pasm absorpcji i rozmyciu widma. Znacznie większe znaczenie ma wytwarzanie się kompleksów przeniesienia ładunku. Są to połączenia typu donor — akceptor elektronów, w których

występuje częściowe przesunięcie elektronu. Siła wiązania w tych kompleksach nie przekracza zwykle 2kcal/mol (53). Kompleksy takie mogą się tworzyć z grupami tiolowymi, pierścieniem imidazolowym histydyny, NAD^- lub NADP^+ . Charakterystyczną cechą tych kompleksów jest powstawanie nowych pasm absorpcyjnych, nie występujących w widmach obydwu składników kompleksu (52, 92). Powstawanie nowych maksimumów absorpcyjnych jest wynikiem przeniesienia elektronu od donora do akceptora pod wpływem światła.



Formy utlenione flawin wykazują żółtozieloną fluorescencję, której maksimum wzbudzenia przypada przy 440m μ długości fali, a maksimum emisji przy 530—560m μ . Po połączeniu flawiny z białkiem fluorescencja ulega jednak znacznemu wygaszeniu (94). Mitochondria i fragmenty submitochondrialne wykazują 4% fluorescencji uwolnionych z nich flawin (20). Mimo to pomiar fluorescencji znajduje zastosowanie w badaniach mitochondrialnych flawoprotein, gdyż nie interferują wówczas inne składniki łańcucha oddechowego (20, 51). Wygaszanie fluorescencji enzymu wskutek wytworzenia się kompleksu z substratem jest często stosowaną metodą badania łączenia się enzymu z substratem.

2. Utlenianie i redukcja

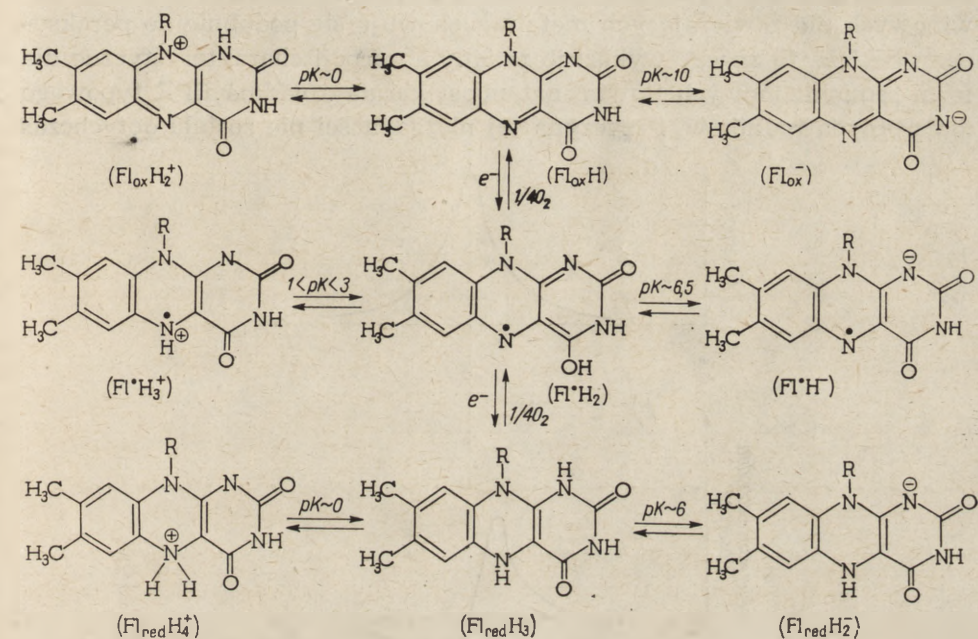
Flawiny łatwo ulegają odwracalnej redukcji do leukozwiązku. Wolne flawiny są akceptorami dwuelektronowymi, a ich redukcja zachodzi w dwu etapach przez formy semichinonowe. W środowisku kwaśnym flawiny przyłączają proton w położeniu 5 lub 10 a w słabo kwaśnym lub alkalicznym odłączają proton w pozycji 1 i 3. Możliwe formy flawin i ich stałe dysocjacji przedstawiono na schemacie 2. W zależności od pH zmienia się również widmo absorpcyjne (34, 35).

Potencjał oksydoredukcyjny wynosi w pH 7 dla FMN — 0,219V (47) ale po połączeniu z enzymem może ulegać znacznym zmianom i np. dla „starego żółtego enzymu” wynosi 0,059, a dla dehydrogenazy NADH około 0,0V(19a).

W 1956 B e i n e r t (4a) badając utlenienie FMNH_2 przez tlen stwierdził powstawanie pasma absorpcji o maksimum przy długości fali 570m μ . Absorpcja była największa w czasie gdy połowa FMNH_2 została utleniona i zanikała przy dalszym utlenieniu. Podobne zmiany w widmie zachodziły podczas redukcji FMN dwutioninem, cynkiem, amalgamatem sodu (33). Dalsze badania w pracowni B e i n e r t a (4a, 4), E h r e n b e r g a (26a, 56), M a s s e y ' a (63, 69) pozwoliły na przypisanie absorpcji w 570 m μ dawniej już postulowanym formom semichinonowym flawin (48, 72).

Własności optyczne flawin pozwalają na określenie i ilościowe oznaczenie formy flawin biorących udział w reakcji katalizowanej przez dany

enzym. W wielu enzymach flawinowych stwierdzano już dawniej występowanie zmian w widmie w czasie reakcji z substratem (64, 69, 89). Jednakże nie można było zmian tych przypisać określonej zmianie struktury chemicznej. W ostatnich latach rozległe zastosowanie w badaniu enzymów flawinowych znalazła technika EPR. Służy ona do wykrywania i charakteryzowania wolnych rodników, tzn. związków posiadających niesparo-



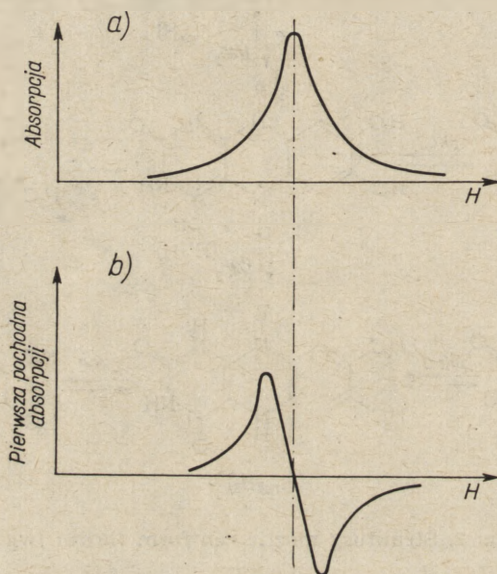
Schemat 2. Struktury możliwych form flawin (wg 35)

wany elektron na zewnętrznej orbicie (39). Jeżeli cząsteczka znajdzie się w polu magnetycznym, to nastąpi rozdzielanie elektronów na dwie grupy, jedną o spinie $+1/2$ i drugą o spinie $-1/2$. Różnica energii między tymi grupami będzie wynosić $1/2 gBH$ (H — natężenie pola magnetycznego, B — magneton Bohra, g — stała charakterystyczna dla wszystkich rodników wynosząca teoretycznie 2,0023 lecz zmieniająca się w zależności od pola magnetycznego samej cząsteczki). Jeśli próbkę umieszczoną w polu magnetycznym naświetlimy promieniowaniem o częstotliwości ν , to przy warunku $\nu = gBH$ część elektronów przejdzie z niższego poziomu energetycznego na wyższy i nastąpi absorpcja promieniowania. Ze względów technicznych stosuje się źródło promieniowania o stałej częstotliwości (zwykle 9000MHz, co odpowiada długości fali 3cm), a zmienia się natężenie pola magnetycznego. Otrzymuje się krzywe absorpcji, lub ze względów praktycznych — krzywe pierwszej pochodnej absorpcji (rysunek 2).

Współdziałanie spinu elektronowego i jądrowego powoduje rozszczepienie poziomów energetycznych na podpoziomy i krzywe absorpcji mogą

wykazywać kilka maksimum. Obniżenie temperatury zwiększa znacznie czułość tej metody. Typ krzywej absorpcji i wyliczona z niej wartość g dają dobrą charakterystykę badanego rodnika.

Dolin (26) obserwował wprawdzie zmiany widma w czasie reakcji peroksydazy NADH z substratem, jednakże nie mógł wykryć wolnych rodników metodą spektroskopii EPR. Przypuszczał zatem, że zmiany absorpcji nie są związane z formą semichinonową flawin. Większość enzymów flawinowych nie zawierających metalu zachowuje się podobnie do peroksydazy NADH, to znaczy wykazuje zmiany absorpcji charakterystyczne dla form semichinonowych flawin, natomiast nie daje widma EPR typowego dla wolnych rodników. Przyczyna tej niezgodności nie została dotychczas



Rys. 2. Typy krzywych otrzymywanych techniką EPR
1 — krzywa absorpcji, 2 — krzywa pierwszej pochodnej absorpcji

wyjaśniona. Być może wytwarza się kompleks przeniesienia ładunku o widmie zbliżonym do widma formy semichinonowej (52) lub też, co wydaje się bardziej prawdopodobne, technika EPR nie wykrywa wszystkich wolnych rodników. Jeżeli np. dwa wolne rodniki znajdują się bardzo blisko siebie i możliwa jest między nimi wymiana energii stanów wzbudzonych technika EPR może być za mało czuła do ich wykrycia (4, 39).

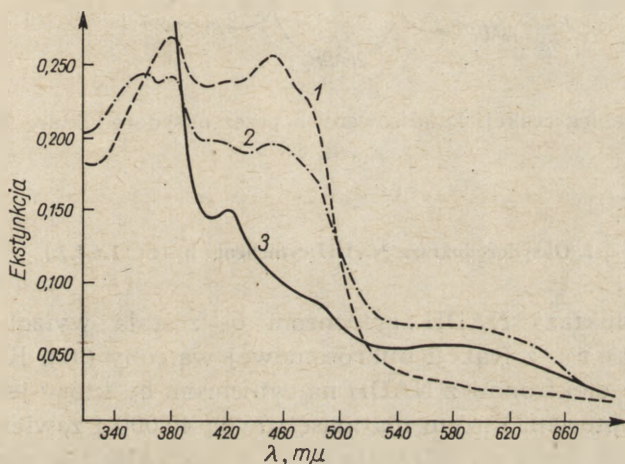
II. Enzymy flawinowe nie zawierające metalu

Z licznych enzymów flawinowych nie zawierających metalu zostaną omówione cztery: oksydoreduktaza NADH: cytochrom c , oksydoreduktaza NADH: cytochrom b_5 , dehydrogenaza lipoamidu i dehydrogenaza glutationu.

1. Oksydoreduktaza NADH:cytochrom c (EC 1.6.99.1)

Wyizolowana w 1959 roku w pracowni K a m i n a oksydoreduktaza NADH: cytochrom c (41, 103, 104) jest fragmentem układu enzymatycznego mikrosomów katalizujących reakcje oksydatywnej hydroksylacji i demetylacji (41) przy udziale NADPH. Naturalny akceptor elektronów tego enzymu nie jest znany, sztucznym akceptorem może być cytochrom c, żelazicyjanek, menadion, lub 2,6-dwuchlorofenolaindofenol. Grupą prostetyczną tego enzymu jest FAD w ilości 2 mole na mol enzymu (62). W transporcie elektronów katalizowanych przez oksydoreduktazę NADPH: cytochrom c grupy tiolowe prawdopodobnie nie biorą udziału, ponieważ odczynniki reagujące z nimi nie hamują tego procesu (40).

Rysunek 3 przedstawia zmiany widma podczas miareczkowania substratem oczyszczonej oksydoreduktazy NADPH: cyt. c w warunkach beztlenowych.



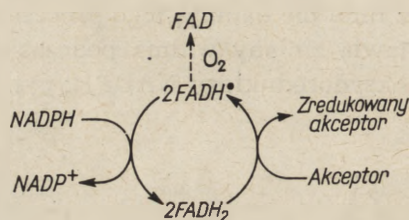
Rys. 3. Miareczkowanie oksydoreduktazy NADPH: cyt. c substratem w beztlenowych warunkach (62)

1 — bez substratu (forma utleniona), 2 — po dodaniu 0,5M NADPH (forma semichinonowa), 3 — po dodaniu 1M NADPH (na 1 mol flawiny enzymu (forma zredukowana))

Po dodaniu NADPH w ilości 0,5 mola na 1 mol FAD enzymu absorpcja przy długości fali 450m μ spada i pojawia się nowe maksimum przy 580m μ (krzywa 2). Zmiany te świadczą o redukcji FAD do formy semichinonowej. Występowanie FADH \cdot (semichinonu) zostało potwierdzone metodą spektroskopii EPR (62). Po dalszym dodaniu NADPH w ilości 1 mola na 1 mol FAD enzymu otrzymuje się krzywą 3, charakterystyczną dla formy odpowiadającej całkowicie zredukowanej flawinie (FADH $_2$). Gdy do zredukowanego enzymu dodać akceptora elektronów (np. tlenu, menadionu) otrzymuje się krzywą absorpcji identyczną z krzywą 2, charakterystyczną dla semichinonu. Świadczy to o utlenianiu FADH $_2$ do FADH \cdot . Ostatnia forma

jest trwała i nie utlenia się do FAD pod wpływem cytochromu c, menadionu, żelazicyjanku ani 2,6-dwuchlorofenoloinodofenolu (61). Trwałość formy semichinonowej wskazuje, że w enzymie natywnym jest ona formą najbardziej utlenioną. Podczas izolowania enzymu FADH[•] przechodzi w FAD, toteż koenzymem utlenionej formy oczyszczonego enzymu jest FAD.

Na podstawie przytoczonych danych Kamin proponuje (40, 62) schemat reakcji katalizowanych przez oksydoreduktazę NADPH: cytochrom c, według którego substrat tworzy kompleks z enzymem i redukuje semichinonową formę flawiny do FADH₂, a akceptor utlenia zredukowany enzym do semichinonu (schemat 3).



Schemat 3. Przebieg reakcji katalizowanych przez oksydoreduktazę NADPH: cyt. c (wg 62)

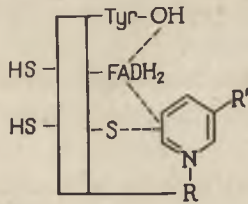
2. Oksydoreduktaza NADH:cytochrom b₅ (EC 1.6.2.2.)

Oksydoreduktaza NADH:cytochrom b₅ została wyizolowana przez Strittmatera z frakcji mikrosomowej wątroby (91). Katalizuje ona przeniesienie elektronów z NADH na cytochrom b₅, który jest jego biologicznym akceptorem. Enzym ma masę równą 40 000 i zawiera jedną cząsteczkę flawiny łatwo odszczepiającą się w środowisku kwaśnym. Apoenzym można reaktywować po dodaniu FAD (87). W wiązaniu koenzymu z białkiem bierze udział reszta tyrozyny (86), gdyż podstawienie jednej fenolowej grupy tyrozyny jodem całkowicie uniemożliwia połączenie się apoenzymu z FAD. Substrat (NADH) tworzy z apoenzymem kompleks, którego stała dysocjacji jest równa 10⁻⁷. Kompleks ten daje silną fluorescencję wywołaną obecnością NADH, nie wykazuje natomiast wywoływanych obecnością flawiny zmian w widmie absorpcyjnym powyżej długości fali 300mμ (88). Dodanie jednego mola PCMB na mol kompleksu powoduje jego rozpad, co wskazuje, że w jego tworzeniu się bierze udział jedna grupa -SH (90).

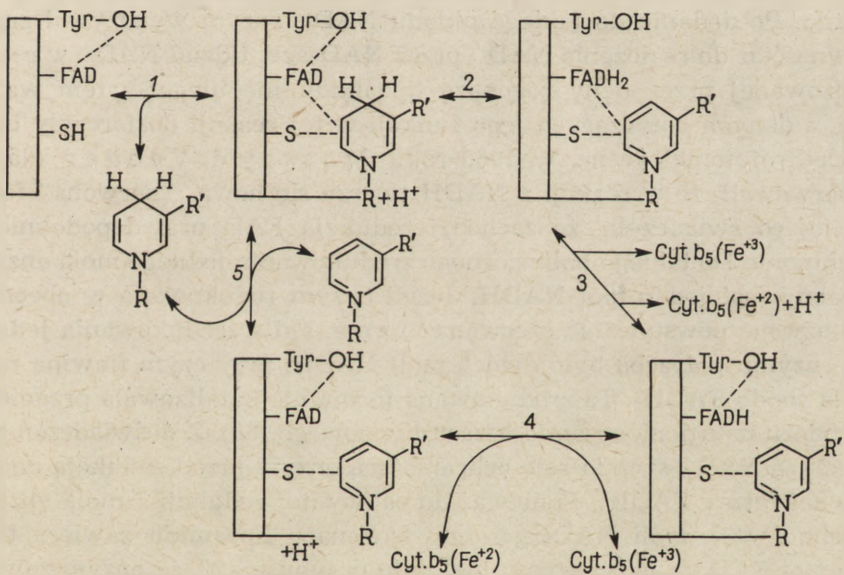
Podobny kompleks z NADH tworzy holoenzym, jednak, na skutek wzajemnego oddziaływania NADH i flawiny jego właściwości są odmienne. Kompleks ten nie jest wrażliwy na odczynniki reagujące z grupami tiolowymi, fluorescencja NADH ulega całkowitemu wygaszeniu, natomiast pojawia się nowe pasmo przy długości fali 317mμ, które można przypisać

utworzeniu się kompleksu NADH-flawina (89). Prawdopodobną strukturę kompleksu enzym-substrat przedstawia schemat 4.

Po wytworzeniu kompleksu enzym-substrat zachodzi redukcja FAD. Dane spektrofotometryczne (90) pozwoliły na ustalenie, że powstaje FADH_2 i NAD^+ . Gdy do zredukowanego enzymu dodać równomolarną ilość cytochromu b_5 połowa tej ilości redukuje się prawie natychmiast, natomiast



Schemat 4. Prawdopodobna struktura kompleksu enzym-substrat oksydoreduktazy NADH: cytochrom b_5 (wg Strittmatera, 89)

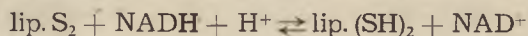


Schemat 5. Mechanizm reakcji katalizowanych przez oksydoreduktazę NADH: cytochrom b_5 (wg Strittmatera, 89)

druga połowa jest redukowana bardzo powoli w procesie zachodzącym według kinetyki pierwszego rzędu ($k = 68\text{sek}^{-1}$). Wskazuje to, że utlenianie zredukowanego enzymu zachodzi w dwóch etapach, pierwszym z nich jest utlenienie FADH_2 do semichinonu (FADH^\cdot), drugim — utlenienie FADH^\cdot do FAD. Prawdopodobny przebieg reakcji przedstawia schemat 5.

4. Dehydrogenaza amidu kwasu liponowego i reduktaza glutationu (EC 1.6.4.2.)

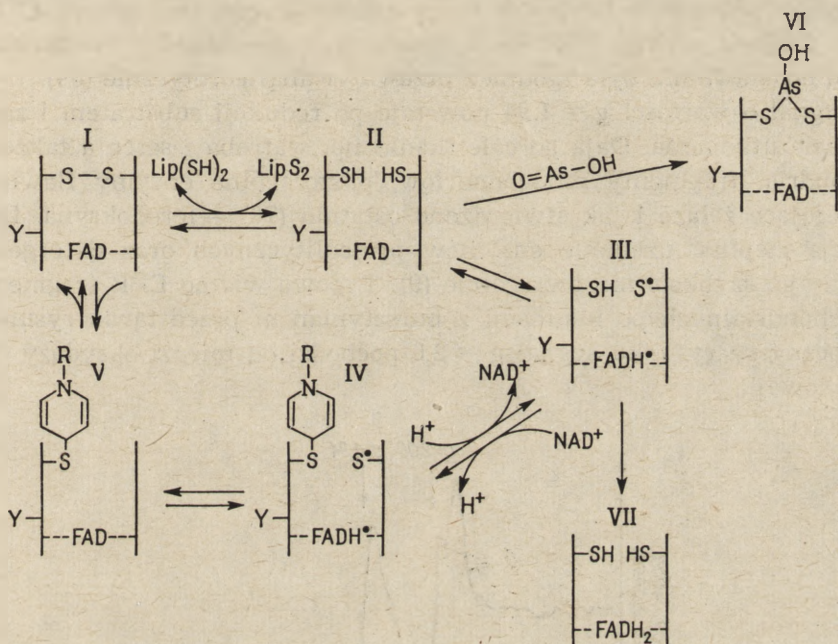
Dehydrogenaza amidu kwasu liponowego (lipoamidu) jest flawoproteidem katalizującym reakcję



Enzym ten jest fragmentem kompleksu utleniającego α -ketokwasy w cyklu kwasów trójkarboksylowych (63). Jego grupą prostetyczną jest FAD w ilości 1 mola na mol enzymu.

W 1960 roku w pracowni Massey'a stwierdzono, że NADH pochodzący z różnych źródeł jest utleniany z różną szybkością przez dehydrogenazę lipoamidu (95). Początkowo sądzono, że jest to wpływ domieszek zawartych w NADH, później jednak wykazano, że najslabiej utleniany jest NADH najlepiej oczyszczony, czy też świeżo przygotowany z NAD^+ przez działanie dehydrogenazy alkoholowej (69). Natomiast po dodaniu katalitycznych ilości NAD^+ reakcja zachodziła z szybkością maksymalną. W obecności NAD-azy otrzymanej z *Neurospora* (która hydrolizuje specyficznie NAD^+ natomiast nie działa na NADH) utlenianie NADH nie zachodziło. Po dodaniu do takiego układu NAD^+ enzym wykazywał znowu aktywność aż do rozłożenia NAD^+ przez NAD-azę. Udział NAD^+ w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę lipoamidu nie ulegał zatem wątpliwości, a danych dotyczących jego funkcji w tej reakcji dostarczyły badania spektrofotometryczne. W 1960 roku Massey i Veeger (65, 95) zaobserwowali, że w reakcji z NADH tworzy się nowa „czerwona” forma enzymu, co świadczyło, że zachodzi redukcja FAD prawdopodobnie do semichinonu. Do takiego połowicznego zredukowania jednego mola enzymu potrzebny jest jeden mol NADH. Jeżeli enzym zredukowano w obecności NAD-azy nie powstawała „czerwona” forma, a dla zredukowania jednego mola enzymu potrzeba było dwóch moli NADH, przy czym flawina redukowała się do FADH_2 . Ta zredukowana forma nie katalizowała przeniesienia wodoru na utleniony amid kwasu liponowego (69). Z doświadczeń tych wynika, że NAD^+ spełnia rolę ochraniającą enzym przed redukcją do nieaktywnej formy FADH_2 . Ponieważ do całkowitej redukcji 1 mola enzymu potrzeba dwóch moli NADH, a dehydrogenaza lipoamidu zawiera tylko jeden mol FAD na mol enzymu, należało przypuszczać, że enzym zawiera jeszcze inną grupę zdolną do przyjęcia dwóch elektronów. Taką rolę mogłyby spełniać grupy tiolowe, na co wskazują następujące dane doświadczalne. Arsenin, który jest znanym odczynnikiem na grupy tiolowe reaguje tylko ze zredukowaną formą dehydrogenazy lipoamidu (64, 67). Inne odczynniki na grupy tiolowe, np. PCMB, reagując z semichinonową formą enzymu niszczą ją, prawdopodobnie wskutek utleniania FADH^{\cdot} do FAD przez jedną z grup -S-S-. Massey i Veeger (64, 69) podali hipotetyczny schemat działania dehydrogenazy lipoamidu tłumaczący wyżej przytoczone fakty i poparli go szeregiem dowodów (66, 67).

Do utlenionego enzymu (I) przyłącza się jedna cząsteczka NADH (V) a wówczas FAD redukuje się do FAD[•]. Redukcja FAD jest najpowolniejszą reakcją w całym cyklu katalitycznym. Wytworzony kompleks dwu rodników — S[•] i FADH[•] (IV) jest „czerwoną” formą enzymu zidentyfikowaną metodami spektralnymi. Forma powstająca po odłączeniu NAD⁺ (III) jest bardzo nietrwała i ulega przegrupowaniu do formy (II), ta zaś reaguje z utlenionym amidem kwasu liponowego dzięki czemu odtwarza się forma (I). Prawdopodobnie NAD⁺ w czasie całego cyklu katalitycznego jest połączony z enzymem w miejscu Y, co chroni enzym przed dalszą redukcją do formy (VII). Z arseninem reaguje forma (II) dając formę (VI).



Schemat 6. Mechanizm działania dehydrogenazy lipoamidu (wg Massey'a i Veegera, 69)

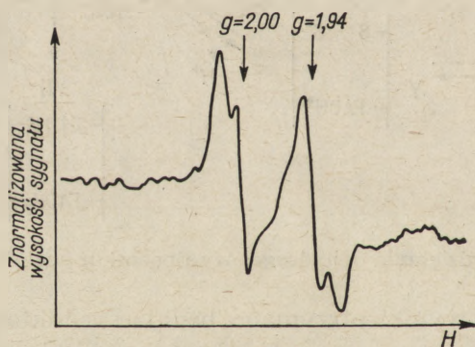
Bardzo podobne wyniki otrzymano badając reduktazę glutationu (67, 70). Reakcje katalizowane przez reduktazę glutationu i dehydrogenazę lipoamidu wykazują duże podobieństwo. Substratem dehydrogenazy lipoamidu jest NADH, a reduktazy glutationu NADPH, akceptorem zaś utlenione grupy tiolowe odpowiednio — kwasu liponowego i glutationu. M a s s e y (70) proponuje identyczny mechanizm przenoszenia wodoru dla obu enzymów.

III. Metaloflawoproteidy

Dziesięć lat temu stwierdzono występowanie żelaza w dehydrogenazie bursztynianowej i oksydazie ksantyny (28, 58, 59, 68). Żelazo to otrzymało ogólną nazwę „żelaza niehemowego”. Jego rola była przez następnych kil-

ka łat sprawą sporną. Wysuwano przypuszczenia, że żelazo niehemowe bierze udział w przenoszeniu elektronów, wiązaniu substratu lub utrzymaniu struktury enzymu. Dopiero wykrycie w 1960 roku w pracowni Beinerta (11, 83) nowego sygnału EPR o wartości $g = 1,94$ w enzymach flawinowych zawierających żelazo umożliwiło badanie roli żelaza w tych enzymach. Wiele danych pośrednich (4, 9, 29) wskazywało bowiem, że sygnał ten pochodzi od żelaza. Bezpośredni dowód dało jednak dopiero podstawienie żelaza ^{56}Fe jego izotopem ^{57}Fe w metaloproteidzie otrzymanym z *Azotobacter vinelandii* (84). Ponieważ jądro atomowe ^{57}Fe ma spin jądrowy $1/2$, podczas gdy jądro ^{56}Fe jest diamagnetyczne, zastąpienie ^{56}Fe przez ^{57}Fe powinno wywoływać rozszczepienie każdej linii widma EPR na dwie. Zmiana widma EPR metaloproteidu z *Azotobacter vinelandii* po takim podstawieniu była zgodna z przewidywaną teoretycznie (84).

Sygnał o wartości $g = 1,94$ powstaje po redukcji substratem i zanika w czasie utleniania. Dają go całe tkanki np. wątroba i serce a także mitochondria, fragmenty mitochondriów, poszczególne enzymy flawinowe zawierające żelazo i jak stwierdzono ostatnio (76) — feredoksyna. Denaturacja cieplna, działanie enzymów proteolitycznych oraz detergentów niszczy go szybko i nieodwracalnie (9). Typowe widmo EPR fragmentów mitochondrialnych po inkubacji z bursztynianem przedstawia rysunek 4 (widoczny na rysunku sygnał $g = 2,0$ pochodzi od miedzi oksydazy cytochromowej).



Rys. 4. Widmo EPR cząstek mitochondrialnych po inkubacji z bursztynianem w temp. 79°K (wg 54)

Sygnał $g = 1,94$ nie zmienia się po usunięciu flawiny (79, 80), jednak badanie relaksacji stanów wzbudzonych w EPR (7, 8) wydaje się wskazywać na ścisłe współdziałanie flawiny i metalu. Ponieważ sygnał $g = 1,94$ może być obserwowany tylko w bardzo niskich temperaturach (poniżej 170°K), dlatego też dopiero opracowanie metodyki szybkiego zamrażania (13, 18) w czasie 10 milisekund pozwoliło badać szybkość redukcji i utleniania żelaza niehemowego. Okazało się, że szybkość ta jest równa szybkości redukcji flawiny a także szybkości reakcji katalizowanej przez bada-

ny enzym (10, 15, 78). Wydaje się więc, że udział żelaza niehemowego w przenoszeniu elektronów został udowodniony, natomiast nie znana jest nadal struktura kompleksu żelaza z białkiem odpowiedzialnego za sygnał $g = 1,94$. Obecność tak zwanych „labilnych grup tiolowych” (to znaczy łatwo ulegających odszczepieniu pod wpływem słabych kwasów) we wszystkich znanych metalo-flawoproteidach dających sygnał $g = 1,94$ pozwala przypuszczać o ich udziale w tworzeniu kompleksu z żelazem (5, 6). Prace Bayera (3a) wskazują, że są to zapewne grupy tiolowe cysteiny. Blomstrom (12) zaproponował schemat budowy centrum aktywnego feredoksyny, w którym żelazo połączone jest w grupę tiolową cysteiny. Z takiego połączenia pod wpływem kwasu łatwo odszczepia się H_2S .

1. Oksydaza ksantyny (EC 1.2.3.2.)

Oksydaza ksantyny występuje w znacznych ilościach w mleku ssaków, wątrobie i nerce. Charakteryzuje się bardzo małą specyficznością, gdyż około stu związków może służyć jako jej substraty (14). Najszybciej jednak utlenia ksantynę i hipoksantynę do kwasu moczowego. Rola biologiczna tego enzymu jest słabo poznana, wzrost jego poziomu w czasie podziału komórek (3) wydaje się wskazywać na udział w kontroli tego procesu. Za hipotezą tą przemawia też fakt pomyślnego zastosowania oksydazy ksantyny w leczeniu niektórych schorzeń nowotworowych (30). Ostatnie spostrzeżenie przyczyniło się do większego zainteresowania tym enzymem w wyniku czego jest on obecnie najlepiej poznanym metaloflawoproteidem. Masa cząsteczkowa oksydazy ksantyny wynosi około 280 000, koenzymami są FAD, molibden i żelazo w stosunku 1 : 1 : 4 (1, 17). Molibden i żelazo związane są z białkiem za pośrednictwem grup tiolowych (79).

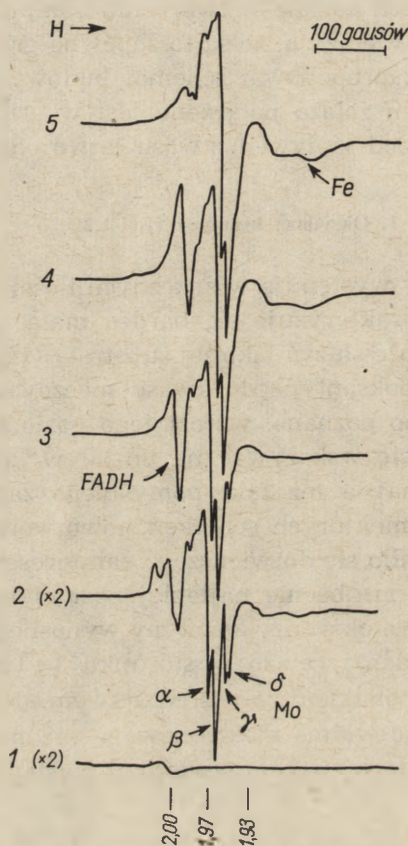
Bray (16) badając widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego w czasie reakcji tego enzymu stwierdził występowanie czterech sygnałów o wartości $g = 1,94$; 1,97; 2,00 i 4,2. Ostatni sygnał jest prawdopodobnie wynikiem zanieczyszczeń żelazem dwuwartościowym. Dalsze prace (15, 78) pozwoliły na przypisanie sygnału $g = 1,93$ żelazu związanemu z białkiem, $g = 2,00$ semichinonowej formie flawin a $g = 1,97$ molibdenowi. Sygnał molibdenu jest jeszcze rozszczepiony na cztery pasma α , β , γ i δ . Typowe widmo EPR oksydazy ksantyny i jego zmiany w czasie reakcji przedstawia rysunek 5.

Z rysunku widać, że w czasie reakcji najpierw pojawia się sygnał molibdenu, później $FADH^{\cdot}$ a w końcu żelaza.

Bray podał oparty na tych danych schematyczny przebieg transportu elektronów od substratu do tlenu w reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantyny (schemat 7).

O udziale molibdenu w centrum aktywnym wiążącym substrat świadczą również badania nad hamowaniem aktywności oksydazy ksantyny

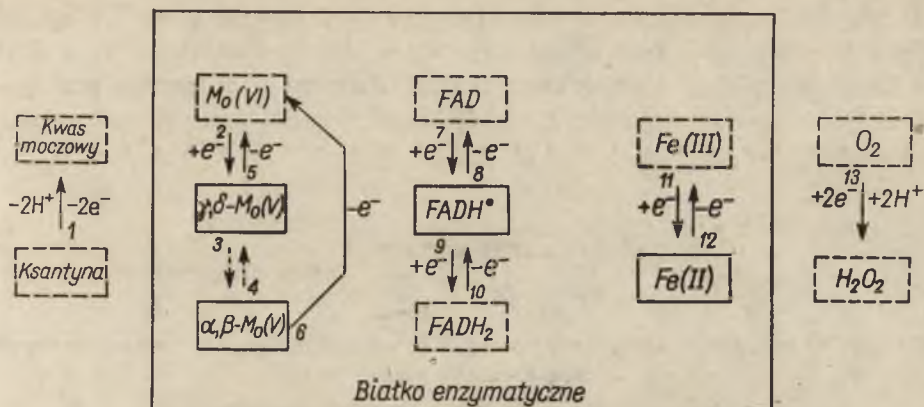
metanolem — kompetycyjnym inhibitorem tego enzymu (1, 79), który łączy się tylko z formą zredukowaną enzymu. Wyizolowany kompleks enzym-metanol daje sygnał EPR molibdenu bez dodania substratu (1), co wskazywałoby, że metanol wiążąc się ze zredukowanym enzymem zapobiega jego utlenieniu.



Rys. 5. Sygnały EPR otrzymane w czasie utleniania ksantyny przez oksydazę ksantynową (wg 78)

krzywa 1 — utleniony enzym (bez dodania substratu), krzywe 2, 3, 4 — enzym w czasie redukcji po 26, 77, 860 msekundach od dodania substratu, krzywa 5 — enzym całkowicie zredukowany (po 1410 msek.), krzywe 1 i 2 mają podwójną wysokość w stosunku do pozostałych. Pojawienie się poszczególnych sygnałów oznaczono strzałkami

Utlenianie substratu i redukcja tlenu teoretycznie może zachodzić w dwóch reakcjach jednoelektronowych z wytworzeniem wolnych rodników substratu i tlenu lub też w jednej reakcji dwuelektronowej przy współdziałaniu dwóch centrów aktywnych enzymu. Do tej pory brak danych doświadczalnych przemawiających na korzyść jednej lub drugiej możliwości.

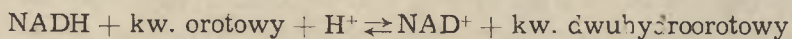


Schemat 7. Schemat transportu elektronów od substratu do akceptora w reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantyny (15)

Duży prostokąt przedstawia cząsteczkę białka enzymatycznego. W ramkach ciągłych uwidocznione są struktury odpowiedzialne za sygnały EPR, w ramkach przerywanych — struktury nie dające takich sygnałów. Strzałki ciągłe obrazują pobranie lub oddanie elektronu, strzałki przerywane — przemianę jednego stanu w drugi bez zmiany wartościowości. Numery przy strzałkach wskazują kolejność reakcji

2. Dehydrogenaza kwasu orotowego (EC 1.3.3.1.)

Dehydrogenaza kwasu orotowego jest enzymem adaptacyjnym wytwarzanym przez *Zymobacterium oroticum* w warunkach beztlenowych na pożywce zawierającej znaczne ilości kwasu orotowego (55). Enzym ten katalizuje odwracalną reakcję:



Szybkość i kierunek reakcji zależą od pH: w pH 6,5 równowaga reakcji jest przesunięta w kierunku wytwarzania kwasu dwuhydroorotowego, natomiast pH 8 jest optymalne dla reakcji odwrotnej. Tlen cząsteczkowy może służyć jako akceptor elektronów zarówno w czasie utleniania NADH jak i kwasu dwuhydroorotowego. Jeden mol enzymu zawiera jeden mol FAD, jeden mol FMN i dwa mole żelaza (27) oraz grupy tiolowe (1, 73), których zablokowanie powoduje utratę aktywności. Rola grup -SH nie jest wyjaśniona. Massey (73) proponuje ich udział w przenoszeniu elektronów, Beinert (6) — udział w wiązaniu żelaza.

Dehydrogenaza kwasu ortowego jest jedynym dotychczas poznanym flawoproteidem, zawierającym dwa różne koenzymy flawinowe. Sugerowano udział obu nukleotydów w jednym centrum, dane doświadczalne przemawiają jednak za udziałem FMN i FAD w dwóch różnych centrach aktywnych. W czasie reakcji pojawiają się dwa sygnały o wartości $g = 2,00$ charakterystycznej dla form semichinonowych flawin (6, 77). Fluorescencja flawin jest mocniej wygaszana przez kwas dwuhydroorotowy niż przez NADH (1). Ponieważ FMN wykazuje znacznie silniejszą fluorescencję

okazało się jednak niemożliwe ze względu na dużą szybkość tej reakcji (105).

Der Vartanian (22, 24) na podstawie wyników prac nad wpływem na widmo absorpcyjne i sygnały EPR dehydrogenazy bursztynianowej inhibitorów kompetycyjnych (23) oraz odczynników na grupy tiolowe, wysunął przypuszczenie, że centrum aktywne tego enzymu stanowi kompleks flawina-grupy tiolowe-żelazo. Kompleks ten w reakcji z substratem pobierałby dwa elektrony i proton, przy czym jeden elektron przyjmowałaby flawina redukując się do semichinonu, a drugi elektron i proton — układ żelazo-grupy tiolowe. Sposób przekazywania elektronów przez zredukowany enzym nie jest dotychczas poznany, bowiem nie znamy jego naturalnego akceptora elektronów. Pogląd, że jest nim ubichinon nie jest powszechnie przyjmowany (19).

4. Dehydrogenaza NADH (EC 1.6.99.3.)

Utlenianie NADH w mitochondriach zachodzi za pośrednictwem kompleksu enzymatycznego lipidowo-białkowego, nazwanego łańcuchem oddechowym. Pierwszym jego ogniwem jest dehydrogenaza NADH. Uwolnienie tego enzymu zachodzi tylko po zniszczeniu wiązań lipidowo-białkowych przez działanie fosfolipazą A lub etanolem w kwaśnym środowisku. Od 1952 r., kiedy to w pracowni Mahlera (60) wyizolowano po raz pierwszy rozpuszczalną dehydrogenazę NADH, w kilku innych laboratoriach wyizolowano wiele różniących się własnościami enzymów katalizujących utlenianie NADH (32, 49, 81). Ich własności i metody izolacji opisane zostały w jednym z poprzednich zeszytów *Postępów Biochemii* (43). Wydaje się, że są one różnymi fragmentami natywnej dehydrogenazy NADH częściowo zmodyfikowanymi metodyką izolacji (42, 82). Rodzaj grupy prostetycznej dehydrogenazy NADH był przedmiotem szerokiej dyskusji w ciągu ostatnich pięciu lat (38, 45, 50, 74). Ostatecznie ustalono, że jest nim FMN (21, 57) a nie FMN i FAD, jak początkowo twierdził Singer (102). Wyizolowane dehydrogenazy NADH zawierają żelazo związane niehemowo w ilości od 4 do 18 moli na 1 mol flawiny oraz grupy tiolowe (21, 50).

Kompleks oksydazy NADH daje sygnał EPR charakterystyczny dla żelaza, zanikający w obecności substratu pod wpływem odczynników na grupy tiolowe (96, 97). Spośród rozpuszczalnych dehydrogenaz NADH, tylko nieliczne, np. enzym Singera i enzym Haftefi'ego dają ten sygnał, ponieważ najczęściej w czasie izolacji enzymu zachodzą zmiany w jego centrum aktywnym i ulega zniszczeniu struktura odpowiedzialna za powstawanie sygnału (10). Biorąc pod uwagę przytoczone dane wydaje się słuszna hipoteza Estabrooka i wsp. (97), że centrum aktywne dehydrogenazy NADH zawiera kompleks flawina (FMN)-żelazo niehemowe-grupy tiolowe.

Uwagi końcowe

Zastosowanie nowych metod w badaniu enzymów flawinowych pozwoliło na osiągnięcie znacznego postępu w ciągu ostatnich 5 lat. Technika EPR umożliwiła badanie nie tylko wolnych rodników flawin, ale również paramagnetycznych atomów metali (żelaza i molibdenu) wchodzących w skład wielu enzymów flawinowych. W ten sposób udowodniono udział niehemowego żelaza oraz molibdenu w transporcie elektronów. Możliwy wydaje się udział żelaza niehemowego również w procesach przeniesienia energii.

Badanie relaksacji zaabsorbowanej energii świetlnej dostarczyło informacji o współdziałaniu metalu i formy semichinonowej flawiny. Udoskonalone metody spektrofotometryczne pozwoliły na zbadanie zmian oksydoredukcyjnych flawiny w czasie jednego cyklu reakcji i na ilościowe oznaczenie jej form: utlenionej, semichinonowej i zredukowanej. Występowanie grup tiolowych w enzymach flawinowych było znane od dawna, ale udział ich w przenoszeniu elektronów nie był jasny. Badania nad dehydrogenazą lipoamidu pozwoliły na ustalenie roli grup tiolowych w przenoszeniu elektronów i wiązaniu substratu. Uzyskano również dane wskazujące na udział tak zwanych labilnych grup tiolowych w wiązaniu metalu z białkiem.

Wydaje się, że dalszy rozwój badań zmierza do lepszego wyjaśnienia zmian konformacyjnych białka związanych z przeniesieniem elektronów.

LITERATURA

1. Aleman V., Smith S. T., Rajagoplan K. V., Handler P., w *Flavins and Flavoproteins*, red. E. C. Slater, Elsevier Pub. Comp. Amsterdam 1966, str. 99.
2. Battelli A., Stern F., *Biochem. Z.* **30**, 172 (1910).
3. Bauer D. J., Bradley P. C., IV-th International Congress of Biochemistry (Vienna 1958) tom V, II, Pergamon Press, Londyn (95), str. 142.
- 3a. Bayer E., Parrow W., Kazmaier B., *Arch. Pharmazie* **298**, 196 (1965).
4. Beinert H., *Adv. Enzymol.* **27**, 105 (1965).
- 4a. Beinert H., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5323 (1956).
5. Beinert H., w *Non-Hem Iron Proteins Role in Energy Conversion* red. A. San. Pietro, L. P. Vernon, Antioch Press, Ohio 1965, str. 23.
6. Beinert H., w *Flavins and Flavoproteins*, red. E. C. Slater, Elsevier Pub. Comp. Amsterdam 1966, str. 49.
7. Beinert H., Hemmerich P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 212 (1965).
8. Beinert H., Hemmerich P., DerVartanian D. V., Van Woorst J. D. W., *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 530 (1965)
9. Beinert H., Lee W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 40 (1961).
10. Beinert H., Palmer G., Cremona T., Singer T. P., *J. Biol. Chem.* **240**, 475 (1965).
11. Beinert H., Sands R. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 41 (1960).

12. Blomstrom D. G., Knight F., Phillips W. D., Weiher J. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **51**, 1085 (1964).
13. Bray R. C., *Biochem. J.* **81**, 189 (1961).
14. Bray R. C., w The Enzymes, tom 7, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., Academic Press, New York 1963, str. 533.
15. Bray R. C., Palmer G., Beinert H., *J. Biol. Chem.* **239**, 2667 (1964).
16. Bray R. C., Petterson R., Ehrenberg A., *Biochem. J.* **81**, 178 (1961).
17. Bray R. C. Chisholm A. J., Hart L. I., Meriwether L. S., Watts D. C., w Flavins and Flavoproteins, red. E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 117.
18. Bray R. C. w Rapid Mixing and Sampling Techniques in Biochemistry, red. Chance B., Eisenhardt R., Gibson Q. H., Lonberg-Holm K. K., Academic Press, New York 1964, str. 205.
19. Chance B., w Biochemistry of Quinones, red. R. A. Morton, Academic Press, Londyn 1965, str. 460.
- 19a. Chance B., Williams G. R., *Adv. Enzymol.* **17**, 65 (1956).
20. Chance B., Schoener B., w Flavins and Flavoproteins, red. E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 510.
21. Cremona T., Kearney E. B., *J. Biol. Chem.* **239**, 2328 (1964).
22. DerVartanian D. V., Zeylemaker W. P., Veeger C., w Flavins and Flavoproteins, red. E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam, 1966, str. 183.
23. DerVartanian D. V., Veeger C., *Biochim Biophys. Acta* **105**, 424 (1965).
24. Der Vartanian D. V., Veeger C., Van Voorst J. D. W., *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 660 (1963).
25. Dixon M., Webb E. C., Enzymes, Longmas, Londyn 1958.
26. Dolin M. J., *J. Biol. Chem.* **225**, 557 (1957).
- 26a. Ehrenberg A., Erikson L. E. G., Muler F., w Flavins und Flavoproteins, red. E. C. Slater Elsevier, Amsterdam 1966, str. 37.
27. Fridman H. C., Vennesland B., *J. Biol. Chem.* **235**, 1526 (1960).
28. Green D. E., w Units of Biological Structure and Function, red. Gabler O. H., Academic Press, New York 1956, str. 465.
29. Gray H. Bernal I., Biling E., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 3404 (1962).
30. Haddow A., De Lamirande G., Bergel F., Bray R. C., Gilbert D. A., *Nature* **182**, 1144 (1958).
31. Haas E., *Biochem. Z.* **290**, 291 (1937).
32. Hatefi Y., Haavik A. G., Griffiths D. E., *J. Biol. Chem.* **237**, 1676 (1962).
33. Hemmerich P., *Helv. Chim. Acta* **47**, 464 (1964).
34. Hemmerich P., Spence J., w Flavins and Flavoproteins, red. E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 82.
35. Hemmerich P., Veeger C., Wood H. C. S., *Angew. Chem.* **77**, 1 (1965).
36. Heegeboom G. H., *J. Biol. Chem.* **162**, 739 (1946).
37. Hopkins F. G., Lutwak G., Mann C., Morgan E. J., *Nature* **143**, 556 (1939).
38. Huennekens E. M., Felton S. P., Rao F. M., Mackler B., *J. Biol. Chem.* **236**, PC 57 (1961).
39. Ingram D. I. E., Free Radicals as Studied by Elektron Spin Resonance, Butterworths Scientific Publications, Londyn 1958.
40. Kamin H., Masters B. S. S., Gibson Q. H., w Flavins and Flavoproteins red. E. C. Slater, Elsevier Amsterdam 1966, str. 306.

41. Kamin H., Masters B. S. S., Gibson Q. H., Williams C. H., *Fed. Proc.* **34**, 1164 (1965).
42. Kaniuga Z., *Biochim. Biophys. Acta* **73**, 550 (1963).
43. Kaniuga Z., *Post. Biochem.* **10**, 7 (1964).
44. Kaniuga Z., *Post. Biochem.* **11**, 553 (1965).
45. Kaniuga Z., Veeger C., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 339 (1963).
46. Kearney E. B., *J. Biol. Chem.* **235**, 865 (1960).
47. Kuhn R., Bolanger P., *Ber* **69**, 1557 (1936).
48. Kuhn R., Rudy H., Weygand F., *Ber.* **69**, 1543 (1936).
49. King T. E., Howard R. L., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 557 (1960).
50. King T. E., Howard R. L., Wilson D., V-th International Congress of Biochemistry (Moscow 1961), tom V, Pergamon Press, Londyn 1963, str. 193.
51. Klingernberg M., Bücher Th., *Biochem. Z.* **334**, 1 (1961).
52. Kosower E. M., w Progress in Physical Organic Chemistry, red. S. G. Cogen, A. Streitwiser, R. W. Taft, Interscience Publishers, New York 1965, str. 8.
53. Kosower E. M., w Flavins and Flavoproteins, red. E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 1.
54. Linnane A. W., Ziegler D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 630 (1958).
55. Lieberman I., Kornberg A., *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 223 (1953).
56. Lowe M. J., Clark W. M., *J. Biol. Chem.* **221**, 983 (1956).
57. Mackler B., w Flavins and Flavoproteins, red. E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966 str. 427.
58. Mackler B., Penn N. *Biochim. Biophys. Acta* **24** 294 (1957).
59. Mahler H., Elowe D. G., *J. Biol. Chem.* **210**, 165 (1954).
60. Mahler H. R., Sarkar N. K., Vernon L. P., Alberty R. A., *J. Biol. Chem.* **199**, 585 (1952).
61. Masters B. S. S., Bilimoria M. H. B., Kamin J. *J. Biol. Chem.* **240**, 4081 (1965).
62. Masters B. S. S., Kamin H., Gibson Q. H., Williams C. H., *J. Biol. Chem.* **240**, 921 (1965).
63. Massey V., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 447 (1960).
64. Massey V., Gibson Q. H., *Fed. Proc.* **23**, 18 (1964).
65. Massey V. Gibson Q. H., Veeger C., *Biochem. J.* **77**, 341 (1960).
66. Massey V., Hofman T., Palmer G., *J. Biol. Chem.* **237**, 3820 (1962).
67. Massey V., Palmer G., Williams C. H., Swoboda B. E. P., Sands R. H., w Flavins and Flavoproteins, red. E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam (1966), str. 133.
68. Massey V., Singer T. P., *J. Biol. Chem.* **228**, 263 (1957).
69. Massey V., Veeger C., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 33 (1961).
70. Massey V., Williams C. H., *J. Biol. Chem.* **240**, 4470 (1965).
71. Michaelis L., *J. Biol. Chem.* **96**, 703 (1932).
72. Michaelis L., Schubert M. P., *Chem. Revs.* **165**, 243 (1935).
73. Miller R. W., Massey V., *J. Biol. Chem.* **240**, 1454 (1965).
74. Minakami S., Ringler R. L., Singer T. P., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 610 (1961).
75. Morton R. K., *Nature* **166**, 1092 (1950).
76. Palmer G., Sands R. H., *J. Biol. Chem.* **241**, 253 (1966).
77. Palmer G. Beinert H., *Anal. Biochem.* **8**, 95 (1964).
78. Palmer G., Bray R. C., Beinert G., *J. Biol. Chem.* **239**, 2657 (1964).
79. Rajogoplan K. V., Handler P., *J. Biol. Chem.* **239**, 1509 (1964).
80. Rajogoplan K. V., Handler P., *J. Biol. Chem.* **239**, 2027 (1964).

81. Ringler R. L., Minakami S., Singer T. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 417 (1960).
82. Rossi C., Cremona T., Machnist M., Singer T. P., *J. Biol. Chem.* **240**, 2634 (1965).
83. Sands R. H., Beinert H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 47 (1960).
84. Shethana Y. J., Wilson P. W., Hansen R. E., Beinert H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **52**, 1263 (1964).
85. Singer T. P., Kearney E. B., Zastrow N., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 154 (1955).
86. Strittmater P., *J. Biol. Chem.* **234**, 2665 (1959).
87. Strittmater P., *J. Biol. Chem.* **236**, 2329 (1961).
88. Strittmater P., *J. Biol. Chem.* **236**, 2336 (1961).
89. Strittmater P., *J. Biol. Chem.* **240**, 4481 (1965).
90. Strittmater P., w Flavins and Flavoproteins, red. E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 325.
91. Strittmater P., Velick S. F., *J. Biol. Chem.* **228**, 785 (1957).
92. Szent Gyorgi A., Introduction to a Submolecular Biology, Academic Press, New York 1960.
93. Theorell H., *Biochem. Z.* **278**, 263 (1935).
94. Theorell H., Nygaard A. P., *Acta Chem. Scand.* **8**, 877 (1954).
95. Veeger C., Massey V., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 181 (1960).
96. Tyler D. D., Gouze J., *J. Biochem.* **99**, 10P (1966).
97. Tyler D. D., Gouze J., Estabrook R. W., Butow R. A., w Non-Hem Iron Proteins: Role in Energy Conversion, red. San Pietro, A. Yellow, Antioch Press, Ohio 1965, str. 447.
98. Wang T. Y., Tsou C. L., Wang Y. L., *Sci. Sinica* **5**, 73 (1956).
99. Wang T. Y., Tsou C. L., Wang Y. L., *Sci. Sinica* **7**, 65 (1958).
100. Warburg O., Christian W., *Biochem. Z.* **254**, 438 (1932).
101. Warburg O., Christian W., *Biochem. Z.* **298**, 368 (1938).
102. Watari H., Kearney E. B., Singer T. P., Basinzski D., Hauber J., Lusty C. J., *J. Biol. Chem.* **237**, PC 1731 (1962).
103. Williams C. H., Kamin H., *J. Biol. Chem.* **237**, 587 (1962).
104. Williams C. H., Gibbs R. H., Kamin H., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 568 (1959).
105. Ziegler D. M., Doeg K. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 41 (1962).

MARIA ERECIŃSKA *, TADEUSZ CHOJNACKI **

Udział fosfolipidów w reakcjach łańcucha oddechowego

Participation of Phospholipids in the Reactions of the Respiratory Chain

NASZEMU DROGIEMU NAUCZYCIELOWI,
PANU PROFESOROWI I. HELLEROWI

Role and importance of phospholipids for the enzymatic reactions of the mitochondria are discussed.

Fosfolipidy komórkowe występują głównie jako składniki struktur komórkowych przede wszystkim we frakcji mitochondrialnej i mikrosomowej, a prawie zupełnie brak ich we frakcji rozpuszczalnej. Występowanie fosfolipidów głównie w formie kompleksów lipoproteidowych nasunęło przypuszczenie, że w skład takich kompleksów mogą wchodzić również białka enzymatyczne. Tym samym fosfolipidy rozpatrywane dotąd wyłącznie jako składnik strukturalny mitochondrium mogłyby grać bezpośrednią rolę w reakcjach enzymatycznych.

Fosfolipidy z pewnością odgrywają rolę w czynności niektórych enzymów mikrosomowych jak fosfataza glukozo-6-fosforanu (20), cytydylo-transferaza CTP: fosforan cholicy (12) oraz oksydoreduktaza NADH: cytochrom c (31). Natomiast dane o udziale fosfolipidów mikrosomowych w biosyntezie białka (29) a także w transporcie jonu sodowego (28) — są kontrowersyjne. Ogromna jednak większość prac nad rolą fosfolipidów w reakcjach enzymatycznych dotyczyła reakcji w łańcuchu oddechowym mitochondriów. Przedmiotem badań były mitochondria tkanek ssaków, głównie serca. Uzyskany w ciągu ostatnich kilku lat postęp w tej dziedzinie jest w dużej mierze zasługą D. E. Greena i jego współpracowników.

* lek., doktorant Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa.

** doc. dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa.

Rodzaje fosfolipidów mitochondrialnych

Lipidy stanowią znaczny procent suchej wagi mitochondriów. Mitochondria serca wołu zawierają ich około 26%, zaś mitochondria wątroby szczura 21—29,6%, przy czym przeważają wśród nich fosfolipidy (50—93% wg różnych autorów). *Fleischer* i wsp. (15) podają, że w mitochondriach serca wołu fosfolipidy stanowią około 90% lipidów. Pozostałość czyli frakcja tłuszczów obojętnych zawiera też ubichinon, cholesterol, karotenoid i estry glicerydowe. Frakcja fosfolipidowa składa się z 4 fosfolipidów, z przewagą fosfatydylocholiny (37%) i fosfatydyloetanolaminy (31%). Ponadto zarówno w mitochondriach serca wołu jak i wątroby szczura znaleziono fosfatydyloinozytol (10%) oraz małe ilości sfingolipidów. Dla mitochondriów serca charakterystyczna jest duża zawartość plazmalogenu i kardiolipiny (16%). Niemal cała ilość komórkowej kardiolipiny zawarta jest w mitochondriach. Fosfolipid ten jest charakterystycznym składnikiem mitochondriów również u roślin (50). Kardiolipina jest najbardziej elektroujemnym fosfolipidem, drugą jej ważną cechą jest wysoki stopień nienasyconienia — około 3,2 podwójnych wiązań na jeden atom fosforu fosfolipidowego. Pozostałe fosfolipidy mitochondriów charakteryzują się również mniej lub bardziej ujemnym ładunkiem. W porównaniu z mikrosomami mitochondria zawierają mniej fosfolipidów cholinowych przy podobnej zawartości fosfolipidów etanolaminowych, poza tym jednak skład ich nie odbiega jakościowo ani ilościowo od fosfolipidów innych frakcji podkomórkowych. Nasuwa to przypuszczenie o małej specyficzności funkcji komponentu fosfolipidowego w strukturach podkomórkowych. Również skład fosfolipidów poszczególnych komponentów w mitochondriach (ETP, oksydoreduktazy bursztynian: cytochrom c, oksydoreduktazy NADH: cytochrom c, oksydazy cytochromowej) jest podobny i nie różni się od składu fosfolipidów całej organelli (4). Świadczyłoby to o niespecyficznej funkcji fosfolipidów w enzymatycznej aktywności tych komponentów. Jednakże, (por. poniżej), w pewnych reakcjach łańcucha oddechowego absolutnie niezbędny jest określony fosfolipid (19, 47).

Pochodzenie i przemiana fosfolipidów mitochondrialnych

Niewiele wiadomo o pochodzeniu mitochondriów, ostatnie badania (22, 35) przemawiają za tym, że organelle te są strukturami samoreplikującymi się. Zatem winnyby one posiadać zdolność syntetyzowania swoich głównych składników. Badania *R o o d y n a* i wsp. (46) wskazują, że mitochondria wolne od zanieczyszczeń mikrosomów włączają znakowane aminokwasy we frakcje białkowe, co przemawiałoby za tym, że mogą syntetyzować własne białka. Drugim obok białek podstawowym skład-

nikami mitochondriów są fosfolipidy. Wg Rotschilda (45) synteza wszystkich lipidów komórki lub przynajmniej niektóre jej etapy biegną we frakcji mikrosomów. We frakcji tej zachodzi: metylowanie zasady azotowej fosfolipidów, estryfikacja glicerofosforanu kwasami tłuszczowymi, fosforylowanie dwuglicerydów, acylowanie lizolecytyny, lizofosfatydyloetanoloaminy, tworzenie fosfatydyloinozytolu w reakcji inozytolu z cytydynodwufosfodwuglicerydem, reakcja cytydynodwufosfocholiny z dwuglicerydem plazmalogenowym i ceramidami, biosynteza sfingozyny. Również biosynteza trójglicerydów przebiega w mikrosomach. Należałoby zatem przyjąć, że frakcja mikrosomowa jest miejscem wytwarzania fosfolipidów komórkowych, w tym także mitochondrialnych. Według Wilgrama i Kennedy'ego (57) mitochondria nie zawierają enzymów katalizujących syntezę fosfolipidów z udziałem koenzymów cytydynowych. Badania grupy Hawthorne'a prowadzone *in vivo* przemawiają jednak za tym, iż we frakcji mitochondrialnej zachodzi intensywne syntezę lecytyny z cytydynodwufosfocholiny (27). Również badania nad powstawaniem fosfolipidów z endogennych dwuglicerydów (39, 40) świadczą, że synteza fosfolipidów z koenzymów cytydynowych a także reakcje metylowania zasady azotowej fosfolipidu zachodzą we frakcji mitochondrialnej w równym stopniu jak we frakcji mikrosomów wątroby szczura. Dane Wellsa (55) również wskazują, że w mitochondriach zachodzi reakcja wytwarzania lecytyny drogą metylowania kefaliny (6). Garbus i wsp. (21) wykazali, że nieorganiczny, znakowany fosforan ulega bardzo szybko wcieleniu do fosfolipidów mitochondrialnych.

Fletcher i Sanadi (18) stwierdzili, że przeciętny biologiczny okres półtrwania lipidów mitochondrialnych wynosi 10,3 dnia. Poszczególne rodzaje fosfolipidów wymieniane są jednak z niejednakową szybkością (27). Z badań nad szybkością wiązania ^{32}P *in vivo* wynika, że ze strukturą mitochondriów najtrwalej związane są fosfolipidy o większym ładunku ujemnym (fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol i kardiolipina), a przynajmniej część fosfatydyloetanoloaminy i fosfatydylocholiny ulega wymianie dużo szybciej niż wynikałoby to z danych Fletchera i Sanadi. Prawdopodobnie w mitochondriach są dwie odrębne pule metaboliczne fosfatydyloetanoloaminy i fosfatydylocholiny: jedna o krótszym okresie półtrwania obejmująca fosfolipidy metabolizowane podczas trwania organelli, i druga, o dłuższym okresie — złożona z fosfolipidów wymienianych dopiero po rozpadzie struktury organelli. Wg Pascuda (43) wymiana kwasów tłuszczowych lecytyny tak w mitochondriach jak w innych frakcjach podkomórkowych (mierzona szybkością wbudowywania octanu ^{14}C) następuje w ciągu ok. 3 godzin. Zatem przynajmniej niektóre fosfolipidy ulegają szybkiej odnowie bądź w wyniku biosyntezy fosfolipidów w mitochondriach, bądź też drogą zastępowania fosfolipidów mitochondrialnych przez gotowe cząsteczki zsyntetyzowane w mikrosomach.

Rola fosfolipidów w łańcuchu oddechowym

W roku 1934 Sinclair zauważył (49), że zużycie tlenu przez miążgę z tkanki zwiększało się po dodaniu fosfolipidów. Chociaż obserwację tę trudno zinterpretować, zwróciła ona uwagę na rolę fosfolipidów w procesach utleniania. Dopiero lata pięćdziesiąte przyniosły szybki postęp w tej dziedzinie. Pierwszych, choć pośrednich dowodów znaczenia fosfolipidów mitochondrialnych dla funkcji mitochondriów dostarczyły badania nad wpływem fosfolipaz na oddychanie. W roku 1953 Braganca i Quastel (5) stwierdzili hamowanie wielu enzymów w mitochondriach mózgu pod wpływem fosfolipazy A. W tym samym roku Nygaard i Sumner (42) zauważyli, że krystaliczna lecytynaza A inaktywuje układ oksydoreduktazy bursztynian: O_2 (oksydaza bursztynianowa) w mitochondriach wątroby szczura. Łagodna hydroliza przy pomocy tego enzymu inaktywowała układ całkowicie, podczas gdy uszkodzenia zarówno samej dehydrogenazy bursztynianowej jak i oksydazy cytochromowej były nieznaczące. Dodatek cytochromu c nie przywracał aktywności, z czego autorzy wnioskowali, że lecytynaza A uszkadzała część składową układu wiążącą dehydrogenazę bursztynianową i cytochrom c. Nagaard (41) stwierdził, że w tych samych warunkach ulegała również inaktywacji oksydoreduktaza NADH: O_2 (oksydaza NADH). Mechanizm działania lecytynazy był identyczny jak w przypadku oksydoreduktazy bursztynian: O_2 .

Już w roku 1938 stwierdzono hamowanie utleniania bursztynianu pod wpływem fosfolipazy C z *Cl. perfringens* (59), zaś Tookey i Balls (51) obserwowali to samo zjawisko pod wpływem fosfolipazy D. Dopiero jednak Ambesi Crane (3) badając cząstki przenoszące elektrony (z mitochondriów serca wołu), zdołali przywrócić zniesioną działaniem fosfolipazy A aktywność oksydazy bursztynianowej przez jednoczesne dodanie cytochromu c i fosfolipidu. Nie wykluczało to jednak możliwości, że hamować oddychanie mogły produkty reakcji katalizowanych przez fosfolipazy.

Bezpośrednich dowodów udziału fosfolipidów w poszczególnych funkcjach mitochondriów dostarczyły badania ostatnich lat, głównie szkoły Greena. Pionierskie doświadczenia należą do Lestera i Fleischera (33). Aby stwierdzić niezbędność fosfolipidów dla danej reakcji należało wykazać, że: a. usunięcie fosfolipidów z mitochondriów lub ich fragmentów pociągnie za sobą całkowitą utratę aktywności enzymatycznej, b. dodanie fosfolipidów odtwarza tę aktywność, w stopniu proporcjonalnym do ilości związanego przez mitochondria lipidu. Lester i Fleischer ekstrahując mitochondria mieszaniną acetonu z wodą wykazali prawie całkowitą utratę aktywności oksydazy bursztynianowej i oksydazy NADH, przy zachowaniu niemal nietkniętej struktury. Aktywność enzymatyczną można było przywracać w sposób zależny od warunków ekstrak-

cji. Po ekstrakcji acetonem zawierającym 4% wody do przywrócenia aktywności wymagane było jedynie dodanie ubichinonu. Natomiast po ekstrakcji acetonem zawierającym 10% wody, co usuwało około 80% fosfolipidów z mitochondriów, dodatek ubichinonu nie wystarczał dla przywrócenia aktywności dehydrogenazy bursztynianowej, lecz niezbędne okazało się dostarczenie także fosfolipidów. Od dawna jest rzeczą znaną, że pomiędzy endogennymi fosfolipidami mitochondriów i dodanymi z zewnątrz fosfolipidami szybko ustala się równowaga (14). Fosfolipidy są również łatwo wbudowywane do preparatów wyekstrahowanych acetonem (15). Szybkość wbudowywania zależy od rodzaju fosfolipidu. Spośród trzech fosfolipidów mitochondrialnych najwydatniej wiąże się kardiolipina, słabiej fosfatydyloetanoloamina, najmniej zaś lecytyna. W miarę pobierania fosfolipidów przez mitochondria wydajność reakcji ich wiązania maleje i przy pobraniu około 11 μ g fosforu fosfolipidowego na mg białka (około 0,2—0,3mg fosfolipidu) osiąga wartość graniczną (stan nasycenia). Stan nasycenia odpowiada stosunkowi fosfolipidu do białka w nienaruszonych mitochondriach. Stopień reaktywacji aktywności enzymatycznej jest proporcjonalny do ilości związanego fosfolipidu. W stanie nasycenia reaktywacja osiąga 100%. W zależności od rodzaju fosfolipidu reaktywację osiąga się w ciągu kilku do kilkunastu minut. Reakcja reaktywacji nie wymaga energii, ani obecności żadnych dodatkowych kofaktorów i jest zupełnie niespecyficzna. Aktywność przywracały zarówno fosfolipidy mitochondrialne jak i fosfolipidy sojowe (azolektyna). Podkreślić należy, że skuteczność fosfolipidu w odtwarzaniu aktywności zależy od stanu fizycznego w jakim jest dodawany do mitochondriów. *Fleischer* i *Kloven* (17) wykazali, że fosfolipid musi być w stanie micellarnym. Zewnętrzna powłoka micelli jest hydrofilowa, natomiast grupy hydrofobowe skierowane są do wewnątrz. Warunkuje to rozpuszczalność lipidu w wodzie i ma duże znaczenie w procesie jego wiązania z białkiem (por. niżej). Stan micellarny uzyskuje się przez sonikację (34) albo przez dializę w stosunku do wody (17). Zawiesina fosfolipidów ulega wówczas przejściu.

Pewne reakcje, zachodzące w mitochondriach zależą od fosfolipidów. Obecność lecytyny jest niezbędna do enzymatycznego utleniania β -hydroksymaślanu. Ten fosfolipid jest specyficznym aktywatorem apodehydrogenazy β -hydroksymaślanu i w obecności grup SH wiąże się z apoproteidem tworząc kompleks czynny enzymatycznie (47, 48). Działanie kompleksu wyizolowanego z mitochondriów nie zależy od egzogennej lecytyny. Zależność ta pojawia się z chwilą rozbicia kompleksu. Zdolność odtwarzania aktywności mają jedynie lecytyny, przy czym może to być zarówno lecytyna mitochondrialna jak i lecytyna syntetyczna. Reaktywacja dehydrogenazy jest tym większa im wyższy jest stopień nienasycenia reszt kwasowych dodanej lecytyny (32). I tak syntetyczna lecytyna zawierająca jedną resztę β -oleilową daje pełną reaktywację, podczas gdy

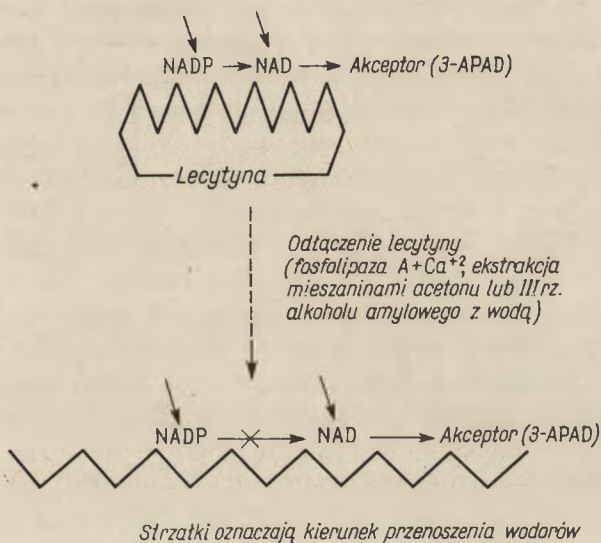
syntetyczna lecytyna z dwiema resztami nasyconych kwasów tłuszczowych ma tylko nieznaczny wpływ. Do uzyskania maksymalnej reaktywności należy dodać około 200 cząsteczek lecytyny na każdą cząsteczkę apoenzymu (stosunek wagowy ilości dodanej lecytyny do białka wynosi 2). Dlatego też lecytyna nie może być uważana za klasyczny koenzym, choć ze względu na ścisłą specyficzność i zależność aktywności od stężenia przypomina ona koenzym.

Badania szkoły Greena wykazały, że funkcje oksydoreduktaz bursztynian: cytochrom c i NADH: cytochrom c są zależne od fosfolipidów (8, 16). Ekstrakcja mieszaniną acetonu z wodą powoduje utratę aktywności enzymatycznej, dodatek fosfolipidów aktywność tę odtwarza.

Wiele prac poświęcono zagadnieniu zależności oksydazy cytochromowej od fosfolipidów (10, 53, 26, 37—8). Oczyszczony preparat oksydazy cytochromowej przygotowany wg Greenlees i Wainio (25) wymagał do działania dodatku fosfolipidów. Dodanie fosfolipidów wzmacnia o kilkaset procent aktywność natywnego enzymu, oraz odtwarza aktywność preparatu ubogiego w fosfolipidy. Dodanie związków powodujących rozbięcie lipoproteidów (dezoksyholan) do roztworu zawierającego cytochrom c i fosfolipid powoduje spadek aktywności oksydazy cytochromowej. Brierley i Merola (7) ekstrahowali oczyszczoną oksydazę cytochromową z serca wołu mieszaniną acetonu z wodą zmniejszając zawartość lipidów o połowę. Powodowało to prawie całkowite unieczynnienie enzymu. Fosfolipidy z mitochondriów lub poszczególne oczyszczone frakcje fosfolipidowe (fosfatydyloetanoloamina, fosfatydyloinozitol, kardiolipina) odtwarzały w 50% pierwotną aktywność, a stopień reaktywacji był proporcjonalny do ilości pobranego przez enzym fosfolipidu. Przy 50% reaktywacji ilość związanego fosfolipidu równa była zawartości fosfolipidu w preparacie oksydazy przed ekstrakcją. Igo i wsp. (30) donieśli, że w stosowanych przez nich warunkach doświadczenia wyekstrahowany preparat oksydazy cytochromowej najlepiej reaktywowała lizolecytyna z drożdży. Przy użyciu dużych stężeń cholanu Tzagaloff i McLennan (52) byli w stanie usunąć z oksydazy cytochromowej do 85% związanego fosfolipidu przez dwukrotne frakcjonowanie enzymu. Dodając do tego preparatu fosfolipidy mitochondrialne udało im się odtworzyć ponad 90% aktywności. Das i wsp. (11) wykazali doświadczalnie wiązanie cytochromu c fosfolipidem choć zagadnienie czy rola fosfolipidu polega na wiązaniu cytochromu c, czy na uczestniczeniu we współdziałaniu cytochromu c z oksydazą pozostaje w dalszym ciągu kwestią otwartą. Prostetyczne grupy cytochromu c i oksydazy cytochromowej są lipofilowe i fosfolipid mógłby stanowić odpowiednie środowisko w mitochondriach umożliwiające współdziałanie tych grup. Widmer i Crane (56) opisali rozpuszczalną w lipidach formę cytochromu c, którą można wyekstrahować heptanem. Ten rozpuszczalny cytochrom c można wytworzyć mieszając roztwór zredukowanego cytochromu c z mitochondrialnymi fosfo-

lipidami i ekstrahując mieszaninę heptanem. Prawdopodobnie cytochrom c działa w łańcuchu oddechowym w postaci rozpuszczalnej w lipidach jako kompleks cytochrom c — fosfolipid.

Ostatnio opisano ciekawe zachowanie się transhydrogenazy mitochondrialnej pod wpływem oczyszczonej fosfolipazy A i rozpuszczalników organicznych (44). Czynniki te zmieniają właściwości transhydrogenazy w stosunku do substratu. Nieuszkodzony enzym może przenosić wodory albo z NADH_2 albo z NADPH_2 . Fosfolipaza A a także ekstrakcja enzymu mieszaniną acetonu z wodą powodują, że enzym może przenosić wodory tylko z NADH_2 na akceptor (autorzy stosowali sztuczny akceptor: dwunukleotyd 3-acetylopirydynoadenylowy — 3-APAD). Przypuszcza się, że w nieuszkodzonym enzymie rola cząsteczki lecytyny polega na zbliżeniu miejsc wiązania substratów tak, że zdolny jest on do obustronnego przenoszenia wodorów (schemat 1).



Schemat 1. (wg 44)

Fosfolipidy grają również istotną rolę w aktywności ATP-azy zależnej od Mg^{+2} (9).

Do zrozumienia roli fosfolipidów choć kilka słów poświęcić należy naturze wiązań między fosfolipidem a białkiem. *Fleischer* (13) podsumowując wyniki badań własnych i innych badaczy stwierdza, że wiązania te wydają się być dwójakiego rodzaju, elektrostatyczne i hydrofobowe. Przykładem wiązania elektrostatycznego jest wiązanie zasadowego białka cytochromu c z kardioliną. Wiązanie to powstaje między kwasem fosforowym cząsteczki fosfolipidu a wolnymi grupami aminowymi białka. *Machinist* i wsp. (36) otrzymali kompleks składający się z 32 moli kefaliny na mol cytochromu c. Stosunek ten zgadzałby się z liczbą wolnych

grup aminowych cytochromu c. Autorzy ci sugerują, że cytochrom c znajduje się w otworze w błonie mitochondrialnej związany elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi fosfolipidami pokrywającymi większą część powierzchni otworu. Wiązaniami drugiego typu są wiązania hydrofobowe. Polegają one na polarnym współdziałaniu między parafinowymi obszarami na powierzchni białka i resztami kwasów tłuszczowych fosfolipidów. Między fosfolipidem a białkiem mogą powstawać wiązania jonowe, jednak z reguły nakładają się one na wiązania hydrofobowe.

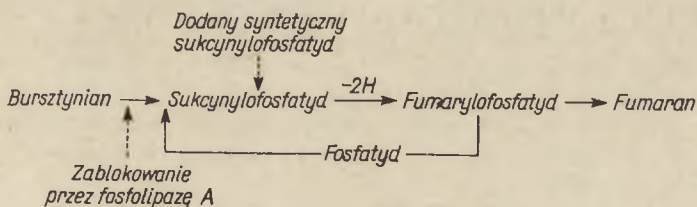
Znaczenie fosfolipidów mitochondrialnych

Badania wykonane przy pomocy mikroskopu elektronowego (23) wykazują, że większość fosfolipidów mitochondriów nie jest niezbędna do zachowania ich zasadniczej struktury. Z przytoczonych powyżej rozważań wynika jednak, że fosfolipidy stanowią integralną część składową mitochondriów i trudno pomyśleć o jakiegokolwiek funkcji mitochondriów, która odbywałaby się bez ich udziału. Rola fosfolipidów może być związana z ich fizycznymi właściwościami — ze zdolnością do tworzenia micelli, które mogą działać jako pomosty między hydrofilowymi i hydrofobowymi obszarami, bądź grupami funkcjonalnymi. Hydrofobowe łańcuchy białka wymagają lipidu jako pomostu do fazy wodnej. Współdziałanie substratu z NAD wymaga również hydrofobowego środowiska (23). Enzymy pirydynowe posiadają własny obszar hydrofobowy tworzący integralną część ich struktury. Dehydrogenaza β -hydroksymaślanu tym różniłaby się od innych enzymów pirydynowych, że w jej apoenzymie nie ma obszaru hydrofobowego. Obszar ten stanowi odłączalna od białka lecytyna.

Rola fosfolipidów mogłaby polegać na ich zdolności do ustawiania hydrofobowych grup funkcjonalnych i solubilizacji nierozpuszczalnych w wodzie cząsteczek takich jak ubichinon. Wg Greena (24) fosfolipidy mitochondrialne nie są rozmieszczone równomiernie wzdłuż łańcucha oddechowego lecz tworzą rodzaj pakietów umożliwiających przenoszenie elektronów między poszczególnymi kompleksami łańcucha oddechowego. Rolę fosfolipidów możnaby zatem rozumieć jako tworzenie środowiska, w którym zanurzone są i odpowiednio ustawione do współdziałania grupy funkcjonalne. Hydrofobowe ugrupowania fosfolipidu służyłyby dodatkowej funkcji tworzenia środowiska o niskiej stałej dielektrycznej.

Występowanie fosfolipidów w mitochondriach w dużych ilościach oraz niski stopień specyficzności lub jej brak przy odtwarzaniu funkcji enzymatycznych przemawia raczej przeciwko pełnieniu przez nie roli koenzymu. Jednakże jeden opisany ostatnio w literaturze przypadek wskazuje, że możliwość tego rodzaju istnieje. Badania Abdulla i Davisona (1, 2) nad mechanizmem hamowania dehydrogenazy bursztynianowej fosfolipazą A dowodzą, że w preparatach drożdży zachodzi tworzenie się α -acylc- β -sukcynyloglicerofosforylocholinylu i odwodorowanie tego związ-

ku z utworzeniem α -acylo- β -fumaryloglicerylofosforylocholiny a następnie odłączenie fumaranu od fosfolipidu. Fosfolipaza A hamuje pierwszy etap tego procesu (schemat 2).



Schemat 2. (wg 1)

Fosfolipidy odgrywają niepoślednią rolę w procesie gromadzenia energii w mitochondrium. Wydaje się, że wszystkie reakcje prowadzące do syntezy wysokoenergetycznego wiązania oraz przeniesienia go na ADP wymagają ochrony przed hydrolitycznym działaniem wody. Fosfolipid otacza prawdopodobnie kompleks, w którym zachodzi synteza ATP.

Fosfolipidy odgrywają wreszcie rolę w transporcie jonów przez błonę mitochondrialną. Dane Wojtczaka i wsp. (58) wskazują na ścisły związek między syntezą fosfolipidów mitochondrialnych a kurczeniem mitochondriów. Błona mitochondrialna jest ujemnie naładowana i możliwe, że ujemnie naładowane grupy fosfolipidów kontrolują transport przez błonę. Usunięcie lipidów powoduje utratę a dodanie fosfatydyloinozytolu przywraca zdolność kurczenia wywołanego przez ATP (54).

LITERATURA

1. Abdullah Y. A., Davison A. N., *Biochem. J.* **96**, 10c (1965).
2. Abdullah Y. A., Davison A. N., *Biochem. J.* **96**, 51P (1965).
3. Ambe K. S., Crane F. L., *Science* **129**, 98 (1959).
4. Ansell G. B., Hawthorne J. N., w „Phospholipids”, BBA Library, Elsevier Publ. Comp. 1964, str. 254.
5. Braganca B. M., Quastel J. H., *Biochem. J.* **53**, 88 (1953).
6. Bremer J., Greenberg D. M., *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 205 (1961).
7. Brierley G. P., Merola A. J., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 205 (1962).
8. Brierley G. P., Merola A. J., Fleischer S., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 218 (1962).
9. Casu A., Fleischer B., Fleischer S., *Fed. Proc.* **25**, 413 (1966).
10. Cohen M., Wainio W. W., *J. Biol. Chem.* **239**, 879 (1963).
11. Das H. L., Hiratsuka H., Machinist J. M., Crane F. L., *Biochim. Biophys. Acta* **60**, 633 (1962).
12. Fiscus M. G., Schneider W. C., *Fed. Proc.* **25**, 406 (1966).
13. Fleischer S., VI Intern. Congress Bioch. New York 1964 VIII, 607.
14. Fleischer S., Brierley G. P., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 609 (1961).
15. Fleischer S., Brierley G. P., Klouwen H., Slautterback D. B., *J. Biol. Chem.* **237**, 3264 (1962).

16. Fleischer S., Casu A., Fleischer B., *Fed. Proc.* **23**, 486 (1964).
17. Fleischer S., Klouwen H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 378 (1961).
18. Fletcher M. J., Sanadi D. R., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 356 (1961).
19. Francis M. J. O., Phizackerley P. J. R., *Biochem. J.* **95**, 25P (1965).
20. Ganoza M. C., Byrne W. L., *Fed. Proc.* **22**, 535 (1963).
21. Garbus J., De Luca H. F., Loomans M. E., Strong F. M., *J. Biol. Chem.* **238**, 59 (1963).
22. Gibor A., Granick S., *Science* **145**, 890 (1963).
23. Green D. E., Fleischer S., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 554 (1963).
24. Green D. E., Fleischer S., *Symp. on Biochem. Problems of Lipids BBA Library I*, 325 (1963).
25. Greenlees J., Wainio W. W., *J. Biol. Chem.* **234**, 658 (1959).
26. Griffiths D. E., Wharton D. C., *J. Biol. Chem.* **236**, 1850 (1961).
27. Gurr M. J., Protey C., Hawthorne J. N., *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 357 (1965).
28. Hokin L. E., Hokin M. R., *Nature* **184**, 1068 (1959).
29. Hunter G. D., Godson G. N., *Nature* **189**, 140 (1961).
30. Igo R. P., Mackler B., Duncan H., Ridyard J. N. A., Hanahan D. J., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 55 (1960).
31. Jones P. D., *Fed. Proc.* **25**, 405, (1966).
32. Jurtshuk P., Sekuzu I., Green D. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 75 (1961).
33. Lester R. L., Fleischer S., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 358 (1961).
34. Lester R. L., Smith A. L., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 475 (1961).
35. Luck D. J. L., *J. Cell Biol.* **16**, 483 (1963).
36. Machinist J. M., Das M. L., Crane F. L., Jacobs E. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 475 (1961).
37. Marinetti G. V., Erbland J., Kochen J., Stotz E. J., *J. Biol. Chem.* **233**, 740 (1958).
38. Marinetti G. V., Scarazuzzino D. J., Stotz E., *J. Biol. Chem.* **224**, 819 (1957).
39. Marshall E. F., Chojnacki T., IV *Symp. PTBioch. Gdańsk 1965*, str. 30.
40. Marshall E. F., Chojnacki T., Ansell G. B., *Biochem. J.* **95**, 30P (1965).
41. Nygaard A. P., *J. Biol. Chem.* **204**, 655 (1953).
42. Nygaard A. P., Summer J. B., *J. Biol. Chem.* **200**, 723 (1953).
43. Pascaud M., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 528 (1964).
44. Pesch L. A., Peterson J., *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 390 (1965).
45. Rothschild J., *Biochem. Soc. Symp.* (Cambridge, Eng.) **22**, 4 (1963).
46. Roodyn D. B., Reis P. J., Work T. S., *Biochem. J.* **80**, 9 (1961).
47. Sekuzu I., Jurtshuk P., Green D. E., *Biochem Biophys. Res. Comm.* **6**, 71 (1961).
48. Sekuzu I., Jurtshuk P., Green D. E., *J. Biol. Chem.* **238**, 975 (1963).
49. Sinclair R. G., *Physiol. Revs.* **14**, 351 (1934).
50. Strickland F. H., Benson A. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 344 (1960).
51. Tookey H. L., Balls A. K., *J. Biol. Chem.* **220**, 15 (1956).
52. Tzagaloff A., McLennan D. H., *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 476 (1965).
53. Yonetani T., *J. Biol. Chem.* **236**, 1680 (1961).
54. Vignais P. M., Vignais P. V., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **239**, 2011 (1964).
55. Wells I. C., *Fed. Proc.* **23**, 422 (1964).
56. Widmer C., Crane F. L., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 203 (1958).

57. Wilgram F. G., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **238**, 3572 (1963).
58. Wojtczak L., Włodawer P., Zborowski J., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 290 (1963).
59. Wooldridge W. R., Higginbottom C., *Biochem. J.* **32**, 1718 (1938).

ANNA B. WOJTCZAK *

Transport jonów i metabolitów przez błony mitochondrialne

Transport of Ions and Metabolites across Mitochondrial Membranes

PANU PROFESOROWI JÓZEFOWI HELLEROWI
Z OKAZJI 70-TEJ ROCZNICY URODZIN

The transport of ions and metabolites across mitochondrial membranes is reviewed. Different mechanisms involved in this transport are discussed in relation to mitochondrial metabolism.

Mitochondria znajdują się w komórkach prawie wszystkich tkanek zwierzęcych i roślinnych. W organellach tych zachodzą główne procesy dostarczające organizmowi energii, tzn. całkowite utlenienie substratów organicznych do dwutlenku węgla i wody, powiązane z wytwarzaniem i z magazynowaniem energii, która się podczas tego procesu uwalnia. Badania sprzed lat około dwudziestu ustaliły, że w mitochondriach zlokalizowane są układy enzymatyczne, katalizujące utlenianie różnych substratów, a więc cykl kwasów trójkarboksylowych, układ utleniający kwasów tłuszczowych, dehydrogenazy aminokwasów oraz układ utleniający NADH_2 , zwany inaczej łańcuchem oddechowym. W mitochondriach zlokalizowane są także układy fosforylacyjne, współdziałające ściśle z układami utleniającymi: układ fosforylacji oksydacyjnej substratowej, wytwarzający GTP podczas reakcji sprzężonej z utlenianiem kwasu ketoglutarowego, oraz układ fosforylacji oksydacyjnej, wytwarzający ATP podczas utleniania NADH_2 przez łańcuch oddechowy.

Wyniki badań ostatnich lat dziesięciu uzyskane głównie przy pomocy mikroskopu elektronowego pozwoliły na ustalenie morfologicznej budowy mitochondrium, co wraz z danymi biochemicznymi umożliwiło lepsze zrozumienie mechanizmów współdziałania układów oksydoredukcyjnych i fosforylacyjnych. Mitochondria izolowane z serca, nerki lub wątroby wyglądają na zdjęciu mikroskopowo-elektronowym jak pęcherze o podwójnej błonie. Błona zewnętrzna jest łatwo przepuszczalna — pozwala na przeni-

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

kanie jonów, nukleotydów i sacharozy, lecz nie przepuszcza poliglukozy. Błona wewnętrzna jest natomiast praktycznie prawie nieprzepuszczalna dla nukleotydów nikotynamidowych, kationów, anionów nieorganicznych prócz fosforanu i arsenianu, większości anionów organicznych i sacharozy. Jest ona pofałdowana do wewnątrz tworząc tzw. *crisetae*. Obszerniejsze wiadomości o budowie mitochondriów zamieszczone są we wcześniejszych zeszytach *Postępów Biochemii* (44, 46). Przestrzeń ograniczona błoną wewnętrzną, zawierająca tzw. *matrix*, zachowuje się jak osmometr doskonały stosownie do równania:

$$V = \frac{k}{c} + V_{c \rightarrow \infty}$$

gdzie V oznacza objętość osmometru w roztworze substancji o stężeniu c , $V_{c \rightarrow \infty}$ odpowiednią objętość przy stężeniu nieskończenie dużym, a k jest wielkością stałą. Badania przeprowadzone w 0,25M roztworze sacharozy wykazały, że osmotycznie czynna przestrzeń wynosi około 50% całej zawartości wody mitochondrium wątroby, a jest trochę mniejsza w mitochondriach mięśniowych (26, 40). Zdjęcia z mikroskopu elektronowego pokazują, że pęcznienie mitochondriów zachodzi głównie dzięki powiększeniu objętości *matrix* przy jednoczesnym rozfałdowaniu błony wewnętrznej.

Bardzo ograniczona przepuszczalność izolowanych mitochondriów w stosunku do większości metabolitów, a szczególnie substratów utleniających, od dawna sprawiała dużą trudność w zrozumieniu działania mitochondriów *in vivo*. Na podstawie badań lat ostatnich możemy obecnie wyróżnić szereg mechanizmów umożliwiających przechodzenie substancji przez wewnętrzną błonę mitochondrialną.

Jak wspomniano, kationy jednowartościowe nie przechodzą przez nieuszkodzoną błonę, obecność pewnych substancji powoduje jednak zmianę jej przepuszczalności. Pewne antybiotyki i hormony, jak np. walinomycyna (29, 33), gramicydyna (12), hormon gruczołów przytarczycowych (34) i prawdopodobnie tyroksyna (25) zwiększają przepuszczalność względem kationów. Gdy w środowisku zawierającym np. walinomycynę, która czyni błonę przepuszczalną dla potasu, znajduje się ponadto utleniający substrat i fosforan, mitochondria nie tylko wymieniają jony K^+ ze środowiskiem, ale i nagromadzają wewnątrz potas w stężeniach wyższych niż w otoczeniu. Nagromadzenie zachodzące przeciw gradientowi stężeń, odbywa się kosztem energii dostarczonej przez utlenianie substratu oddechowego. Procesy tego typu nazwano transportem aktywnym, to jest zależnym od energii. Istnieją również i inne typy transportu nazywanego czasami „aktywnym”, ale w innym tego słowa znaczeniu. Chodzi tu o przenoszenie substancji w zasadzie bez zużycia energii, ale przy udziale specjalnych układów przenoszących. Tak dzieje się w przypadku nukleotydów adeninowych, przenoszonych przez zlokalizowany w błonie układ transportujący, czyli na blokowanie atraktylanem (substancja typu glikozydu

o toksycznym działaniu). Transferaza acylo-CoA także znajduje się prawdopodobnie w błonie i umożliwia przeniesienie zaktywowanego kwasu tłuszczowego w postaci estru karnityny. Przeniesienie NADH_2 — proces bardzo ważny dla metabolizmu komórki — jest jeszcze bardziej skomplikowane i wymaga współdziałania dwóch dehydrogenaz jabłczanowych: jednej znajdującej się w cytoplazmie, drugiej — wewnątrz mitochondriów. Wreszcie przypuszcza się, że związki pośrednie w cyklu Krebsa przenoszone są przy udziale systemu permeaz, które działają specyficznie nie tyle w stosunku do poszczególnych kwasów, ile w odniesieniu do grup o określonej konfiguracji przestrzennej.

Transport kationów jedno- i dwuwartościowych

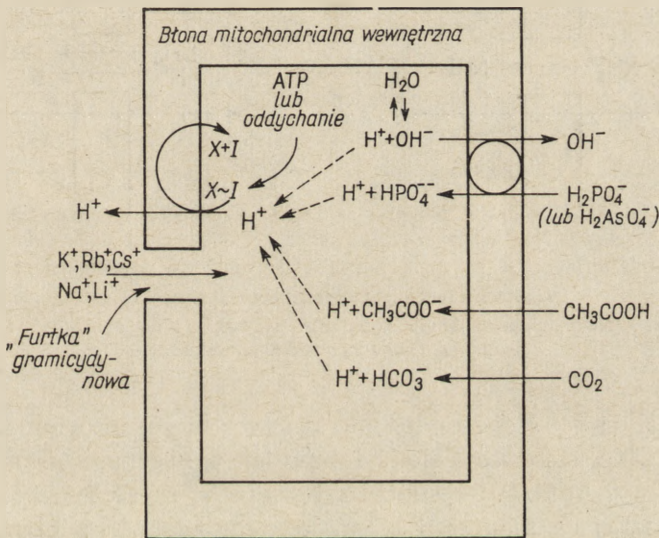
Izolowane mitochondria wykazują bardzo ograniczoną przepuszczalność względem jednowartościowych kationów. A Moore i Bartley (1, 2) wykazali przy pomocy ^{42}K , że dodane jony K^+ wymieniają się bardzo powoli z endogennym potasem w mitochondriach wątroby. W roku 1962 Neuberger i Lehninger (30), badając działanie różnych czynników wywołujących pęcznienie mitochondriów wątroby szczura zauważyli, że gramicydyna A powoduje bardzo szybkie pęcznienie uzależnione ściśle od obecności jednowartościowych kationów: K^+ , Na^+ , Li^+ . W środowisku zawierającym wyłącznie sacharozę lub bufor Tris-HCl gramicydyna nie powodowała pęcznienia. Inny antybiotyk, walinomycyna, powodował w obecności jonów K^+ bardzo szybkie pęcznienie (29, 33), któremu towarzyszyło nagromadzenie potasu wewnątrz mitochondriów, przy jednoczesnym wydzielaniu do środowiska jonów H^+ w ilościach równomolarnych do gromadzonego potasu. Jednocześnie obserwowano szybkie utlenianie substratu oddechowego, przy czym obecność fosforanu działała stymulująco tak na pęcznienie, jak i na szybkość oddychania. Chappell i Crofts (12) podjęli następnie podobne badania, używając gramicydyny A i D. Stwierdzili, że gramicydyna wywołuje zmiany zupełnie analogiczne jak walinomycyna, jest jednak czynnikiem mniej specyficznym i współdziała ze wszystkimi kationami jednowartościowymi, podczas gdy walinomycyna współdziała tylko z K^+ , Rb^+ i Cs^+ . Chappell i Crofts (12) wysunęli jako hipotezę roboczą możliwość, że gramicydyna i walinomycyna zwiększają przepuszczalność błony mitochondrialnej względem kationów jednowartościowych działając chemicznie na fosfolipidową membranę. W obecności tych substancji wymiana kationów ze środowiskiem powinna być zatem możliwa w obie strony, co też potwierdzono doświadczalnie. W obecności gramicydyny endogenny potas z izolowanych mitochondriów szybko dyfundował do środowiska. Hipoteza okazała się słuszna nie tylko w odniesieniu do błon mitochondrialnych; gramicydyna i walinomycyna zwiększały przepuszczalność błon erytrocytów

(także fosfolipidowej natury) oraz nawet sztucznych błon tzw. micelli fosfolipidowych, utworzonych przez spreparowanie w szczególny sposób emulsji lecytynowej (13). Bezpośrednia przyczyna nagromadzenia potasu w mitochondriach i obserwowanego jednocześnie zakwaszenia środowiska jest jednak niejasna. Chappell i Crofts (13) tłumaczą to zjawisko w oparciu o hipotezę Mitchella (27, 28), która zakłada, że w błonie mitochondrialnej działa mechanizm zależny od energii utleniania lub od ATP, wyrzucający protony na zewnątrz błony, przy czym wewnątrz mitochondrium staje się bardziej alkaliczne niż środowisko. Dzięki mechanizmowi temu, zwanemu pompą protonową, ustala się na błonie pewien potencjał elektrochemiczny, który może być źródłem energii dla syntezy ATP w procesie oksydacyjnej fosforylacji lub może być zużytkowany na transport jonów, czy w innych jeszcze procesach. Hipoteza pompy protonowej Mitchella jest podstawą rozwijanej przez niego chemi-osmotycznej teorii oksydacyjnej fosforylacji. W odróżnieniu do formułowanej dawniej przez Slatera, Chance'a i innych autorów teorii intermediatowej, hipoteza Mitchella wyklucza udział pośredników chemicznych w reakcji sprzęgania utleniania z fosforylacją, a zakłada, że rozdzielenie ładunków w błonie mitochondrialnej powodowane przez pompę protonową wytwarza warunki, w których synteza ATP z ADP i fosforanu przebiega już samorzutnie. Dyskusja pomiędzy zwolennikami obu teorii trwa i w obecnej chwili nie ma danych doświadczalnych, które mogłyby spór rozstrzygnąć.

Nie negując możliwości istnienia pośredników oksydacyjnej fosforylacji, Chappell i Crofts przyjmują hipotezę Mitchella o pompie protonowej jako punkt wyjścia w tłumaczeniu mechanizmu transportu kationów. Według tych autorów (13) kolejność procesów jest następująca: mitochondria zawieszane w izotonicznym roztworze KCl w obecności utleniającego substratu lub ATP wyrzucają protony, ale zachodzi to z niewielką szybkością, gdyż K^+ nie może w drodze wymiany wejść do wnętrza. Dopiero dodanie walinomycyny lub gramicydyny zwiększa przepuszczalność błony i obserwuje się wymianę K^+-H^+ . Wymianę tę ogranicza ilość protonów wewnątrz mitochondrium, toteż szybko ustaje ona i nie obserwuje się ani wzrostu zużycia tlenu przez mitochondria ani ich pęcznienia. Dopiero dodanie związku, który przenika do mitochondriów (np. fosforanu lub octanu) i dysocjuje tam tworząc dodatkowe protony i aniony, powoduje wzrost oddychania i pęcznienie mitochondriów. Bezpośrednim tedy powodem pęcznienia jest wzrost ciśnienia osmotycznego wewnątrz mitochondrium dzięki nagromadzeniu soli. Nie wszystkie aniony nieorganiczne podtrzymują pęcznienie. Zupełnie nie przenikają Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- ; natomiast przenikają fosforan, arsenian, octan i CO_2 . Proces pęcznienia ilustruje schemat 1.

Jeżeli odciąć dopływ energii zasilającej pompę protonową, dopływ jonów ustaje; mitochondria kurczą się. Skurcz ten obserwuje się po dodaniu inhibitorów utleniania, np. przy użyciu bursztynianu skurcz wywołuje

antymycyna A, przy glutaminianie — antymycyna A lub rotenon. Wytworzenie warunków anaerobowych powoduje skurcz przy każdym substracie. Skurcz następuje także po dodaniu tzw. substancji rozprzegających fosforylację oksydacyjną, np. dwunitrofenolu. Gdy źródłem energii transportu jonów nie jest substrat oddechowy lecz ATP, wtedy zarówno dodanie dwunitrofenolu jak i oligomycyny wywołuje skurcz. Oligomycyna hamuje fosforylację oksydacyjną, działając prawdopodobnie na poziomie ufosforylowanego pośrednika. Skurcz pod wpływem inhibitorów oddychania, ewentualnie oligomycyny, zachodzi nie tylko jako następstwo przerywania transportu kationów do wnętrza mitochondrium, ale i dlatego, że wraz z odcięciem dopływu energii poprzednio nagromadzony kation dyfunduje z powrotem do środowiska (13, 16, 22). Dopływ energii potrzebny jest zatem nie tylko do nagromadzenia, ale także do utrzymania kationu wewnątrz mitochondrium.

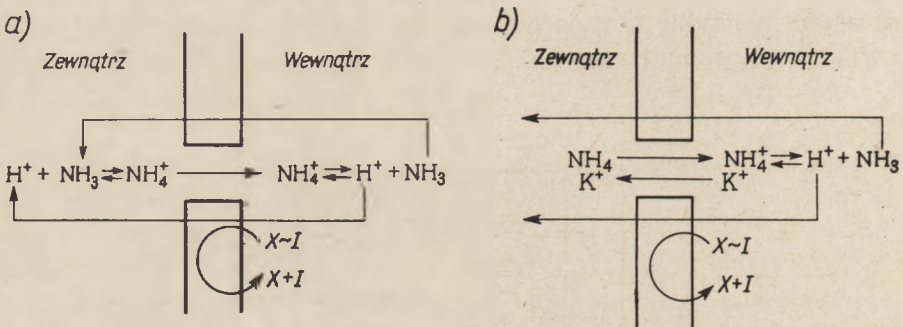


Schemat 1. Proponowany mechanizm działania gramicydyny i walinomycyny na mitochondria (wg 13)

X ~ I oznacza wysokoenergetyczny nieufosforylowany pośrednik oksydacyjnej fosforylacji, który może powstawać kosztem energii ATP lub oddychania

Zachowanie się mitochondriów w obecności soli amonowych jest szczególnie interesujące, gdyż w pewnej mierze sprawdza prawidłowość omawianej hipotezy (13). W obecności gramicydyny i bursztynianu dodanie NH_4Cl szybko stymuluje oddychanie nawet w nieobecności fosforanu lub innego dyfundującego anionu. Nie obserwuje się też pęcznienia, a wręcz odwrotnie — skurcz. Tłumaczy się to w następujący sposób: NH_4^+ , podobnie jak inne kationy, wymienia się z H^+ w obecności gramicydyny. Wewnątrz mitochondriów NH_4^+ może jednak, w odróżnieniu od

kationów metali alkalicznych, dysocjować na $\text{NH}_3 + \text{H}^+$. Amoniak, jako cząsteczka obojętna, łatwo dyfunduje z mitochondriów, a H^+ może ulegać wymianie z następnymi jonami NH_4^+ , względnie wypompowaniu przez pompę protonową, co powoduje stymulację oddychania. Zachodzi przy tym usuwanie K^+ z mitochondriów prawdopodobnie dlatego, że NH_4^+ ze środowiska wymienia się również z K^+ z wnętrza mitochondrium, znowu następuje dysocjacja NH_4^+ wewnątrz mitochondrium, wypompowanie H^+ , dyfuzja NH_3 , itd. Efektem końcowym tych zjawisk jest wyrugowanie K^+ z mitochondrium, obniżenie ciśnienia osmotycznego i skurcz. Podobnie jak jon amonowy działają aminy organiczne o małej cząsteczce. Mechanizm ten pokazany jest na schemacie 2.



Schemat 2. Działanie NH_4^+ na mitochondria tłumaczone według mechanizmu przedstawionego na schemacie 1 (wg 13)

(a) Dwojaka rola NH_4^+ , polegająca na wymianie $\text{NH}_4^+ - \text{H}^+$ i na dysocjacji NH_4^+ . (b) Działanie NH_4^+ rugujące K^+ z mitochondriów

Azzi, Rossi i Azzone (3) zauważyli, że mitochondria preinkubowane z EDTA zachowują się podobnie jak w obecności gramicydyny lub walinomycyny. Autorzy wysnuli stąd wniosek, że EDTA, który jest substancją chelatującą magnez i wapń, odciąga magnez z błony mitochondrialnej, czyniąc ją przepuszczalną dla kationów jednowartościowych. Potwierdza to fakt, że magnez dodany w stężeniu przewyższającym stężenie EDTA przeciwdziała pęcznieniu mitochondriów i wszystkim towarzyszącym temu zjawisku zmianom. Prawdopodobnie zatem magnez związany w błonie mitochondrialnej warunkuje jej specyficzną nieprzepuszczalność dla jednowartościowych kationów. Takie zjawiska jak kontrola oddechowa, aktywność ATP-azy, pęcznienie, skurcz i szybkość oddychania byłyby więc zależne od istnienia w błonie kompleksu Mg — białko lub Mg — fosfolipid.

Skou (39) wykrył układ przenoszący sód i potas zwany ATP-azą transportującą („transport ATP-aza”), występujący w błonach erytrocytów, w błonach komórek nerwowych i innych oraz w endoplazmatycznym retikulum. Układ ATP-azy transportującej pod wieloma względami różni

się od opisanego wyżej układu działającego w mitochondriach. ATP-aza transportująca zużywa jako źródło energii wyłącznie ATP, podczas gdy mechanizm przenoszący kationy przez błonę mitochondrium potrafi także wykorzystać energię utleniania substratów bezpośrednio lub przy udziale hipotetycznych nieufosforylowanych intermedatów wysokoenergetycznych. ATP-aza transportująca przenosi tylko jony potasu i sodu, przy czym magnez jest aktywatorem reakcji, natomiast aktywnemu transportowi w mitochondriach podlega wiele kationów jedno- i dwuwartościowych. Wreszcie układy te różnie reagują na szereg inhibitorów; ouabaina jest specyficznym inhibitorem ATP-azy transportującej, a nie działa na układ mitochondrialny. Z kolei układ mitochondrialny hamowany jest przez szereg inhibitorów utleniania i oksydacyjnej fosforylacji, które nie wpływają na ATP-azę transportującą.

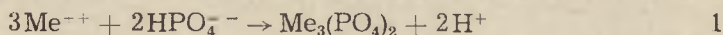
Prace doświadczalne z ostatnich kilku lat na temat transportu kationów do mitochondriów można z pewnego punktu widzenia podzielić na dwie grupy. Jedną z nich, do której należą prace Lehningera i wsp. (18, 20, 36) oraz grupy Greena (5), zajmuje się nagromadzeniem kationów w mitochondriach na tzw. dużą skalę, przekraczającą zjawiska fizjologiczne. Badacze ci zajmują się drobiazgowym określaniem warunków reakcji, potrzebnych składników środowiska, ich optymalnym stężeniem oraz opisują stechiometrię wymiany jonów towarzyszącej nagromadzeniu. Tłumaczenie samego zjawiska na podstawie tych danych jest jednak bardzo zawikłane i nie wydaje się przekonujące. Jedynie zdjęcia z mikroskopu elektronowego mitochondriów „naładowanych” wapniem lub strontem pozwoliły rozstrzygnąć gdzie wiążą się te kationy. Okazało się, że kationy dwuwartościowe gromadzą się wyłącznie w *matrix* (20). Badania drugiej grupy, do której należą prace Chance'a (8), Chappella i Greville'a (14), Chappella i Croftsa (10, 11, 12) oraz Sarisa (38), zajmują się nagromadzeniem na tzw. małą skalę i kładą szczególny nacisk na zmiany towarzyszące początkowej fazie procesu, wyodrębniając w ten sposób przyczyny pierwotne oraz zmiany wtórne. Stosowane są przy tym metody raczej fizyko-chemiczne niż chemiczne. Specjalna aparatura skonstruowana przez Chance'a, a następnie rozbudowana i ulepszona przez jego współpracowników, pozwala na jednoczesne mierzenie zużycia tlenu, zmian *pH*, zmian stężenia K^+ , pęcznienia i skurczu mitochondriów. Aktywność oddechową mitochondriów mierzy się metodą polarograficzną (elektrodą tlenową) lub oznaczając stan oksydoredukcji poszczególnych składników łańcucha oddechowego metodą spektrofotometrii różnicowej. Zmiany objętości mitochondriów mierzy się na podstawie rozproszenia światła, a zmiany stężenia jonów K^+ i H^+ — elektrochemicznie.

Rozsprzęganie oksydacyjnej fosforylacji przez Ca^{++} zaobserwował Chance (7) już w roku 1955. Okazało się potem, że analogicznie działają i inne kationy dwuwartościowe, a więc Sr^{++} i Mn^{++} . Obecnie wia-

domo, że wszystkie te kationy podobnie jak kationy jednowartościowe gromadzą się w mitochondriach w czasie aktywnego procesu. Jednak nieuszkodzona błona mitochondrialna nieprzepuszczalna dla kationów jednowartościowych łatwo przepuszcza kationy dwuwartościowe. Nie wiadomo w tej chwili, czy działa jakiś system przenośników tych kationów, czy po prostu wykazują one większe powinowactwo chemiczne do fosfolipidowej błony. Charakterystyka gromadzenia się tych kationów i towarzyszące temu zjawiska, jak pęcznienie, skurcz i wyrzucanie protonów, przedstawiają się trochę inaczej niż w przypadku kationów jednowartościowych. Np. gromadzeniu kationów dwuwartościowych w obecności octanu towarzyszy zawsze pęcznienie, natomiast w obecności fosforanu następuje pęcznienie albo skurcz zależnie, czy dany kation tworzy rozpuszczalny czy nierozpuszczalny fosforan. Skurcz następuje np. przy gromadzeniu strontu i manganu, natomiast nie występuje w obecności wapnia. Fosforany wapnia, apatyt i hydroksyapatyt są co prawda źle rozpuszczalne, ale wykazują, zwłaszcza hydroksyapatyt, specjalne właściwości charakterystyczne dla wymiennaczy jonowych. Tym, być może tłumaczy się jego nietypowe zachowanie się w mitochondrium. Chance i inni twierdzą co prawda, że Ca^{++} wiąże się specyficznie w miejscach sprzęgających oksydacyjną fosforylację, to znaczy w tym samym miejscu co ADP. Dowodem tego mogą być pomiary spektrofotometryczne stopnia utleniania i redukcji poszczególnych składników łańcucha oddechowego w obecności Ca^{++} (8, 34). Rasmussen (34) uważa, że tak samo wiąże się magnez. Różnica jest tylko taka, że wapń przenika spontanicznie, a przenikanie magnezu jest ułatwiane przez hormon przytarczycowy, który jest jedyną znaną dotychczas substancją fizjologiczną zmieniającą przepuszczalność błony mitochondrialnej działającą już w niskich stężeniach. Magnez zaś, jak już powiedziano, odgrywa być może specyficzną rolę w regulacji przepuszczalności błony mitochondrialnej. Taka korelacja w działaniu tych dwóch czynników *in vitro* może mieć znaczenie także *in vivo*. Rasmussen (34) badając szczegółowo wpływ hormonu przytarczycowego na nagromadzenie magnezu zauważył, że zwiększeniu przepuszczalności błony dla magnezu towarzyszy zwiększenie przepuszczalności dla potasu; nie wiadomo jednak, czy oba zjawiska są ze sobą powiązane przyczynowo. Hormon przytarczycowy nie wpływa na przenikanie przez błonę wapnia i innych kationów dwuwartościowych. Kompetycja Ca^{++} i Mg^{++} w procesie nagromadzenia może oznaczać, że wiążą się one w tych samych miejscach.

Według Rasmussena (34) w *matrix* znajduje się substancja o własnościach polianionu, która wiąże kationy. Ilość jednak tych miejsc wiążących jest ograniczona i nagromadzenie nie mogłoby zachodzić na większą skalę. Obecność przenikającego anionu, np. fosforanu lub octanu w środowisku wzmaga zatem nagromadzenie. W środowisku pojawiają się wtedy jony H^+ , które powstały w wyniku reakcji polianionu, fosforanu lub octanu, z kationem. Stosunek wyrzuconych protonów do nagromadzo-

nego kationu zależy zatem od stechiometrii reakcji zachodzącej wewnątrz mitochondrium. W wypadku gromadzenia wapnia bez dyfuzji anionu ze środowiska stosunek $H^+ : Ca^{++}$ wynosi 1. W obecności fosforanu tworzą się obojętne sole zgodnie z reakcją:



Stosunek $H^+ : Ca^{++}$ wynosi tu 1,5 co potwierdzają bezpośrednie pomiary (35, 36). Przyjmujemy, że w pH ok. 7,2 jon fosforanowy występuje głównie w formie dwuujemnego anionu.

W przeciwieństwie do Rasmussena, Chappell i Crofts uważają przemieszczenie protonów za zjawisko pierwotne, a ruch kationów za zjawisko wtórne, towarzyszące wytworzeniu elektrochemicznego gradientu błony przez pompę protonową. Natomiast Rasmussen uważa, że kationy wchodzą aktywnie i rugują protony z wnętrza mitochondriów. Doświadczalne rozwiązanie tego zagadnienia nie wydaje się obecnie możliwe. Natomiast wszyscy wymienieni autorzy są zgodni, że ruch anionów jest zawsze bierny i jest następstwem czynnego nagromadzania kationów.

Transport anionów i metabolitów

Transport anionów i metabolitów rozpatrywany będzie tutaj łącznie, ponieważ większość metabolitów mitochondrialnych występuje w postaci anionów. Wspomniano już, że aniony nieorganiczne nie przenikają przez błonę mitochondrialną prawie wcale z wyjątkiem fosforanu i arsenianu. Przypuszcza się, że przenikanie fosforanu uwarunkowane jest obecnością w błonie specjalnego układu przenoszącego. Jon arsenianowy, jako analog anionu fosforanowego, działa kompetycyjnie w wielu reakcjach zachodzących w mitochondrium, prawdopodobnie więc przenika przez błonę przy pomocy tego samego układu co fosforan. Trzeba zaznaczyć, że ta wysoka specyficzność wobec anionów nieorganicznych jest cechą wyłącznie naturalnych błon fosfolipidowych i nie występuje w sztucznych micellach. Badając sztuczne błony fosfolipidowe B a n g h a m, S t a n d i s h i W a t k i n s (4) stwierdzili, że jony chlorkowe i jodkowe przenikają przez nie bardzo szybko, podczas gdy azotany, siarczany i fosforany — dużo wolniej. Zatem ograniczoną przepuszczalność błon mitochondrialnych w stosunku do anionów nieorganicznych warunkują prawdopodobnie kompleksy lipoproteidowe.

Jak wspomniano, przenikanie anionów przez błonę mitochondrium jest biernym następstwem transportu kationów. Istnieją jednak warunki, w których aniony organiczne przenikają do wnętrza, mimo że transport kationów w jakiś sposób jest uniemożliwiony. Taka sytuacja jest np. wtedy, gdy mitochondria intensywnie oddychają w obecności substratu i substancji rozprzegających np. dwunitrofenolu. Nagromadzenie kationów jest w tym przypadku niemożliwe, gdyż odcięty jest dopływ energii,

oddychanie jednak zachodzi, a więc substrat musi przenikać do wnętrza. Powstaje zatem pytanie, czy przenikanie substratów utleniających jest bierne, to znaczy niezależne od energii, a uwarunkowane tylko różnicą stężeń i szybkością ich zużytkowywania, czy też układ transportujący substraty ogranicza szybkość ich utleniania.

Doświadczenia wykazały, że transport anionów rzeczywiście jest bierny, gdyż nie zużywa energii, jest on jednak ograniczony specyficznością błony w stosunku do pewnych grup substancji. Już dawno obserwowano duże różnice w aktywności oddechowej mitochondriów różnego pochodzenia wobec różnych substratów. Chappell (9) zauważył, że cytrynian utlenia się bardzo słabo, natomiast w obecności katalitycznych ilości jabłczanu intensywność oddychania wzrasta wielokrotnie. De Haan i Tager (17) stwierdzili, że utlenianie α -ketoglutaranu zachodzi dużo szybciej w obecności malonianu. Van den Bergh i Slater (41) używając sarkosomów z mięśni skrzydłowych muchy, wykazali, że nieuszkodzone mitochondria utleniają z dużą szybkością tylko α -glicerofosforan i pirogronian + jabłczan. Natomiast po sonikacji aktywność oddechowa wobec wielu intermediatów cyklu Krebsa wyrównała się (tablica 1).

Tak zwana „latentność” niektórych enzymów mitochondrialnych może być w pewnych przypadkach wytłumaczona nieprzepuszczalnością błony dla substratów. Na przykład hydratasa fumaranu jest nieaktywna, gdy bada się całe mitochondria, lecz aktywność jej wzrasta wielokrotnie po lizie spowodowanej tritonem X100 (14). Jest to dowodem, że przepuszczalność błony ogranicza metabolizowanie pewnych substratów.

Chappell i Haarhoff (15) badali pęcznienie mitochondriów w 0,1M roztworze soli amonowych substratów i pochodnych substratów. Pęcznienie wywoływano w obecności inhibitorów oddechowych, aby wykluczyć wszelki udział energii. Sole metali jednowartościowych nie wywoływały w tych warunkach w ogóle pęcznienia. Autorzy sądzą, że dzieje

Tablica 1

Wpływ rozbijania ultradźwiękami (sonikacji)
na aktywność oddechową mitochondriów z mięśni skrzydłowych muchy (41)

Substrat	Aktywność oddechowa	
	Mitochondria całe	Mitochondria rozbite
α -glicerofosforan	634	464
Pirogronian + jabłczan	263	244
Bursztynian	36	257
NADH ₂	31	381
α -ketoglutaran	25	131
Izocytrynian	21	298
Glutaminian	23	53
Jabłczan	24	68

T a b l i c a 2

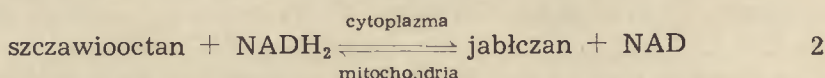
Przenikanie anionów przez błonę mitochondrialną (15)

	Aniony przenikające		Aniony nie przenikające
	w obecności fosforanu	w obecności fosforanu i jabłczanu	
Fosforan	D-jabłczan	Cytrynian	Chlorek
Arsenian	L-jabłczan	<i>cis</i> -akonitan	Bromek
Mrówczan	Malonian	D-winian	Dwuwęglan
Octan	Bursztynian	L-winian	Siarczan
Propionian	Metyleno-		Fumaran
Maślan	bursztynian		Maleinian
	<i>mezo</i> -winian		<i>trans</i> -akonitan

Dotychczasowe obserwacje intensywności zużywania różnych substratów przez mitochondria przemawiają za istnieniem permeaz. Dalsze próby zmierzają do znalezienia bezpośrednich dowodów istnienia permeaz, lub stwierdzenia innego sposobu przenikania substratów.

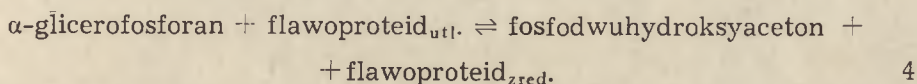
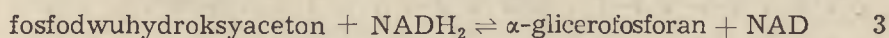
Wybiórcza i bardzo ograniczona przepuszczalność błony mitochondrialnej względem związków pośrednich w cyklu Krebsa pozwala utrzymać wysokie stężenie substratów wewnątrz mitochondrium, co umożliwia funkcjonowanie całego cyklu utleniania.

Głównymi substratami dostarczonymi mitochondriom przez cytoplazmę są pirogronian i NADH_2 . Pirogronian wnika przez błonę dobrze, natomiast NADH_2 prawie wcale. W komórce jednak zachodzi utlenianie NADH_2 gromadzącego się podczas glikolizy. Okazało się, że sposób utleniania NADH_2 nie polega na przenoszeniu cząsteczek przez układ w rodzaju permeaz, a na działaniu układu oksydoredukcyjnego, przez który przenoszony jest tylko wodór, natomiast pule cytoplazmatycznych i mitochondrialnych nukleotydów nikotynamidowych nie wymieniają się. Według K r e b s a (23) utlenianie gromadzonego w cytoplazmie NADH_2 odbywa się przy współdziałaniu dehydrogenazy jabłczanowej, która znajduje się zarówno w cytoplazmie, jak i w mitochondriach. W wyniku reakcji:



w cytoplazmie powstaje jabłczan, który łatwo dyfunduje do mitochondriów, tam utlenia się do szczawiooctanu, redukując wewnątrzmitochondrialną pulę NAD , który dalej utlenia się w łańcuchu oddechowym. Aby układ ten mógł spełniać przypisywaną mu funkcję, należy przyjąć, że zarówno jabłczan, jak i szczawiooctan przenikają łatwo przez błonę mitochondrialną. Jak obecnie wiadomo, jabłczan jest jednym z najlepiej przenikających substratów (15), a szczawiooctan również przenika dobrze (43). Układ jabłczan — szczawiooctan — dehydrogenaza jabłczanowa jest

najbardziej rozpowszechniony i działa prawdopodobnie w większości tkanek zwierząt kręgowych. W mięśniach owadów natomiast działa prawdopodobnie inny układ utleniający NADH_2 (6, 19):



Dehydrogenaza α -glicerofosforanu, katalizująca reakcję 3, znajduje się w cytoplazmie (enzym Baranowskiego). Natomiast reakcja 4 zachodzi w mitochondriach przy udziale enzymu flawinowego (flawinowa dehydrogenaza α -glicerofosforanu). Zarówno α -glicerofosforan, jak i fosfodwuhydroksyaceton dobrze przenikają przez błony sarkosomów. Należy podkreślić, że układ dehydrogenaz α -glicerofosforanu może przenosić wodór z NADH_2 tylko w jednym kierunku, to znaczy do mitochondriów, gdyż w mitochondriach α -glicerofosforan redukuje nie NAD, lecz flawoproteid, który oddaje wodór przez układ cytochromowy na tlen bez udziału mitochondrialnego NAD. Natomiast układ dehydrogenazy jabłczanowej może działać w obu kierunkach zależnie od stosunku $\text{NAD}:\text{NADH}_2$ w cytoplazmie i mitochondriach, oraz od bezwzględnej różnicy stężeń jabłczanu wewnątrz i zewnątrz mitochondriów. Gdy w cytoplazmie istnieje duże zapotrzebowanie na NADH_2 , np. w procesie glukoneogenezy, wówczas reakcja 2 tak w mitochondriach jak i w cytoplazmie przebiega w kierunku odwrotnym, niż to zaznaczono strzałkami.

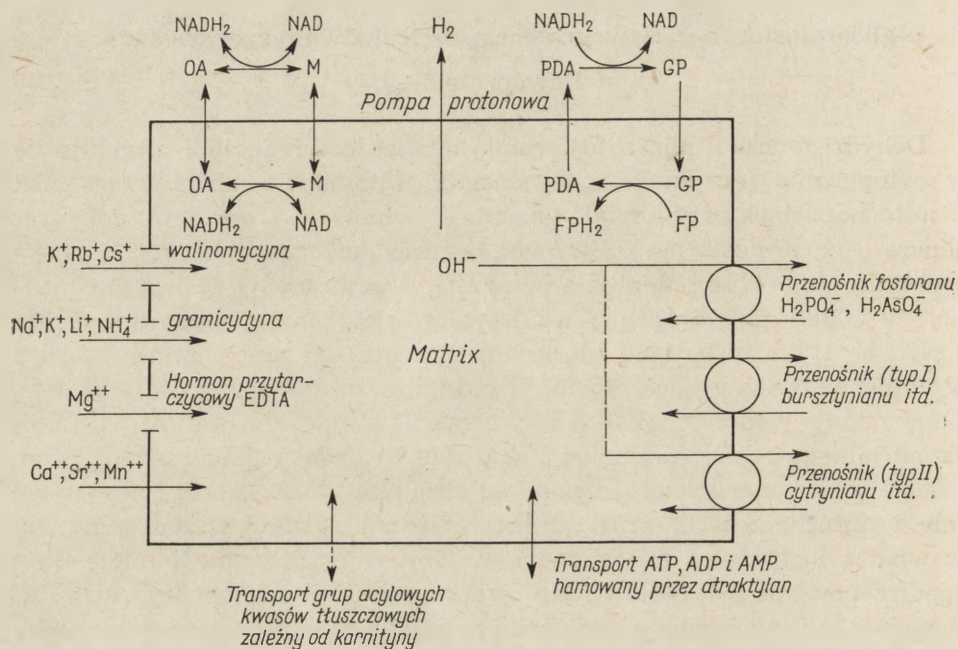
Nasuwa się pytanie, jaki jest udział tych dwóch układów w utlenianiu NADH_2 w poszczególnych tkankach. Częściową odpowiedź na to pytanie dało zbadanie aktywności dehydrogenazy jabłczanowej i dehydrogenaz α -glicerofosforanu w różnych tkankach. Okazało się (37), że wątroba zawiera obie dehydrogenazy α -glicerofosforanu i dehydrogenazę jabłczanową w ilościach, które umożliwiają działanie obu systemów. Natomiast mięsień sercowy nie zawiera wcale mitochondrialnej dehydrogenazy α -glicerofosforanu i bardzo mało — cytoplazmatycznej. Z tego wynikałoby, że w sercu główną rolę w transporcie NADH_2 spełnia układ dehydrogenazy jabłczanowej. W mięśniach owadów w trakcie glikolizy nagromadza się α -glicerofosforan, a nie kwas mlekowy (24), uważa się zatem, że układ dehydrogenaz α -glicerofosforanu odgrywa w nich istotną rolę w utlenianiu cytoplazmatycznego NADH_2 .

Udział karnityny w przenoszeniu i utlenianiu kwasów tłuszczowych został omówiony w oddzielnym artykule *Postępów Biochemii* (45).

Nukleotydy adeninowe: ATP, ADP i AMP przenikają bardzo szybko przez błony mitochondrialne, ale wydaje się, że transport ten zachodzi dzięki istnieniu specjalnego układu przenoszącego. Świadczy o tym: po pierwsze — duża specyficzność, gdyż inne nukleotydy, prócz adeninowych,

nie przenikają; po drugie — hamowanie przenikania przez atraktylan (31, 32).

Omówione w niniejszym artykule zagadnienia dotyczące przenoszenia różnych substancji przez błony mitochondrialne przedstawia schemat 4.



Schemat 4. Mechanizmy przenoszenia różnych substancji przez błonę mitochondrialną (wg 15, zmodyfikowany)

Objaśnienia: FP i FPH₂ — flawoproteid (dehydrogenaza α-glicerofosforanu) utleniony i zredukowany, GP — α-glicerofosforan, PDA — fosfodwuhydroksyaceton, M — jabłczan, OA — szczawiooctan

LITERATURA

1. Amoore J. E., Bartley W., *Biochem. J.* **69**, 223 (1958).
2. Amoore J. E., *Biochem. J.* **76**, 438 (1960).
3. Azzi A., Rossi E., Azzone G. F., *IEG* **1**, No 529 (1966).
4. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C., *J. Mol. Biol.* **13**, 238 (1965).
5. Brierley G. P., Bachmann E., Green D. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1928 (1962).
6. Bücher T., Klingenberg M., *Angew. Chem.* **70**, 522 (1958).
7. Chance B., *Proc. 3rd Intern. Congr. Biochem.*, Brussels, 1955, red. C. Liebecq, New York, 1956, str. 300.
8. Chance B., *J. Biol. Chem.* **240**, 2729 (1965).
9. Chappell J. B., w *Biological Structure and Function*, tom II, red. T. W. Goodwin i O. Lindberg, New York, 1961, str. 71.
10. Chappell J. B., Croft A. R., *Biochem. J.* **95**, 378 (1965).

11. Chappell J. B., Crofts A. R., *Biochem. J.* **95**, 387 (1965).
12. Chappell J. B., Crofts A. R., *Biochem. J.* **95**, 393 (1965).
13. Chappell J. B., Crofts A. R., w Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (B.B.A. Library, tom VII), red. J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, E. C. Slater, Amsterdam, 1966, str. 293.
14. Chappell J. B., Greville G. D., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 483 (1960).
15. Chappell J. B., Haarhoff K. N., w Biochemistry of Mitochondria, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak, Warszawa i Londyn, 1966, str. 75.
16. Christie G. S., Ahmed K., Mc Lean A. E. M., Judah J. D., *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 432 (1965).
17. De Haan E. J., Tager J. M., 3rd FEBS Meeting, Warsaw, 1966, Abstract M 77.
18. Drahota Z., Carafoli E., Rossi C. S., Gamble R. L., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **240**, 2712 (1965).
19. Estabrook R. W., Sacktor B., *J. Biol. Chem.* **233**, 1014 (1958).
20. Greenawalt J. W., Rossi C. S., Lehninger A. L., *J. Cell Biol.* **23**, 21 (1964).
21. Greville G. D., Chappell J. B., *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 267 (1959).
22. Judah J. D., Mc Lean A. E. M., Ahmed K., Christie G. S., *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 441 (1965).
23. Krebs H. A., w Biochemistry of Mitochondria, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak, Warszawa i Londyn, 1966, str. 105.
24. Kubišta V., *Biochem. Z.* **330**, 315 (1958).
25. Lehninger A. L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **86**, 484 (1960).
26. Malamed S., Recknagel J., *J. Biol. Chem.* **234**, 3027 (1950).
27. Mitchell P., *Nature* **191**, 144 (1961).
28. Mitchell P., w Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (B.B.A. Library, tom VII), red. J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello i E. C. Slater, Amsterdam, 1966, str. 65.
29. Moore C., Pressman B. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 562 (1964).
30. Neubert D., Lehninger A. L., *Biochim. Biophys. Acta* **62**, 556 (1962).
31. Pfaff E., Rozprawa doktorska, Philipps-Universität, Marburg, 1965.
32. Pfaff E., Klingenberg M., Heldt H. W., *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 312 (1965).
33. Pressman B. C., w Energy-linked Functions of Mitochondria, red. B. Chance, New York, 1963, str. 219.
34. Rasmussen H., Ogata E., *Biochemistry* **5**, 733 (1966).
35. Rossi C. S., Carafoli E., Drahota Z., Lehninger A. L., w Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria (B.B.A. Library, tom VII), red. J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello E. C. Slater, Amsterdam, 1966, str. 317.
36. Rossi C. S., Lehninger A. L., *Biochem. Z.* **333**, 698 (1963).
37. Sacktor B., Dick A. R., *Science* **145**, 606 (1964).
38. Saris N. E., Dissertation, University of Helsinki, 1963.
39. Skou J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 6 (1960).
40. Tedeschi H., Harris D. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **58**, 52 (1955).
41. Van den Bergh S. G., Slater E. C., *Biochem. J.* **82**, 362 (1962).
42. Vasington F. D., Murphy J. V., *J. Biol. Chem.* **237**, 2670 (1962).
43. Wojtczak A. B., Chappell J. B., 3rd FEBS Meeting, Warsaw, 1966, Abstract M 51.
44. Wojtczak L., *Post. Biochem.* **10**, 43 (1964).
45. Zborowski J., *Post. Biochem.* **12**, 563 (1966).
46. Żydowo M., *Post. Biochem.* **8**, 165 (1962).

JÓZEF ZBOROWSKI*

Udział karnityny w utlenianiu kwasów tłuszczowych w mitochondriach

The Influence of Carnitine on the Oxidation of Fatty Acids in Mitochondria

PANU PROFESOROWI JÓZEFOWI HELLEROWI
Z OKAZJI 70-TEJ ROCZNICY URODZIN

The role carnitine esters in the transfer of fatty acyl groups across mitochondrial membranes is reviewed.

DL-karnityna (kwas β -hydroksy- γ -betainomasłowy) jest szeroko rozpowszechniona wśród mikroorganizmów, roślin, zwierząt bezkręgowych i kręgowców. Mięśnie szkieletowe zwierząt kręgowych są najbogatszym jej źródłem (25) i w nich też po raz pierwszy w roku 1905 wykazali jej obecność Gulewitsch i Krimberg (44) oraz niezależnie — Kutschcher (53). Pierwsze próby wyjaśnienia fizjologicznej roli karnityny podjęto w latach 1936—37 (78, 79), jednak dopiero gdy 10 lat później Fraenkel (23, 24, 25) i Carter (17) ustalili, że karnityna jest egzogennym czynnikiem wzrostowym dla niektórych owadów, związkiem tym zainteresowało się wielu badaczy.

Fritz (27, 28, 29) wykazał, że pozbawiony białek wyciąg z mięśni szkieletowych szczura wzmaga utlenianie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych *in vitro* w homogenatach i skrawkach wątroby; analogicznie działała dodana syntetyczna DL-karnityna. Natomiast kwasy laurynowy (C_{12}) i kaprylowy (C_8) utleniane były przez homogenaty wątroby z maksymalną szybkością bez udziału karnityny (31). Karnityna zwiększała również utlenianie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych we fragmentach mięśni szkieletowych (34). Nie wzmagała ona natomiast utleniania długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w układach rozpuszczalnych, kiedy fragmenty wątrobowe poddane były działaniu dezoksyholanu, lub gdy uległy dostatecznie dobremu rozbiciu pod wpływem czynników mechanicznych i homogenizowania w wodzie destylowanej (30). Sugerowało to, że zachowanie struktury wewnątrzkomórkowej jest warunkiem działania karnityny. Za wnioskiem tym przemawiały również inne obserwacje. Karnityna nie wpływała na reakcję aktywowania kwasu tłuszczowego opisaną przez Kornberga i Pricera (51), ani na utlenianie pal-

* Mgr, doktorant PAN — Zakład Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego.

T a b l i c a 1

Porównanie wydajności utleniania wolnych kwasów tłuszczowych i ich estrów karnitynowych oraz aktywności acetylotransferazy acetylo CoA: karnityna (E.C.2.3.1.7) w mitochondriach z różnych narządów szczura (wg 3,6)

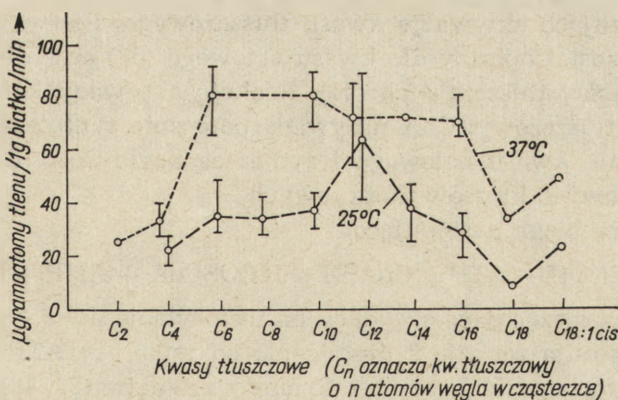
Narząd	μgramoatomy tlenu/1g białka/min.										Aktywność acetylotransferazy acetylo-CoA: karnityna w μmoleach rozłożonej acetylokarnityny /godz./g białka
	Kwas octowy (C ₂)		Kwas masłowy (C ₄)		Kwas kaprynowy (C ₁₀)		Kwas palmitynowy (C ₁₆)		Kwas palmitoleinowy (C _{16:1})		
	wolny	ester karnityny	wolny	ester karnityny	wolny	ester karnityny	wolny	ester karnityny	wolny	ester karnityny	
Mięsień sercowy	47 (26—60)	160 (102—199)	52 (44—54)	173 (110—223)	152 (135—171)	255 (150—262)	3 (0—3)	172 (159—209)			6.500
Wątroba	4	19 (17—23)	22 (18—29)	56 (50—63)	36 (25—41)	90 (85—93)	28 (19—54)	82 (78—86)			57
Nerka	11 (8—13)	88 (75—98)	22 (20—25)	135 (111—152)	17 (13—19)	146 (137—149)	4 (2—7)	81 (73—89)			850
Mięśnie szkieletowe	0	110 (104—117)	0	37	0	120 (101—139)	0	80 (72—88)			7.900

mitylo-CoA, co wskazywało, że działa ona na etapie wcześniejszym, aniżeli utworzenie tego związku pośredniego w procesie β -oksydacji i że może ona ułatwiać przejście kwasu palmitynowego do miejsca, w którym jest on utleniany.

Fritz, Kaplan i Yue (35) prowadząc badania na izolowanych sarkosomach z mięśnia sercowego stwierdzili, że dodanie karnityny zwiększa kilkakrotnie szybkość utleniania długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, przy czym wpływ CoA na szybkość utleniania zaznacza się jedynie w obecności karnityny. Wykazali oni, że obecność grupy OH przy węglu β w cząsteczce karnityny jest konieczna i z wielu zsyntetyzowanych przez nich pochodnych karnityny działał jedynie kwas β -hydroksy- γ -dwumetyloaminomasłowy. Dane o udziale karnityny potwierdził i ugruntował Bremer (8, 9, 10), który obserwował szybkie utlenianie estrów karnitynowych niektórych kwasów tłuszczowych w mitochondriach z różnych organów szczura.

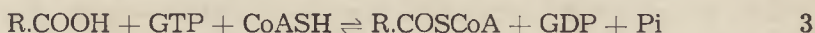
Dokładne dane o szybkości utleniania wolnych kwasów tłuszczowych i ich estrów karnitynowych dla całego szeregu homologicznego w mitochondriach z różnych organów kręgowców podali Bode i Klingenberg (6), a dla owadów — Bennakers (2).

Z tablicy 1 wynika, że mitochondria z różnych organów różnią się pod względem zdolności utleniania wolnych kwasów tłuszczowych, oraz że estry karnitynowe długołańcuchowych kwasów tłuszczowych są utleniane z dużo lepszą wydajnością, aniżeli wolne kwasy tłuszczowe. W mitochondriach z mięśni szkieletowych estry karnitynowe utleniają się ze znaczną szybkością, podczas gdy utlenianie wolnych kwasów tłuszczowych nie zachodzi w ogóle. W mitochondriach wątroby natomiast, wolne kwasy tłuszczowe utleniają się z dość znaczną szybkością, a karnityna zdaniem jednych autorów (86) jest niezbędna dla osiągnięcia maksymalnej szybkości utleniania, według innych wpływ jej jest niewielki, chociaż wyraźnie zależny od długości łańcucha alifatycznego (4, 5, 6). (rysunek 1).



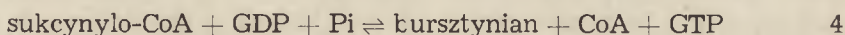
Rys. 1. Utlenianie kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha w izolowanych mitochondriach wątroby szczura (wg 6)

Drugi układ aktywujący kwasy tłuszczowe opisany niedawno (69), wymaga GTP i katalizuje reakcję:



Aktywację przy udziale GTP stwierdzono po raz pierwszy w mitochondriach wątroby wołu, a ostatnio wykazano istnienie obu opisanych układów aktywujących w izolowanych mitochondriach wątroby szczura (4).

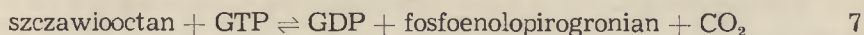
GTP powstaje przy utlenianiu α -ketoglutaranu w reakcji fosforylacji substratowej:



i może reagować z ADP lub AMP (20, 45):



Nieznaczną część GTP w specjalnych warunkach wykorzystywana jest w reakcji (71):



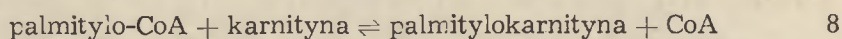
Na możliwość udziału fosforylacji substratowej w aktywacji kwasów tłuszczowych zwrócił uwagę już w roku 1945 Lehninger (55) wykazując, że kwasy tłuszczowe mogą ulegać utlenieniu w nieobecności nukleotydów adeninowych, jeżeli w środowisku inkubacyjnym znajduje się α -ketoglutaran. Bode i Klingenberg (6) stwierdzili później, że α -ketoglutaran jest niezbędny dla całkowitego utlenienia długołańcuchowych kwasów tłuszczowych niezależnie od obecności innych związków pośrednich cyklu Krebsa. Fosforylacja substratowa nie jest hamowana przez 2,4-dwunitrofenol (46, 47), natomiast jest hamowana przez niskie stężenia arsenianu (19, 70). Aktywacja kwasów tłuszczowych kosztem GTP, powstającego na drodze fosforylacji substratowej może zachodzić w mitochondriach w obecności czynników rozprzegających oksydacyjną fosforylację np. w obecności 2,4-DNP, lub dużych stężeń niektórych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (7, 68), jednakże nie w obecności dużych stężeń ortofosforanu (4). Wydaje się, że ten rodzaj aktywacji kwasów tłuszczowych w komórkach *in vivo* ma duże znaczenie.

II. Mechanizm działania estrów karnitynowych w transporcie grup acylowych przez błony mitochondrialne

Jak już wspomniano, karnityna jest acetylowana enzymatycznie w obecności kwasu octowego, ATP i CoA (26). Enzym katalizujący tę reakcję wyizolowano z rozpuszczalnej frakcji wątroby i częściowo oczyszczono (38, 39). Stwierdzono także, że znaczne ilości acetylokarnityny tworzą się podczas utleniania pirogronianu w obecności karnityny (8, 9, 14).

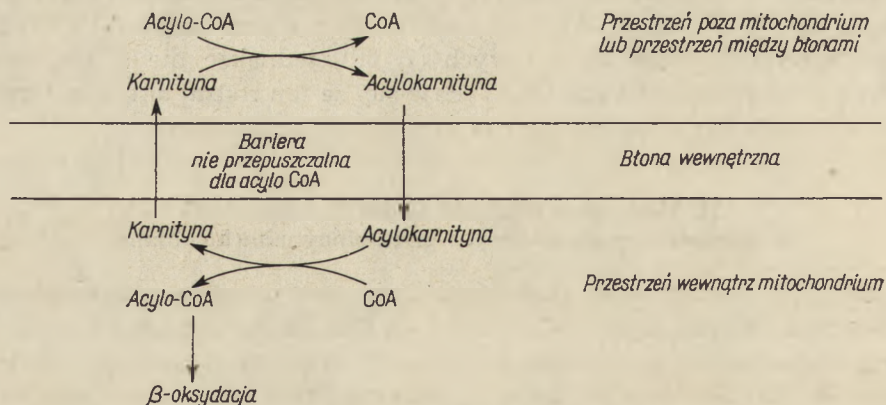
Grupa acetylowa L-acetylokarnityny (D-izomer jest inhibitorem acetylotransferazy acetylo-CoA: karnityna (64)) zachowuje się jak „czynny octan” i w obecności niewielkich stężeń bursztynianu jest całkowicie utleniana w cyklu *Krebsa* przez mitochondria w warunkach, w których nie zachodzi utlenianie kwasu octowego (8). Na podstawie tych obserwacji *Bremer* (8) wysuwa przypuszczenie, że acetylo-CoA pochodzący z przemian cukrowców może być wykorzystany np. do biosyntezy kwasów tłuszczowych przy udziale pozamitochondrialnej acetylotransferazy acetylo-CoA: karnityna. Karnityna działa więc jako przenośnik grup acetylowych przez błony mitochondrialne. *Bremer* (9, 10) udowodnił następnie jej udział w przenoszeniu również innych grup acylowych do mitochondriów. Stwierdził on bowiem, że różne długołańcuchowe kwasy tłuszczowe podane w formie estrów karnitynowych są wydajnie utleniane przez mitochondria. W obecności związków pośrednich cyklu *Krebsa* produktem utleniania był CO_2 , a w nieobecności — kwas acetoctowy.

W mitochondriach (11, 32) i w mikrosomach (11) wykazano też odwracalną reakcję:



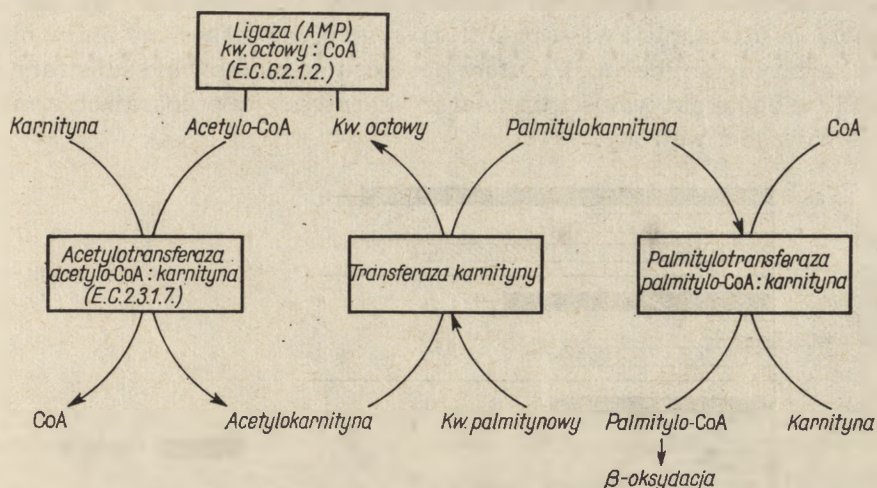
katalizowaną przez palmitylotransferazę palmitylo-CoA: karnityna. Okazało się, że palmitylokarnityna utlenia się w sarkosomach serca lepiej aniżeli palmitylo-CoA, a dodatek karnityny stymuluje utlenianie palmitylo-CoA i stearylo-CoA w nieobecności ATP. Przemawia to za udziałem karnityny w transporcie acylo-CoA do kompartmentu β -oksydacji. Podobnie utlenianie acetylo-CoA stymulowane jest przez karnitynę, natomiast nie wpływa ona na utlenianie kwasu octowego.

Fritz i *Schultz* (37) oraz *Norum* (63) wykazali, że acetylotransferaza jest specyficznym enzymem acylacji krótkołańcuchowych, a palmitylotransferaza — długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Zaproponowany przez *Fritza* (35,40) mechanizm działania karnityny przedstawia schemat 1.



Schemat 1.

Hipoteza Bode i Klingenberga. Autorzy ci (6) zaproponowali własny schemat tłumaczący mechanizm działania karnityny (schemat 2)

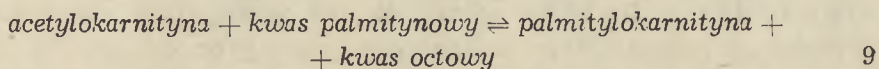


Schemat 2.

Przesłankami ich hipotezy były następujące fakty:

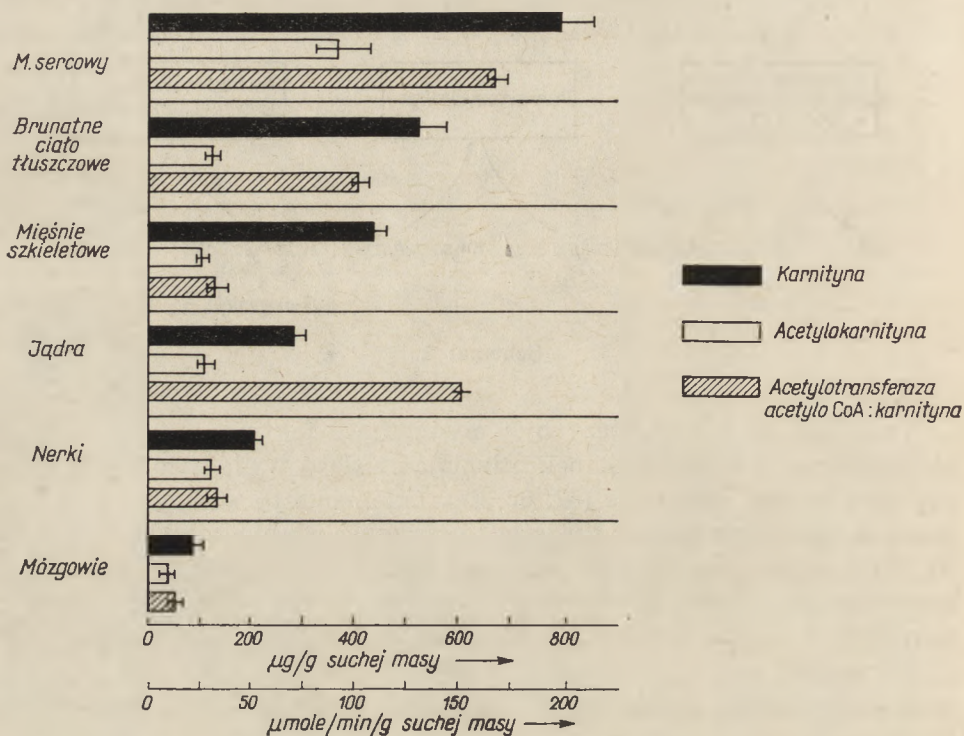
- Mitochondria różnych tkanek utleniają ze słabą wydajnością długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (57, 60, 67). Utlenianie to wzmagają się po dodaniu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych lub α -ketoglutaranu (6).
- Acetylokarnityna stymuluje maksymalnie utlenianie kwasu palmitynowego niezależnie od obecności CoA, natomiast stymulujący wpływ karnityny wymaga obecności CoA i jest zależny od jego stężenia (35).
- Aktywność acetylotransferazy acetylo-CoA:karnityna jest wysoka w mitochondriach z narządów, w których utlenianie kwasów tłuszczowych wymaga obecności karnityny (np. z mięśni szkieletowych i serca (3, 59)), jest natomiast niska w mitochondriach wątroby (tablica 1).
- Aktywność acetylotransferazy acetylo-CoA:karnityna w różnych tkankach jest zgodna z poziomem karnityny i acetylokarnityny w tych tkankach (6, 59) (rysunek 2).
- Aktywność syntetazy acylo-CoA (E.C.6.2.1.3) w izolowanych sarkosomach serca szczura jest bardzo niska (6), a w tkance wątrobowej syntetaza znajduje się głównie poza mitochondriami (21).

Przeciwko hipotezie Bode i Klingenberga wypowiedzają się Fritz i Marquis (36, 41), którzy kwestionują reakcję:



Acetylokarnityna musiałaby wg schematu Bode i Klingenberga powstać pierwotnie z acetylo-CoA i karnityny przy udziale acetylotransferazy. Zatem, zahamowanie syntezy acetylokarnityny powinno znieść stymu-

lujący wpływ karnityny na utlenianie kwasów tłuszczowych w mitochondriach. Fritz i Marquis (36) stosując hamowanie kompetycyjne acetylotransferazy acetylo-CoA: karnityna nie zaobserwowali jednak zahamowania utleniania kwasu palmitynowego przez sarkosomy ani w obecności karnityny ani bez niej. Autorzy ci stosując piętnowane substraty nie znaleźli w ogóle aktywności transferazy karnityny w preparatach z mięśnia sercowego i wątroby.



Rys. 2. Porównanie zawartości karnityny, acetylokarnityny i aktywności acetylotransferazy acetylo-CoA: karnityna (EC. 2.1.3.7) w różnych narządach szczura (wg 59)

Hipoteza Garlanda. Chappell i Crofts (18, 19) zastosowali do badania utleniania kwasów tłuszczowych w izolowanych mitochondriach wątroby fluorymetryczną metodę oznaczania stopnia redukcji NAD. Stosunek NADH_2/NAD zwiększa się przy tworzeniu się keto-pochodnej kwasu tłuszczowego w procesie β -oksydacji. Stosując metodę fluorymetryczną Chappell i Crofts stwierdzili, że wymagające obecności ATP i karnityny utlenianie kwasu palmitynowego jest częściowo hamowane przez atraktylan (alkaloid z korzeni *Atractylis guminifera*). Związek ten stwarza wokół wewnętrznej błony mitochondrialnej barierę nieprzepuszczalną dla ATP i innych nukleotydów adeninowych (15, 19, 40, 50). Atraktylan nie hamuje natomiast utleniania palmitylo-CoA w obecności karni-

tyny, ani utleniania palmitylokarnityny. Dane te potwierdzili Garland i wsp. (86). Wykazali oni ponadto, że w obecności atraktylanu i arsenianu, a więc w warunkach kiedy nie może zachodzić synteza GTP stosunek NADH_2/NAD przy utlenianiu kwasu palmitynowego w obecności karnityny i ATP (lub utlenianiu palmitylokarnityny), wzrasta dopiero po dodaniu CoASH. Świadczy to, że w mitochondriach utlenianie kwasów tłuszczowych zachodzi w obrębie bariery atraktylanowej, a więc w błonie wewnętrznej kontaktującej się z *matrix*, podczas gdy aktywacja kosztem dodanego z zewnątrz ATP zachodzi w innym kompartmentcie, przed barierą atraktylanową. Karnityna odgrywałaby rolę przenośnika grup acylowych przez błonę wewnętrzną, nieprzepuszczalną dla acylowych pochodnych CoA (10, 18, 33, 62). Z dwu syntetaz acylo-CoA omawianych poprzednio jedna, w obrębie bariery atraktylanowej, zależna (od GTP) czuła na arsenian, zużywałaby endogeny CoA, druga zaś na zewnątrz bariery atraktylanowej, nieczuła na arsenian (zależna od ATP) wykorzystywałaby dodany CoASH. Zdaniem Garlanda i wsp. (86, 87) w mitochondriach istnieją trzy pule CoA: jedna w przestrzeni między błonami oraz dwie w obrębie bariery atraktylanowej. Zawarty w obrębie bariery atraktylanowej CoA wchodzący w skład jednej z puli byłby dostępny dla syntetazy acylo-CoA wymagającej GTP (a być może również dla dehydrogenazy α -ketoglutaranu (E.C.1.2.4.2) i syntetazy sukcynylo-CoA (E.C.6.2.1.4)), a niedostępny dla enzymów β -oksydacji. CoA wchodzący w skład drugiej puli, związany z błoną, jest dostępny jedynie dla enzymów β -oksydacji. Ten CoA byłby acylowany jedynie przez palmitylokarnitynę, a nie przez palmitylo-CoA lub kwas palmitynowy i ATP w obecności karnityny. CoA zawarty w przestrzeni między błonami w świeżo wyizolowanych mitochondriach zapewne pochodzi z cytoplazmy, z której przedostał się na skutek dyfuzji przez przepuszczalną nawet dla dużych cząsteczek zewnętrzną błonę mitochondrialną.

Według hipotezy Garlanda powstawanie estrów karnitynowych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych jest niezbędnym warunkiem przedostania się cząsteczek kwasu do kompartmentu mitochondrialnego, w którym ulegają one utlenianiu.

Za hipotezą przemawia stwierdzenie Garlanda i wsp. (75), że w warunkach maksymalnej wydolności utleniania kwasów tłuszczowych w mitochondriach szybkość przemiany palmitylo-CoA w palmitylokarnitynę jest bliska szybkości utleniania palmitylo-CoA, podczas gdy aktywność syntetazy palmitylo-CoA (E.C.6.2.1.3) jest dużo wyższa. Autorzy ci są zatem zdania, że czynnikiem ograniczającym utlenianie kwasu palmitynowego lub palmitylo-CoA w mitochondriach jest wydolność palmitylotransferazy palmitylo-CoA: karnityna, a nie syntetazy acylo-CoA (E.C.6.2.1.3) jak przyjmują Krebs (52) i Klingenberg (5), czy też dehydrogenazy acylo-CoA (E.C.1.3.2.2) jak utrzymują Bunyan i Greenbaum (16).

III. Lokalizacja enzymów w komórce i w mitochondriach

Rezultaty szeregu badań (8, 14, 41, 65) wykazują, że karnityna służy nie tylko jako przenośnik grup acylowych do wnętrza mitochondrium, ale również ułatwia przejście pochodnych acylo-CoA na zewnątrz.

Acetylotransferaza acetylo-CoA: karnityna. Jak już wspomniano acetylowanie karnityny katalizowane jest zarówno przez enzym znajdujący się wewnątrz jak i na zewnątrz mitochondriów. Dane o aktywności enzymu w różnych tkankach szczura przedstawia rysunek 2, a dane o jego aktywności w mitochondriach z różnych narządów umieszczono w tablicy 1.

Lokalizacja enzymu wewnątrz mitochondrium jest sprawą kontrowersyjną: według jednych badaczy (1, 3) maksymalna aktywność enzymu znajduje się w rozpuszczalnej frakcji mitochondrialnej, inni (59) znajdują w tej frakcji tylko 20% aktywności acetylotransferazy pomimo, iż frakcja ta zawiera około 85% wolnej karnityny. Według badań *Fritz* a (38) i *Norum* (62) enzym znajduje się głównie we frakcji nierozpuszczalnej.

Palmitylotransferaza palmitilo-CoA: karnityna. Enzym ten jest specyficzny dla długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (33, 37, 40, 64, 87). *Fritz* i *Yue* (40) znajdują dużą aktywność enzymu we frakcji rozpuszczalnej po wirowaniu fragmentów mitochondriów przy 25 000 g (40). Ostatnio ustalono, że jest on zlokalizowany we frakcji błon mitochondrialnych (66).

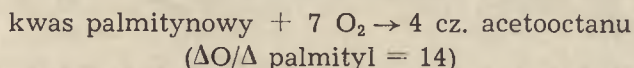
IV. Regulacja końcowego etapu utleniania kwasów tłuszczowych

Utlenianie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych zwiększa w mitochondriach zawartość acetylo-CoA (42), który dalej może być metabolizowany w cyklu Krebsa lub wykorzystany do syntezy acetoocetanu. Zużywanie acetylo-CoA do syntezy acetoocetanu można tłumaczyć niskim poziomem szczawioocetanu (56, 81) wywołanym przez wzrost stosunku NADH_2/NAD podczas utleniania kwasów tłuszczowych (83).

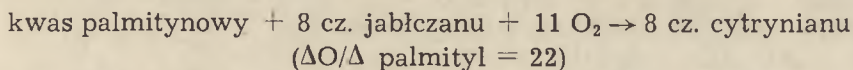
Innym czynnikiem skierowującym acetylo-CoA na tory syntezy acetoocetanu jest hamowanie syntetazy cytrynianowej przez pochodne acylowe CoA (56, 77, 80, 82).

Niedawno *Shepherd*, *Yates* i *Garland* (72, 73) zaproponowali inny mechanizm hamowania syntetazy cytrynianowej. Stwierdzili oni, że izolowane mitochondria wątroby szczura syntetyzują acetoocetan podczas utleniania palmitylotransferazy w obecności jabłczanu w warunkach, w których oksydacyjna fosforylacja jest sprzężona. Teoretyczne obliczenia stosunku ilości zużytego tlenu (w $\mu\text{gramoatomach}$) na 1 μmol pod mitylotransferazy w różnych warunkach można przedstawić w następujących reakcjach:

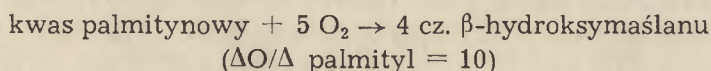
a) utlenianie palmitylokarnityny w obecności malonianu przy zahamowaniu cyklu Krebsa na poziomie dehydrogenazy bursztynianowej



b) w obecności jabłczanu i fluorocytrynianu, który zapobiega dalszemu utlenianiu cytrynianu



c) w obecności wysokich stężeń ATP



Autorzy wykazali doświadczalnie, że w mitochondriach sprzężonych stosunek $\Delta\text{O}/\Delta \text{ palmityl} = 16,17$, co wskazuje, że w tych warunkach zachodzi reakcja a. Dopiero dodanie czynników rozkojarzających (2,4-DNP) zwiększa ten stosunek do 22, co wskazuje że w tym przypadku zachodzi reakcja b. Ponadto Shepherd i Garland (74) wykazali, że częściowo oczyszczona syntetaza cytrynianowa z mitochondriów wątroby jest hamowana przez milimolarne stężenia ATP, a wpływu tego nie można ich zdaniem tłumaczyć usuwaniem szczawiooctanu w warunkach aktywnego metabolizmu komórki. Na podstawie tych danych Garland i wsp. (72, 73) sugerują, że istnieje zależny od ATP mechanizm kontrolujący rozdział puli acetylo-CoA pomiędzy syntezę acetoctanu, a kondensację do cytrynianu.

Uwagi końcowe

Funkcja karnityny jako przenośnika zaktywowanych grup acylowych przez błony mitochondrialne ma szczególne znaczenie w mitochondriach niektórych tkanek zwierzęcych (mięsień sercowy, mięśnie szkieletowe).

Ostatnio Bremer porównuje acylokarnityny i pirogronian jako substraty oddechowe w sarkosomach (12) i mitochondriach wątroby (13). Stosując estry karnitynowe kwasów tłuszczowych oznaczono doświadczalnie kontrolę oddechową i stosunek P : O, który jest miarą oksydacyjnej fosforylacji i otrzymano dla kwasów tłuszczowych wartość P : O bliską wartości teoretycznej to jest około 2,5 (76). Wydaje się, że brak dotychczas danych o wyodrębnieniu intermediatów β -oksydacji (piśmiennictwo patrz poz. 42) przemawiający za hipotezą, że cały łańcuch utlenienia kwasu tłuszczowego odbywa się na jednej cząsteczce enzymu, nie jest sprzeczny z postulowanym udziałem transferaz karnitynowych w transporcie grup acylowych przez błony.

LITERATURA

1. Beenackers A. M. Th., Third Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc., Warsaw 1966, Abstracts str. 147.
2. Beenackers A. M. Th., *Acta Physiol. Neerl.* **12**, 332 (1963).

3. Beenackers A. M. Th., Klingenberg M., *Biophys. Acta*, **84**, 205 (1964).
4. Van den Bergh S. G., *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 442 (1965).
5. Bode C., Klingenberg M., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 93 (1964).
6. Bode C., Klingenberg M., *Biochem. Z.* **341**, 271 (1965).
7. Borst P., Loos J. A., Christ E. J., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **62**, 509 (1962).
8. Bremer J., *J. Biol. Chem.* **237**, 2228 (1962).
9. Bremer J., *Nature* **196**, 993 (1962).
10. Bremer J., *J. Biol. Chem.* **237**, 3628 (1962).
11. Bremer J., *J. Biol. Chem.* **238**, 2774 (1963).
12. Bremer J., *Biochim. Biophys. Acta* **104**, 1581 (1965).
13. Bremer J., *Biochim. Biophys. Acta* **116**, 1 (1966).
14. Bressler R., Katz R. I., *J. Biol. Chem.*, **240**, 622 (1965).
15. Brierley G., Green D. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**, 73 (1965).
16. Bunyan P. J., Greenbaum A. L., *Biochem. J.* **96**, 432 (1965).
17. Carter H. E., Bhattacharyya P. K., Weidman K. R., Fraenkel G., *Arch. Biochem. Biophys.* **33**, 405 (1952).
18. Chappell J. B., 6-th Int. Congr. N. Y. 1964, Abstracts str. 625.
19. Chappell J. B., Crofts A. R., *Biochem. J.* **95**, 707 (1965).
20. Chiga M., Rogers A. E., Plaut G. W., *J. Biol. Chem.* **236**, 1800 (1961).
21. Creasey W. A., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 559 (1962).
22. Cross R. J., Taggart J. V., Covo G., Green D. E., *J. Biol. Chem.* **177**, 655 (1949).
23. Fraenkel G., *Nature* **161**, 981 (1948).
24. Fraenkel G., Blewett M., *Biochem. J.* **41** 469 (1947).
25. Fraenkel G., Friedman S., *Vitamins and Hormones* **15**, 73 (1957).
26. Friedman S., Fraenkel G., *Arch. Biochem. Biophys.* **59**, 491 (1955).
27. Fritz I. B., *Acta Physiol. Scand.* **34**, 367 (1955).
28. Fritz I. B., *Fed. Proc.* **14**, 52 (1955).
29. Fritz I. B., *Am. J. Physiol.* **190**, 449 (1957).
30. Fritz I. B., *The Physiologist* **1**, 25 (1958).
31. Fritz I. B., *Am. J. Physiol.* **197**, 297 (1959).
32. Fritz I. B., *The Physiologist* **5**, 144 (1962).
33. Fritz I. B., w *Advances in Lipid Research*, vol. I, red. R. Paoletti i D. Kritchevsky Academic Press, New York i Londyn (1963), str. 285.
34. Fritz I. B., Mc Ewen B., *Science* **129**, 334 (1959).
35. Fritz I. B., Kaplan E., Yue K. T. N., *Am. J. Physiol.* **202**, 117 (1962).
36. Fritz I. B., Marquis N. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 1226 (1965).
37. Fritz I. B., Schultz S. K., *Fed. Proc.* **22**, 637 (1963).
38. Fritz I. B., Schultz S. K., Srere P. A., *J. Chem.* **238**, 2509 (1963).
39. Fritz I. B., Schultz S. K., *J. Biol. Chem.* **240**, 2188 (1965).
40. Fritz I. B., Yue K. T. N., *J. Lipid Res.* **4**, 279 (1963).
41. Fritz I. B., Yue K. T. N., *Am. J. Physiol.* **206**, 531 (1964).
42. Garland P. B., Shepherd D., Yates D. W., *Biochem. J.* **97**, 587 (1965).
43. Green D. E., Loomis W. F., Auerbach V. H., *J. Biol. Chem.* **172**, 389 (1948).
44. Gulewitsch W., Krimberg R., *Z. Physiol. Chem.* **45**, 320 (1905).
45. Heldt H. W., Schwabach K., Third Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc. Warsaw 1966, Abstracts str. 134.
46. Hunter F. E., Mc Elroy W., Glass B., in *Symp. on Phosphorus Metabolism*, t. I, Johns Hopkins Press, Baltimore 1951, str. 297.
47. Judah J. D., *Biochem. J.* **49**, 271 (1951).

48. Kemp A., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **92**, 178 (1964).
49. Kennedy E. P., Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **190**, 361 (1951).
50. Klingenberg M., Pfaff E., w Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria red. Tager J. M., Papa S., Quagliariello E., i Slater E. C. (*Biochim. Biophys. Acta Library t. 7*) Elsevier, Amsterdam 1966, str. 180.
51. Kornberg A., Pricer W. E. Jr., *J. Biol. Chem.* **204**, 329 (1953).
52. Krebs H. A., *Proc. Roy. Soc. B.* **159**, 545 (1964).
53. Kutscher F., *Z. Untersuch. Nähr. u Genussm* **10**, 528 (1905).
54. Lardy H. A., Johnson D., Mc Murray W. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **78**, 587 (1958).
55. Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **161**, 437 (1945).
56. Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **164**, 291 (1946).
57. Lehninger A. L., *J. Biol. Chem.* **165**, 131 (1946).
58. Lipmann F., Jones M. E., Black S., Flynn R. M., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2384 (1952).
59. Marquis N. R., Fritz I. B., *J. Biol. Chem.* **240**, 2193 (1965).
60. Meyer H., Preiss B., Bauer Sh., *Biochem. J.* **76**, 27 (1960).
61. Muller W. L., Krake J. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **109**, 215 (1962).
62. Norum K. R., *Acta Chem. Scand.* **17**, 896 (1963).
63. Norum K. R., *Acta Chem. Scand.* **17**, 1487 (1963).
64. Norum K. R., *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 95 (1964).
65. Norum K. R., Bremer J., *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 77 (1963).
66. Norum K. R., Bremer J., Third Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc. Warsaw 1966, Abstracts str. 119.
67. Plaut G. W. E., Plaut K. B., *J. Biol. Chem.* **199**, 141 (1952).
68. Presmann B. C., Lardy H. A., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 451 (1956).
69. Rossi C. R., Gibson D. M., *J. Biol. Chem.* **239**, 1694 (1964).
70. Sanadi D. R., Gibson D. M., Ayengar P., Quellet L., *Biochim. Biophys. Acta* **13**, 146 (1954).
71. Scholte H. R., Tager J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **110**, 252 (1965).
72. Shepherd D., Yates D. W., Garland P. B., *Biochem. J.* **97**, 38c (1965).
73. Shepherd D., Garland P. B., Third Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc. Warsaw 1966, Abstracts str. 153.
74. Shepherd D., Garland P. B., *Biochem. J.* (w druku)
75. Shepherd D., Yates D. W., Garland P. B., *Biochem. J.* **98**, 3c (1966).
76. Skrede S., Bremer J., *Acta Chem. Scand.* **19**, 1995 (1965).
77. Srere P. A., *Biochim. Biophys. Acta* **106**, 445 (1965).
78. Strack E., Schwaneberg H., *Z Physiol. Chem.* **245**, 11 (1936).
79. Strack E., Fosterling K., *Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol.* **185**, 612 (1937).
80. Tubbs P. K., *Biochim. Biophys. Acta* **70**, 608 (1963).
81. Wieland O., Weiss L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 333 (1963).
82. Wieland O., Weiss L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **13**, 26 (1963).
83. Wieland O., Weiss L., Eger-Neufeldt I., *Adv. Enz. Reg.* **2**, 35 (1964).
84. Wojtczak L., *Post. Biochem.* **8**, 73 (1962).
85. Wojtczak L., *Post. Biochem.* **10**, 43 (1964).
86. Yates D. W., Shepherd D., Garland P. B., *Nature* **209**, 1213 (1966).
87. Yates D. W., Garland P. B., Third Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc. Warsaw 1966 Abstracts str. 151.
88. Żydowo M., *Post. Biochem.* **8**, 165 (1962).

Federacja Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS) zamierza wydawać nowe czasopismo międzynarodowe, *European Journal of Biochemistry*, które będzie zamieszczać prace oryginalne ze wszystkich dziedzin biochemii i biologii molekularnej. Honorowym Przewodniczącym Komitetu Redakcyjnego jest Profesor H a n s K r e b s (Oxford). Redaktorem jest Profesor C l a u d e L i é b e c q z Uniwersytetu w Leodium (Belgia). Czasopismo Federacji (którego wydawcą będzie Springer-Verlag) zacznie wychodzić w początkach 1967 roku. Jednocześnie przestanie się ukazywać *Biochemische Zeitschrift*.

Journal przyjmuje prace ze wszystkich krajów, zarówno europejskich, jak i pozaeuropejskich. Prace winny być pisane zwięźle i mieć formę ostateczną; pożądanym językiem jest angielski, a prace pisane po francusku lub niemiecku winny być zaopatrzone w obszerne streszczenie angielskie. Maszynopisy (w trzech egzemplarzach, pisane z potrójnym odstępem) należy kierować na adres: Professor C l a u d e L i é b e c q, Editor-in-Chief, *European Journal of Biochemistry*, 1 Rue des Bonnes Villes, Liège, Belgia.

European Journal of Biochemistry będzie wychodzić w trzech tomach rocznie; każdy tom będzie się składał z czterech zeszytów. Prenumerata roczna wynosi 63 dolary (plus 5,75 dol. koszty przesyłki). Członkowie Towarzystw należących do Federacji mogą prenumerować *Journal* po niższej cenie, pod warunkiem, że czasopismo będzie użytkowane wyłącznie prywatnie. Zamówienia na *European Journal of Biochemistry* przyjmuje Springer-Verlag, 1000 Berlin 31, Heidelberger Platz 3.

RYSZARD WIERZBICKI*, JACEK BARTKOWIAK**

Kwas dezoksyrybonukleinowy w mitochondriach

The Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid

The existence and the biological role of mitochondrial DNA are discussed.

W ciągu ostatnich lat ukazało się wiele prac na temat występowania DNA poza chromatyną jądrową. Wyniki żmudnych eksperymentów podważyły powszechnie dotychczas panujący pogląd, że DNA zlokalizowany jest wyłącznie w chromatynie jądrowej i że tylko ten jądrowy DNA jest nośnikiem dziedziczności. Pogląd ów był tak głęboko zakorzeniony i powszechnie przyjęty, że drobne ilości DNA wykrywane w cytoplazmie komórkowej, głównie w plastydach i mitochondriach, przypisywano zanieczyszczeniu jądrowym kwasem dezoksydrybonukleinowym.

W ostatnich latach wykazano ponad wszelką wątpliwość, że DNA występuje w chloroplastach i plastydach roślin związany z nimi strukturalnie i funkcjonalnie (4, 8, 20, 29, 36, 40).

Włączanie znakowanej trytem tymidyny (29, 40) do plastydów roślin oraz usuwanie z nich piętna pod wpływem dezoksyrybonukleazy przemawia nie tylko za obecnością DNA w plastydach, ale sugeruje również, że synteza DNA zachodzi wewnątrz tych organelli. Aktynomycyna D, inhibitor syntezy RNA zależnej od DNA, hamuje również włączanie prekursorów RNA do plastydów (17), co sugeruje, że synteza RNA w tych organellach zależy od matrycy DNA. Pozajądrowy DNA w komórce roślinnej, zdolny do tworzenia informacyjnego kwasu rybonukleinowego (mRNA), może zatem obok jądrowego DNA uczestniczyć w przekazywaniu informacji genetycznej i kierować procesem wytwarzania nowych drobin białkowych, typowych dla plastydów.

Plastydy i mitochondria są organellami komórkowymi mającymi wiele wspólnych cech anatomicznych i funkcjonalnych. Nasuwa się przeto pytanie, czy w mitochondriach także znajduje się DNA, jaka jest jego cha-

* Mgr, st. asyst. Katedry Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego.

** Mgr, asyst. stażysta Katedry Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego.

rakterystyka fizyko-chemiczna oraz jaką spełnia rolę biologiczną. Niniejszy artykuł stanowi próbę przedstawienia aktualnego stanu wiedzy na ten temat.

I. Dowody na występowanie DNA w mitochondriach

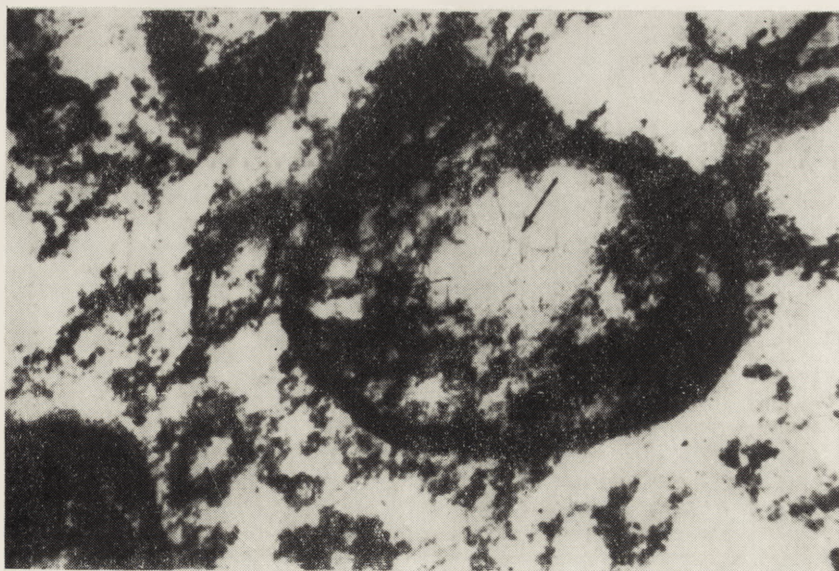
Pierwszych dowodów na występowanie DNA wewnątrz mitochondriów dostarczyły badania cytochemiczne. Wewnątrz mitochondriów obserwowano przy pomocy mikroskopu elektronowego pola o obniżonym pochłanianiu elektronów, w obrębie których dostrzegano niekiedy, w zależności od techniki utrwalania i barwienia, zarysy delikatnych struktur włóknistych o średnicy 15—30Å, lub utworów pałeczkowatych o średnicy około 400Å (15, 28). Do spostrzeżeń tych nie przywiązywano jednak większej wagi, traktując obserwowane struktury jako artefakty, wywołane zmianami pośmiertnymi w komórce lub drastycznymi metodami utrwalania.

Prace M. Nass i S. Nass z roku 1962 i 1963 (24, 25) nad mitochondriami embrionów kurzych, wykluczające możliwość zniekształceń preparatów mikroskopowych pod wpływem techniki utrwalania dowiodły, że jasne pola wewnątrz mitochondriów oraz występujące w nich bardziej kontrastowe twory włókniste są jednostkami strukturalnymi mitochondriów. Twory te obserwowano we wszystkich preparatach mikroskopowych, niezależnie od techniki utrwalania, stężenia utrwalczy i wartości pH środowiska.

Wybarwienie octanem uranylu mikroskopowych preparatów embrionów kurzych (25) pozwalało zaobserwować wewnątrz mitochondriów włókno o średnicy 15—30Å w postaci delikatnej, słabokontrastowanej, pozbawionej ograniczeń membranowych siateczki. Wkrótce potem ukazało się doniesienie Chrispeelsa i wsp. (3), a w 1965 roku Kisleva i wsp. (18) o występowaniu podobnych włókienek w plastydach i mitochondriach roślinnych. Identyczny efekt otrzymano także, gdy utrwalano octanem uranylu preparaty chloroplastów zawierające DNA (36). (rys. 1).

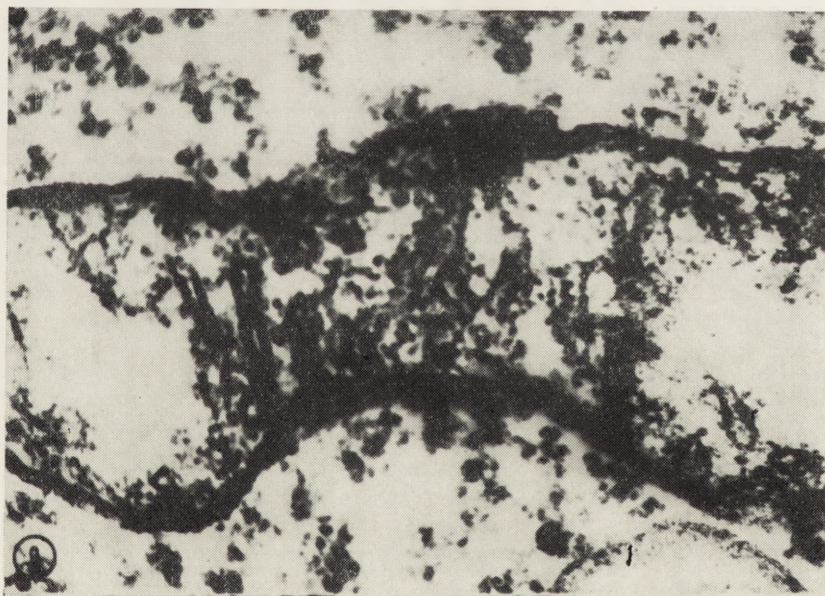
Preparaty mitochondriów utrwalane przy pomocy czterotlenku osmu zawierały natomiast pałeczkowate struktury o średnicy około 400Å, będące zbitym skupiskiem delikatnych włókienek o średnicy 15—30Å (24). Podobne struktury obserwowano wcześniej w utrwalonych w identyczny sposób preparatach bakteryjnej nukleoplazmy (16, 39) i chloroplastach glonów (36), a więc w organellach, o których wiadomo na pewno, że zawierają kwas dezoksyrybonukleinowy.

Potwierdzeniem polinukleotydowego charakteru widocznych wewnątrz mitochondriów włókien były wyniki trawienia nukleazami i enzymami proteolitycznymi (25, 32), świadczące, że włókienka te są specyficznym trawionym DN-azą. Czterogodzinna inkubacja 19-godzinnego embrionu kurzego (25) powodowała całkowity zanik włóknistych struktur we-



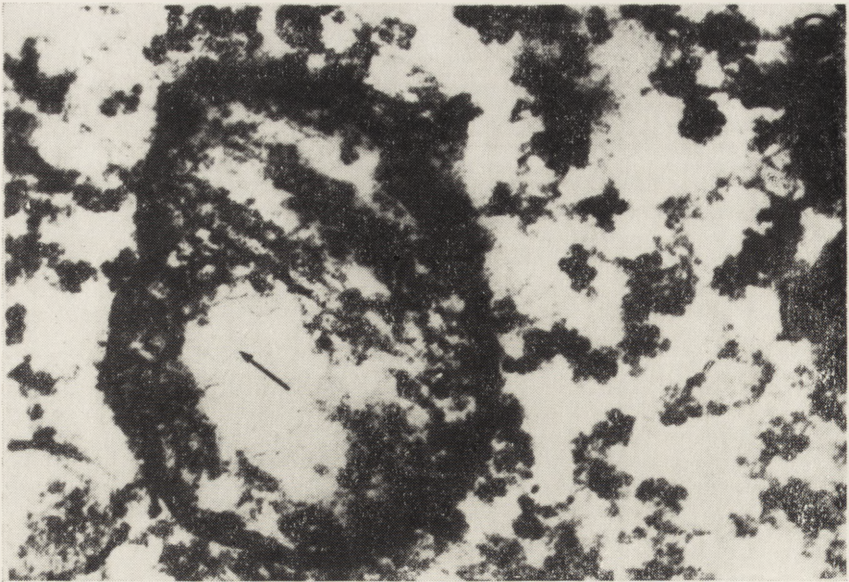
Rys. 1. Włókna kwasu dezoksyrybonukleinowego widoczne w obrębie jasnych pól mitochondriów embrionu kurzego (wg 25)

Preparat utrwalono octanem uranylu. Powiększenie 150 000 razy

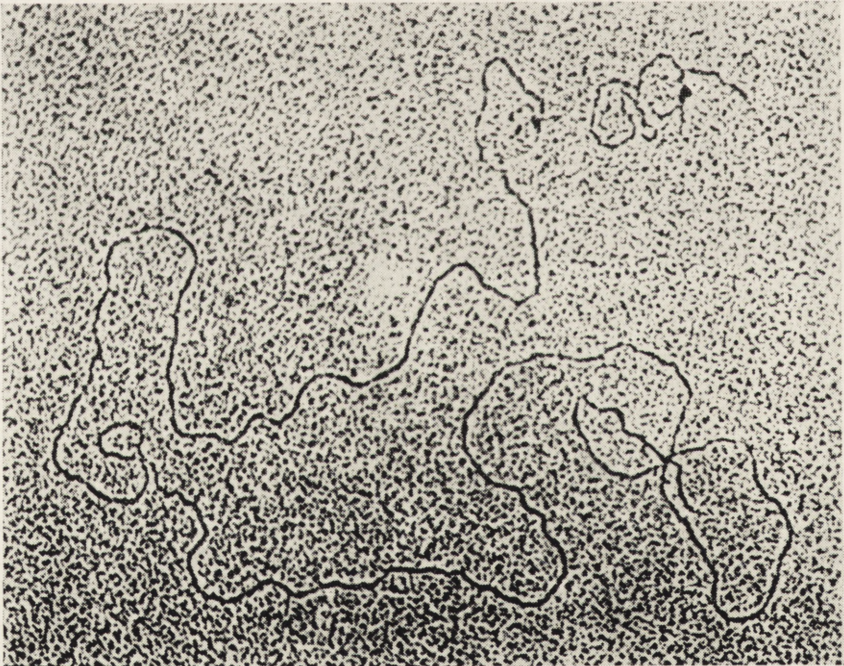


Rys. 2. Mitochondria embrionu kurzego inkubowane z DN-azą w ciągu 4 godz. (wg 25)

Powiększenie 150 000 razy. Objaśnienia w tekście



Rys. 3.. Mitochondria embrionu kurzego inkubowane w ciągu 4 godz. wobec $ZnSO_4$, jako inhibitora DN-azy (wg 25)
Powiększenie 150 000 razy. Objasnienia w tekście



Rys. 4. Obraz mitochondrialnego DNA z *Neurospora crassa* w mikroskopie elektronowym (wg 23)

wnętrz mitochondriów, przy jednoczesnej utracie przez jądro zdolności wybarwiania się w reakcji Feulgena. (rys. 2).

W obecności jonów Zn^{++} , które są inhibitorami DN-azy, włókienka wewnątrz mitochondriów nie znikają nawet po długotrwałej inkubacji (rys. 3).

Włókna mitochondriów były natomiast odporne na działanie RN-azy i pepsyny. Enzymatyczny rozkład struktur włóknistych mitochondriów pod wpływem DN-azy dowodzi ich charakteru polidezoksyrybonukleotydowego. Nasuwa się jednak pytanie, dlaczego preparaty mitochondrialne nie dają dodatniej reakcji Feulgena. Wydaje się, że jest to spowodowane mniejszym niż w jądrze stężeniem materiału polidezoksyrybonukleotydowego na jednostkę powierzchni organelli. Być może wpływa na to również wysoki stopień hydratacji DNA w mitochondriach i wynikający stąd stan jego rozproszenia w tych organellach.

Bardzo poważnych dowodów występowania DNA w mitochondriach dostarczyły badania autoradiograficzne (18, 30, 41, 12, 31). Parsons (30, 31) podaje, że u *Tetrahymena pyriformis* inkubowanej z 3H -tymidyną piętno pojawia się nie tylko w jądrach, ale także i w materiale cytoplazmatycznym (mitochondriach). Przeniesienie znakowanych mikroorganizmów na nieradioaktywną pożywkę, prowadziło do podziału radioaktywności cytoplazmatycznej pomiędzy wszystkie komórki potomne. Zanik radioaktywności w mitochondriach znakowanych komórek pod wpływem trawienia DN-azą pozwala wnioskować, że 3H -tymidyna została włączona do materiału polidezoksyrybonukleotydowego. Podobne badania na tym samym obiekcie przeprowadzili Stone i Miller (41). Zauważyli oni ponadto, że szybkość wbudowywania 3H -tymidyny do mitochondriów zwiększa się w obecności aktynowycyny D lub fluorodezoksyurydyny, co wskazuje, że w mitochondriach zachodzi synteza DNA.

Dalszy etap badań nad kwasami nukleinowymi mitochondriów obejmował próby ilościowej analizy tych związków. Stosując spektrofotometryczne i chemiczno-kolorymetryczne metody analizy materiału mitochondrialnego rozfrakcjonowanego według metody Schmidta-Thannhause-ra określono zawartość DNA w mitochondriach wątroby szczura, serca wołu, drożdży, *Neurospora crassa* i węzłów chłonnych cieląt (19, 23, 26, 38, 43, 45).

Ilości DNA w mitochondriach są niewielkie, stanowią zaledwie od 1—3% całkowitego DNA komórki i wahają się od 0,3—10,0 μ g na jeden mg białka mitochondriów w zależności od ich pochodzenia i stosowanych metod analizy. Zawartość DNA w przeliczeniu na jedno mitochondrium wynosi 1×10^{-16} g (26, 43), jest więc tego samego rzędu co w chloroplastach (8). Stosunek RNA : DNA w mitochondriach nie jest stały i zależnie od ich pochodzenia wynosi od 3,0—15,0.

Dane przytoczone w tablicy 1 są obarczone błędami, wynikającymi głównie z zanieczyszczenia preparatów mitochondriów materiałem jądro-

wym lub adsorbują jądrowego DNA i cytoplazmatycznego RNA na powierzchni mitochondriów. Są to jednak ilości niewielkie. DNA pochodzący z zanieczyszczeń frakcji mitochondrialnej materiałem jądrowym stanowi około 1% oznaczanego w mitochondriach kwasu dezoksyrybonukleinowego (26). Zaadsorbowane na powierzchni organelli kwasy rybo- i dezoksyrybonukleinowe można usunąć przez inkubację zawiesiny mitochondriów z RN-azą i DN-azą (26, 43). (tablica 1).

Tablica 1

Zawartość DNA i RNA w mitochondriach otrzymanych z różnych źródeł

Źródło mitochondriów	DNA w $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka	RNA w $\mu\text{g}/\text{mg}$ białka	Metoda oznaczania	Cytowane wg
Serce wołu	2,4 2,1	7,4 7,2	spektrofotometryczna dwufenyloaminowa orcynolowa	Kroon (19)
Wątroba szczura	2,2	13,7 12,6	spektrofotometryczna orcynolowa	
Wątroba szczura	0,64 0,29 1,83	9,6	dwufenyloaminowa indolowa cysteinowa orcynolowa	Nass i wsp. (26)
Węzły chłonne cieląt	9,72 10,13	29,7 29,86	na podst. fosforu dwufenyloaminowa orcynolowa	Wierzbicki (45)
Drożdże	3,0—10,0	18,0—40,0	dwufenyloaminowa orcynolowa	Tewari i wsp. (43)
Drożdże	1,0—4,6	—	indolowa	Schatz i wsp. (38)
<i>Neurospora crassa</i>	0,7	—	dwufenyloaminowa	Luck i wsp. (23)

DNA mitochondriów różni się pod względem pewnych fizykochemicznych właściwości od DNA jąder. Podczas gdy dla jądrowego DNA różne metody analizy ilościowej dają zgodne wyniki, to w przypadku mitochondrialnego DNA wyniki różnią się znacznie. Reakcja cysteinowa z DNA mitochondriów z wątroby szczura np. daje 6 razy wyższe wartości, niż reakcja indolowa i 3 razy wyższe niż metoda Dischego (26). Pozwala to wnioskować o odmiennej reaktywności mitochondrialnego i jądrowego DNA z tymi samymi związkami, a tym samym wskazuje na zróżnicowanie obydwu rodzajów DNA. O odrębności DNA mitochondriów świadczy również jego duża odporność na działanie DN-azy. Podczas gdy jądrowy

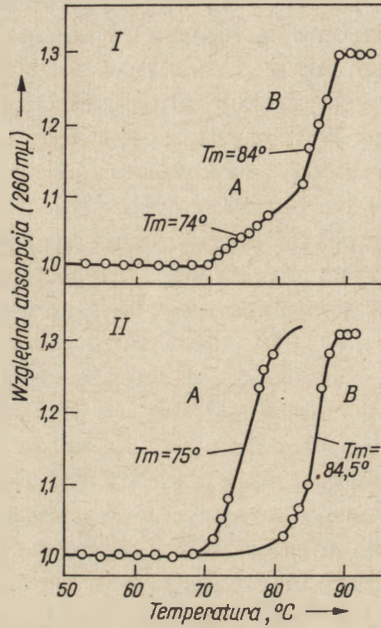
DNA jest prawie całkowicie trawiony DN-azą w ciągu 15 minut, to mitochondrialny DNA z tego samego materiału nawet po ośmiogodzinnej inkubacji z DN-azą rozkładany jest zaledwie w 30% (26). Ponieważ kinetyka trawienia jądrowego DNA przez DN-azę nie zmieniała się w obecności sześzonej zawiesiny mitochondriów, wydaje się, że odporność DNA mitochondriów nie jest spowodowana hamującym wpływem ich białka, a raczej strukturalną odrębnością mitochondrialnego DNA.

Ostatecznym dowodem występowania w mitochondriach DNA powinno być uzyskanie z czystej frakcji mitochondrialnej preparatów kwasu dezoksyrybonukleinowego. W 1964 r. Luck i Reich (23), jako pierwsi, donieśli o otrzymaniu metodą fenolowodetergentową preparatów DNA z uprzednio wyizolowanych i oczyszczonych mitochondriów z *Neurospora crassa*. Charakterystyka spektrofotometryczna tych preparatów była typowa dla kwasu dezoksyrybonukleinowego, ulegały one trawieniu DN-azą i wytwarzały połączenia kompleksowe z aktynomycyną. Porównawcze, analityczne ultrawierowanie DNA jąder i mitochondriów w gradiencie gęstości CsCl wykazało, że różnią się one gęstością (*buoyant density*). Jądrowy DNA posiadał gęstość $\rho = 1,712$, a mitochondrialny 1,701. Przy wirowaniu większych ilości preparatu DNA z mitochondriów stwierdzano występowanie w nim również niewielkich ilości składnika o $\rho = 1,712$, typowego dla DNA jądrowego. Autorzy nie rozstrzygnęli jednak, czy charakterystyczny dla mitochondriów DNA występuje wyłącznie poza jądrem komórkowym oraz jakiego pochodzenia, jądrowego czy mitochondrialnego, jest cięższy składnik występujący w mitochondriach. Dużym osiągnięciem tych autorów było uzyskanie w mikroskopie elektronowym obrazu DNA mitochondriów podobnego do obserwowanych wcześniej obrazów dwułańcuchowych, wysokopolimeryzowanych DNA z innych źródeł (39). W połączeniu z wynikami ultrawierowania w gradiencie gęstości CsCl sugeruje to, że mitochondrialny DNA jest dwułańcuchowym, spiralnie zwinętym polimerem, o dużej masie cząsteczkowej. (rys. 4).

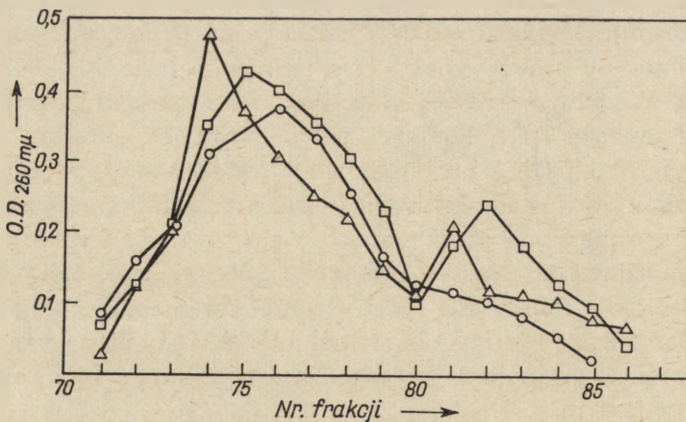
Również Rabinowitz i wsp. donieśli o istnieniu „satelitarnego” DNA w całkowitym DNA komórek serca i wątroby embrionów kurzych (32). W preparatach DNA otrzymanych z mitochondriów ten dodatkowy składnik dominował nad kwasem dezoksyrybonukleinowym typowym dla jąder, nie znaleziono go natomiast w preparatach DNA otrzymanych z jąder komórkowych. Na tej podstawie autorzy wysunęli wniosek, że ten „satelitarny” DNA jest pochodzenia mitochondrialnego. Różnice w gęstości jądrowego i mitochondrialnego DNA, ujawniające się w trakcie ultrawierowania w gradiencie gęstości CsCl, wynikają z różnic w ich składzie nukleotydowym.

Preparaty DNA otrzymane z mitochondriów nie są jednorodne. Niejednorodność mitochondrialnego DNA wykazali Tewari i wsp. (43), uzyskując dwufazowy profil topnienia preparatów DNA wyizolowanych z mitochondriów drożdży ($Tm_1 = 74,0^\circ\text{C}$ i $Tm_2 = 84,0^\circ\text{C}$).

Dwie frakcje otrzymane z tych preparatów za pomocą ultrawierowania w gradiencie gęstości CsCl, wykazują jednofazowe profile topnienia. Składnik lżejszy, który jest charakterystycznym DNA mitochondriów stanowi od 5 do 25% całości preparatu, ma $T_m = 75^\circ\text{C}$, a cięższy składnik typowy dla DNA jąder ulega topnieniu przy $84,5^\circ\text{C}$. (rys. 5 i 6).



Rys. 5. Profile topnienia temperaturowego preparatu całkowitego DNA z mitochondriów drożdży (I) oraz otrzymanych z niego na drodze ultrawierowania w gradiencie gęstości CsCl dwóch frakcji (II), wg Tewari i wsp. (43)



Rys. 6. Frakcje kwasu dezoksyrybonukleinowego z mitochondriów drożdży, uzyskane przy pomocy ultrawierowania w gradiencie gęstości CsCl, z trzech preparatów mitochondrialnego DNA zawierających 5% (○—○—○), 15% (—△—△—) i 25% (—□—□—) tego DNA (wg 43)

O występowaniu dwóch różnych składników DNA w kinetoplastach *Leishmania eurenti*, organellach uważanych za wyspecjalizowane mitochondria, doniósł również de B u y (2). Autor podaje, że typowy dla tych organelli DNA ma niższy ciężar cząsteczkowy, wykazuje mniejszą gęstość w gradiencie gęstości CsCl ($\rho = 1,699$), niż całkowity DNA komórki ($\rho = 1,721$) oraz zawiera tylko 36% guaniny i cytozyny, podczas gdy całkowity DNA zawiera 57%.

Niestety dotychczas nie zanalizowano jeszcze składu nukleotydowego DNA mitochondriów metodami elektroforetycznymi i chromatograficznymi, co pozwoliłoby na dokładniejsze porównanie ich z DNA jądra komórkowego.

II. Rola biologiczna mitochondrialnego DNA

Wykrycie DNA w mitochondriach oraz doniesienia o powstawaniu fenotypowych dziedzicznych zmian w składzie i strukturze mitochondriów pod wpływem działania na cytoplazmę komórkową czynników mutagennych, jak UV, akrydyna, streptomycyna (1, 7, 47), stały się podstawą hipotezy o funkcji biologicznej mitochondrialnego DNA jako półautonomicznej jednostki genetycznej. Za hipotezą tą przemawiają też obserwacje wskazujące, że mitochondria są zdolne do przynajmniej częściowej samoreprodukcji, a ich funkcja jest kontrolowana przez pozajądrowe czynniki genetyczne zawarte w nich samych (9, 33). Ażeby ustalić, że mitochondria są rzeczywiście półautonomicznymi strukturami komórkowymi, wyposażonymi we własny aparat genetyczny, należy wykazać, że:

- a. są one strukturami samopowielającymi się,
- b. zawarty w nich DNA ma zdolność replikacji,
- c. mitochondrialny DNA funkcjonuje jako matryca dla informacyjnego RNA (mRNA),
- d. w mRNA zakodowana jest informacja dla biosyntezy białek mitochondrialnych, powstających w obrębie tych struktur.

Pierwsze zagadnienie było trudne do rozwiązania, ponieważ małe rozmiary mitochondriów, ich plastyczność i brak pigmentacji nastęrczają wiele trudności natury technicznej. Zdołano jednak wykazać, że zarówno mitochondria jak i ich nieodróżnicowane stadium — promitochondria posiadają zdolność podziału, a nie tworzą się *de novo* (6, 21, 22).

Badania autoradiograficzne nad włączaniem znakowanej tymidyny do frakcji mitochondriów (18, 30, 31, 41, 42) wskazują, że DNA nie jest dostarczany do nich w gotowej formie każdorazowo z jądra, ale że w mitochondriach zachodzi jego biosynteza. S c h a t z i wsp. (38) wykazali, że w mitochondriach występują mono- i oligodezoksyrybonukleotydy i sugerują również możliwość przemiany DNA w tych organellach. Dalším uzasadnieniem tego poglądu jest brak w jądrach komórkowych DNA o cechach typowych dla frakcji mitochondrialnego DNA (43).

Dowodów świadczących o genetycznej funkcji mitochondrialnego DNA dostarczają badania nad indukowaniem mutacji i dziedziczeniem powstałych zmian.

Ephrussi (5) uzyskał szczep drożdży, u którego niezdolność do oddychania tlenowego była wynikiem mutacji czynników genetycznych, zlokalizowanych wyłącznie w cytoplazmie. Dalsze pokolenia zmutowanego szczepu dziedziczyły tę patologiczną właściwość. Cecha ta nie dziedziczyłaby się, gdyby jądro dostarczało odpowiedni materiał genowy do nowopowstających mitochondriów. Wypływa stąd wniosek, że ten defekt przekazywany jest na drodze powielania pierwotnie zmienionego cytoplazmatycznego materiału genetycznego.

Gdyby mitochondria posiadały swój własny aparat genetyczny, to funkcja jego powinna by się przejawiać w powielaniu informacyjnego RNA niosącego informację dla syntezy specyficznych białek mitochondriów. Analiza ilościowa kwasów nukleinowych wykazała obecność znacznych ilości RNA we frakcji mitochondrialnej (19, 25, 26, 43), a mikroskop elektronowy pozwolił dostrzec w mitochondriach pewne ulegające trawieniu RN-azą struktury przypominające rybosomy (18, 32). Są też dowody doświadczalne, że w mitochondriach zachodzi synteza kwasu rybonukleinowego zależna od DNA (13, 25, 27, 44, 45). Luck i Reich (25) wykazali, że zawiesina mitochondriów z *Neurospora crassa*, wolna od zanieczyszczeń jądrowych i rybosomów, ma zdolność włączania ^3H -GTP do nowopowstającej frakcji mitochondrialnej, mającej cechy kwasu rybonukleinowego. Włączanie ^3H -GTP było blokowane przez aktynomycynę D, która jak wiadomo hamuje specyficznie syntezę RNA zależną od DNA (10, 34).

Zagadnienie syntezy białka w mitochondriach nie jest jeszcze dostatecznie wyjaśnione. Istnienie takiego procesu sugerują badania nad włączaniem radioaktywnych aminokwasów przez wyizolowaną frakcję mitochondrialną (11, 19, 35). Fragmenty submitochondrialne, otrzymane pod wpływem digitoniny, włączają aminokwasy z podobną szybkością jak mikrosomy z wątroby szczura (35). Proces ten jest hamowany przez aktynomycynę D i chloramfenikol (hamujący łączenie się mRNA z rybosomami). Występowanie w mitochondriach kompleksów DNA—RNA (26) pozwala przypuszczać, że odczytywanie i przekazywanie informacji genetycznej, zakodowanej w DNA mitochondriów, przebiega w tych organelach w sposób podobny, jak w przypadku jądrowego DNA. Ilość DNA przypadająca na jedno mitochondrium ($1 \times 10^{-16}\text{g}$) jest zdolna zakodować informację o syntezie około 150 białek o masie cząsteczkowej 20 000 (26), co świadczyłoby o wielogenowym charakterze materiału genetycznego, zawartego w jednym mitochondrium.

Za odrębnością mitochondrialnego układu genetycznego przemawia też sugerowany przez Gibora i Granicka (9) wpływ tlenu na przekształcanie się promitochondriów w wyspecjalizowane mitochondria zdolne do oddychania tlenowego. Jądro komórkowe niewątpliwie również

wywiera wpływ na czynność mitochondrialnego materiału genowego. Wpływ ten może być bezpośredni, poprzez jądrowe represory lub aktywatory mitochondrialnych układów genetycznych, bądź pośredni, polegający na limitowaniu dopływu do mitochondriów metabolitów niezbędnych do funkcjonowania tych organelli.

Znaczenie biologiczne istnienia pozajądrowego czynnika genetycznego we wszystkich mitochondriach komórki może polegać na zwiększaniu oporności komórki na przypadkowe czynniki mutagenne co zwiększałoby stabilność filogenetyczną organizmów, zwłaszcza, że w grę wchodzi struktury komórkowe dysponujące szczególnie ważnymi dla ustroju procesami energetycznymi.

LITERATURA

1. Avers C. J., Dryfuss C. D., *Nature* **206**, 850 (1965).
2. De Buy H. G., Mattern C. R. T., Riley F. L., *Science* **147**, 754 (1965).
3. Chrispeels M. J., Vatter A. E., Hanson J. B., *J. Plant Physiol.* **38**, Suppl. xv (1963).
4. Chun E. H. L., Vaughan N. H. Jr., Rich A., *J. Mol. Biol.* **7**, 130 (1963).
5. Ephrussi B., *Nucleo-Cytoplasmic Relations in Microorganisms*, Oxford Univer. Press, New York 1953.
6. Fletcher M. J., Sanadi D. R., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 356 (1961).
7. Gibor A., Granick S., *J. Cell. Biol.* **15**, 599 (1962).
8. Gibor A., Izawa M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 1164 (1963).
9. Gibor A., Granick S., *Science* **145**, 890 (1964).
10. Goldberg J. H., Rabinowitz M., *Science* **136**, 315 (1962).
11. Graffi A., Butschak G., Schneider E. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 418 (1965).
12. Guttus E., Guttus S., *Science* **145**, 1057 (1964).
13. Hurowitz J., Bressler A., Diringer R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 15 (1960).
14. Jurand A., *Exptl. Cell. Res.* **25**, 80 (1961).
15. Karrer H. E., *J. Ultrastructure Res.* **4**, 420 (1960).
16. Kellenberger E., Ryter A., Sechand J., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 671 (1958).
17. Kirk J. T. O., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 393 (1964).
18. Kislev N., Swift H., Bogorad L., *J. Cell. Biol.* **25**, 327 (1965).
19. Kroon A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **108**, 275 (1965).
20. Left J., Mandel M., Epstein H. T., Schiff J. A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **13**, 126 (1963).
21. Luck D. J., *J. Cell. Biol.* **16**, 483 (1963).
22. Luck D. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**, 233 (1963).
23. Luck D. J., Reich E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 931 (1964).
24. Nass M. M. K., Nass S., *Exptl. Cell. Res.* **26**, 424 (1962).
25. Nass M. M. K., Nass S., *J. Cell. Biol.* **19**, 593 (1963).
26. Nass S., Nass M. M. K., Hennix U., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 421 (1965).
27. Neubert D., Helge H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 600 (1965).
28. Oberling C., Bernhard W., Brachet J., Mirsky A. E., *The Cell*, Academic Press, New York, 1961, str. 405.

29. Olszewska M. J., Mikulska E., *Experientia* **20**, 267 (1964).
30. Parsons J. A., *J. Cell. Biol.* **23**, 70A (1964).
31. Parsons J. A., *J. Cell. Biol.* **25**, 641 (1965).
32. Rabinowitz M., Sinclair J., De Salle L., Haselkorn R., Swift H. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**, 1126 (1965).
33. Raut C., Simpson W. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **57**, 218 (1955).
34. Reich E., Franklin R. M., Shatkin A. J., Tatum E. L., *Science* **134**, 556 (1961).
35. Rendi R., *Exptl. Cell. Res.* **17**, 585 (1959).
36. Ris H., Plaut W., *J. Cell. Biol.* **13**, 383 (1962).
37. Sager R., Ishida M. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 725 (1963).
38. Schatz G., Haslbrunner E., Tuppy H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 127 (1964).
39. Stoeckenius W., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **11**, 297 (1961).
40. Stocking C. R. Gifford E. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1**, 159 (1959).
41. Stone G. E., Miller O. L. Jr. *J. Cell. Biol.* **23**, 89A (1964).
42. Swift H., Kislev N. Bogorad L., *J. Cell. Biol.* **23**, 91A (1964).
43. Tewari K. K., Jayaraman J., Mahler H. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **21**, 141 (1965).
44. Weiss S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 1020 (1960).
45. Wierzbicki R., Dane niepublikowane.
46. Wintersberger E., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **336**, 285 (1964).
47. Yotsuyanagi J., *J. Ultrastructure Res.* **7**, 141 (1962).

WŁODZIMIERZ MOZOŁOWSKI*

**Wincenty Arnold, biochemik i lekarz
1864—1942**

**Wincenty Arnold, Biochemist and Physician
1864—1942**

WE WSPOMNIENIU LWOWSKICH WSPÓLNIE PRZE-
BYTYCH CZASÓW DEDYKUJĘ TĘ PRACĘ PRZY-
JACIEŁOWI I KOLEDZE PROFESOROWI JÓZEFOWI
HELLEROWI W 70-TĄ ROCZNICĘ JEGO URODZIN

Działalność naukowa Wincentego Arnolda przypada na pierwsze lata XX wieku, w przeważnej części na okres poprzedzający pierwszą wojnę światową.

Biochemia taka, jaką dziś uprawiamy — biochemia przemian ustrojowych i struktur wielkocząsteczkowych — była dopiero w zaczątkach, chociaż wiek XIX dał mocne podstawy chemii organicznej, na których mogła się oprzeć z pełnym zaufaniem i rozbudować się tak, jak to dzisiaj ma miejsce. Zdobytcze biochemii — (w dzisiejszym słowa tego znaczeniu) — przed naszym XX wiekiem — można w skrócie wyznaczyć trzema nazwiskami: Antoniego Lavoisiera, największego chemika wszystkich czasów i narodów, który stworzył podstawy naszej nauki przez ścisłe, ilościowe ujęcie utleniania ustrojowych i związanie ich z przemianą energetyczną ustrojów; Ludwika Pasteura, który ujmuje fermentację alkoholową drożdży, jako „życie w warunkach beztlenowych”; Hansa i Edwarda Buchnerów, którym udaje się oddzielić od uorganizowanej komórki zestaw enzymów przeprowadzających fermentację alkoholową i udostępnić je badaniom. Ale nasze wiadomości biochemiczne w dzisiejszym słowa znaczeniu były bardzo niewielkie; przecież dopiero w 1902 r. Emil Fischer wykazuje istnienie wiązania peptydowego w białkach, a jeszcze w pierwszych latach po drugiej wojnie światowej uważało się kwasy nukleinowe za czteronukleotydy, a więc związki o niewielkiej masie cząsteczkowej. Gdy zdamy sobie z tego sprawę, wyraźniej wystąpi ciężar gatunkowy biochemicznych zdobyczy naukowych Wincentego Arnolda.

* Em. Prof. zwycz. chemii fizjologicznej AM, Gdańsk.

Wincenty Arnold urodził się 5 grudnia 1864 roku w Ołomuńcu na Morawach. Do szkół początkowych i średnich uczęszczał w Krakowie i Lwowie, a studia lekarskie odbywał w Krakowie i Lipsku. (Wydział Lekarski powstał we Lwowie dopiero w 1894 roku). Promocję na doktora wszech nauk lekarskich uzyskał 7 maja 1890 w Krakowie. Następny rok poświęcił studiom filozoficznym, których przedmiotem były (jak to podaje w jedynym dostępnym mi krótkim życiorysie znajdującym się w archiwum Polskiej Akademii Umiejętności): „historia filozofii, Kant, a z nowszych autorów Wilhelm Wundt, Riehl, Artur Schopenhauer, Edward Hartmann”. Następnie odbył roczną służbę wojskową, a w 1892 podjął pracę w Szpitalu Powszechnym we Lwowie; przez dwa lata pracował na oddziale chorób wewnętrznych oraz w szpitalnej pracowni chemicznej. W 1894 obejmuje samodzielne kierownictwo oddziału chorób zakaźnych, z początku jako sekundariusz, a od 1897 roku jako prymariusz. Na tym stanowisku pozostaje do emerytury w roku 1926. Następne lata spędza we Lwowie aż do śmierci w jesieni 1942 r. W 1922 roku został obrany członkiem korespondentem Akademii Nauk Lekarskich w Warszawie, która w 1930 r. została włączona do Polskiej Akademii Umiejętności w Krakowie, jako jej Wydział IV.

Praca na pawilonach zakaźnych nie była ani łatwa, ani mała, ani bezpieczna. Epidemie w okresie pierwszej wojny, zwłaszcza duru osutkowego i brzusznego były szczególnie ciężkie; lekarze oraz personel szpitalny, składający się z siostr zakonnych, w dużej części przechodzili choroby, które w danym okresie panowały; a na pozostałych przy zdrowiu spadała tym większa praca. I Arnold przeszedł ciężki dur osutkowy w latach wojny. Obsada lekarska była bardzo niewielka; wszystkie, w zasadzie, badania pomocnicze były wykonywane na oddziale; Arnold bardzo dbał o chorych powierzonych jego opiece, pracował samotnie, nie miał współpracowników i pomocy technicznej, a jednak w okresie lat 1898—1926 ogłosił drukiem 29 prac; tytuły ich podaje wykaz umieszczony na końcu tego artykułu.

Działalność naukową Wincentego Arnolda można ująć w trzy grupy zagadnień: A. Prace biochemiczne; mają one istotne znaczenie dla rozwoju naszej nauki i dlatego nimi zajmę się przede wszystkim (poz. wyk. 4, 5, 6, 7, 8, 16, 17 i 18); B. Prace analityczno-lekarskie, podające szereg metod i interpretacji, z których i dzisiejszy analityk wiele może skorzystać (poz. wyk. 1, 2, 3, 9, 10, 11, 15, 19, 22, 23, 25, 28 i 29); C. Prace kliniczno-lekarskie, szczególnie cenne w tym dawnym okresie medycyny, gdy lekarz nie miał do dyspozycji ani dzisiejszych metod diagnostycznych ani sulfonamidów i antybiotyków (poz. wyk. 12, 13, 14, 20, 21, 24, 26 i 27).

A. *Prace biochemiczne*; ich tematem są: grupy sulfhydrylowe białek i ich reaktywność, cysteina związków niebiałkowych tkanek oraz hematy-na obojętna czyli katemoglobina.

1) *Grupy sufhydrylowe białek i ich reaktywność* są przedmiotem dwóch prac (poz. wyk. 16 i 17). Opierają się one na prostej reakcji, którą Arnold wykonuje zadając 1 do 2ml roztworu białka kilkoma kroplami 5% roztworu nitroprusydku sodowego, a potem kilkoma kroplami amoniaku; w przypadku dodatniej próby powstaje intensywne purpurowo-czerwone zabarwienie, znikające po dodaniu kwasu octowego; w pierwszej z prac, będącej sprawozdaniem z doniesienia na posiedzeniu Akademii Umiejętności w Krakowie, określa ją Arnold jako nowy odczyn barwny ciał białkowych; w drugiej, wydanej w następnym roku (1911) podaje, że po zakończeniu swojej pracy doświadczał znalazł pracę A. Hefftera z 1908 r. (*Med. Naturwiss. Arch.* 1.81.), w której jest ta reakcja opisana. Arnold badając występowanie tej reakcji wykazuje, że dają ją białka wytrącone przez obojętne sole (siarczan sodowy, siarczan magnezowy), przez alkohol czy kwas fosforowolframowy, natomiast osady białkowe uzyskane przez zastosowanie soli metali ciężkich (chlorek żelaza, sublimat) reakcji tej nie dają; także jod, brom, lub woda utleniona w oddziaływaniu zasadowym uniemożliwiają jej występowanie. Własność dawania tej reakcji przez białka znika prędko w oddziaływaniu zasadowym, ale w oddziaływaniu kwaśnym jest ona stosunkowo trwała; i tak soczewka oka roztrąta w cienkiej warstwie na bibule jeszcze po roku daje reakcję tak samo prawie mocną, jak w świeżym stanie. Nie daje jej właściwa tkanka łączna (ścięgna, powięzi) a w chrząstce jedynie komórki występują jako barwne punkty. W roślinnych tkankach daje się łatwo wykazać ten odczyn w nasionach (soczewicy, ziarnach jabłek czy pomarańcz), a także i grzybach. Nie daje się stwierdzić w zielonych częściach roślin. Keratyny tego odczynu nie dają, ale po zadziałaniu ługiem sodowym lub potasowym występuje ta reakcja bardzo silnie; zbadal to Arnold na keratynie paznokci, włosów, piór ptasich i błonach jaja kurzego. Białko jaja kurzego reakcji tej nie daje, ale jeżeli się je trawi pepsyną z kwasem solnym w 37° to reakcja ta staje się coraz intensywniejszą, osiągając maksimum po upływie godziny. Białko jaja kurzego ścięte przez ogrzewanie i dobrze przepłukane daje wyraźną reakcję z nitroprusydkiem.

Arnold bada jaki składnik białka jest za tę reakcję odpowiedzialny. Nie dają jej następujące aminokwasy: glikokol, alanina, fenyloalanina, tyrozyna, leucyna, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, cystyna, histydyna, tryptofan i tauryna. Jedynie cysteina daje tę reakcję i na tej podstawie formułuje wniosek: grupą reagującą, która daje w białku tę barwną reakcję, jest cysteina, a zmienne natężenie tej reakcji zależy od liczby zdolnych do reakcji grup sulfhydrylowych.

Zapoczątkowanie badań grup sulfhydrylowych białek, a zwłaszcza ich zmienności w zależności od stanu, w którym się białko znajduje, jest zasługą Arnolda, powszechnie uznaną i stale podnoszoną w publikacjach ujmujących przegląd całości tego tak aktualnego dziś zagadnienia. W dziele „*The Proteins*” wydanym przez H. Neurath'a i K. Bailey'a (*Academic*

Press New York 1953, 1954) pisze F. Putnam: (Vol I. Part B. str. 830) „*Since Arnold in 1911 first demonstrated the appearance of nitroprusside — reactive groups during the heat coagulation of egg white, protein chemists have sought to explain the position and function of these and similar latent but demonstrable groups*”; a w innym miejscu (str. 907): „*The sulfhydryl groups of cysteine are the most widely reactive groups of proteins. They have been the most frequently studied protein functional groups because of the early discovery of their liberation during protein denaturation, the requirement of-SH for many enzymes, and their ease of detection and measurement*”. W tym samym dziele (Vol. II. Part. B) pisze K. Bailey (str. 963): „*Arnold was the first to show that the proteins of animal tissues often gave a pronounced nitroprusside reaction which became stronger after heat coagulation; and when Mirsky and Anson again resumed the study of sulfhydryl groups in proteins, the interest centered largely on conditions determining their activity in the native protein and the generation or revelation of new-SH groups on denaturation*”. Nawiasem dodam, że praca Arnolda ukazała się w 1911 roku, a Mirsky i Anson podjęli to zagadnienie w 1935 roku, a więc w ćwierć wieku później.

2) *Cysteina niebiałkowych frakcji narządów zwierzęcych* (poz. wyk. 18). Po zupełnym usunięciu białek przez wysolenie siarczanem sodowym lub amonowym daje się wykazać intensywna reakcja z nitroprusydkiem i amoniakiem taka, jak poprzednio podana dla białek. Arnold bardzo szczegółowo opisuje sposób postępowania, którym się posługiwał; należy używać narządów zwierzęcych możliwie bezpośrednio po zabiciu zwierzęcia, a jeżeli później to po przechowaniu w lodzie; pozostawienie wodnych wyciągów narządów w temperaturze pokojowej prowadzi do zaniku reakcji, ale zagotowanie takich wyciągów utrzymuje reakcję na dłuższy czas. Wyciągi sporządza z miazgi oczyszczonych narządów, zadanej rozcieńczonym kwasem siarkowym do wyraźnej kwaśnej reakcji na lakmus i to w temp. 34°—35° ze względu na to, że w tej temperaturze jest większa rozpuszczalność siarczanu sodu użytego do wysolenia białek. W wodno-jasnym przesączu uzyskanym z wyciśniętej miazgi reakcje na białko wypadają ujemnie. Reakcja z nitroprusydkiem i amoniakiem wypada we wszystkich bezbiałkowych wyciągach badanych narządów silnie dodatnio, otrzymuje się mocną purpurowo-fioletową barwę; najsilniejszą jednak jest reakcja w wyciągach wątroby (wołu, królika) około 3 do 4 razy mocniejsza niż w innych narządach,, a przebadał Arnold następujące narządy: grasieć, mięsień, serce, mózg, jądra, nerki, jelito, soczewkę oka; także z erytrocytów uzyskuje się bezbiałkowe przesącze dające wyraźną reakcję nitroprusydkową, natomiast osocze względnie surowica krwi reakcji tej nie dają. Na bezbiałkowych ekstraktach badanych narządów, oraz równolegle na roztworach cysteiny uzyskanej przez redukcję cystyny, wykonuje Arnold siedem reakcji charakterystycznych dla cysteiny; dołącza do tego dwie nowe, szczególnie czułe, będące modyfikacjami reakcji

nitroprusydkowej. W oparciu o wynik tego porównania wyciąga wnioski, że związkami dającym te reakcje jest cysteina; wyraża to zdaniem (poz. wyk. 18 str. 316): „*Der mit Nitroprussidnatrium reagierende Körper ist seinen Reaktionen nach Cystein*”.

W dziesięć lat później F. G. Hopkins izoluje glutation jako substancję dającą reakcję nitroprusydkową w bezbiałkowych wyciągach tkanek. Związek swoich badań z pracą Arnolda wyraża w streszczeniu swej pracy w następujących słowach (Biochem. J. 15. 304 1921): „*A substance responsible for the nitroprusside reaction which is given by nearly all animal tissues, and was applied by Heffter and by Arnold in proof of the presence of sulphhydryl groups in the cell, has been isolated from yeast from muscle and from mammalian liver*”. W swojej pracy Hopkins często powołuje się na badania Arnolda, zwłaszcza w odniesieniu do występowania reakcji nitroprusydkowej w różnych tkankach; potwierdza także występowanie w erytrocytach związku dającego tę reakcję w odróżnieniu od osocza krwi. J. Heller w pracy przeglądowej o tioneinie moczu (*Polska Gazeta Lekarska* 12, Nr 50 (1933)) omawia te sprawy podnosząc znaczenie reakcji Arnolda w badaniach składników sulfhydrylowych (glutationu i ergotioneiny) erytrocytów krwi człowieka.

3. *Hematyna obojętna Arnolda czyli kathemoglobina van Klaverena* (poz. wyk. 4, 5, 6, 7 i 8). W 1899 (poz. wyk. 4 i 5) podaje Arnold, że w ściśle określonych warunkach (odpowiednie stężenie chlorku sodowego oraz pół objętości alkoholu etylowego) stwierdza się zmianę zabarwienia i widma methemoglobiny na charakterystyczne, nie opisane do tego czasu, widmo „hematyny obojętnej”. Arnold podaje dane zarówno wykonania tej reakcji, jak i ścisły opis i charakterystykę widma tego związku. Opisuje zatem nową, nieznaną dotychczas pochodną barwika krwi. Doniesienie to wywołuje gwałtowną krytykę L. Wachholza, (*Przegląd lekarski* 39, 73 (1900)) który kwestionuje wyniki Arnolda podając, że hematyna obojętna Arnolda jest hemochromogenem. W odpowiedzi (poz. wyk. 6), Arnold przedstawia ponownie cały bieg swoich doświadczeń i obserwacji ze wszystkimi szczegółami oraz z odparciem wszystkich zarzutów udowadniając ponad wszelką wątpliwość, że ma się tu do czynienia z nowym, dotychczas nieznanym związkiem. Wachholz ponownie zabiera głos w tej sprawie w artykule, (*Przegląd Lekarski* 39, 132 (1900)) który nie przynosi nowych argumentów ale nie cofa się przed złośliwościami, z których przytoczę następujące słowa (str. 133) „*Gdyby nawet widmo hematyny obojętnej było zasadniczo różne od widma hemochromogeny, co atoli jak wykazałem wcale nie ma miejsca, to nie mógłbym na tej wyłącznej podstawie opierać stwierdzenia nowego związku, aby nie uleść zarzutowi, jaki czynią Nencki i Sieber*” „*den Pseudochemikern, welche sich bei ihren Arbeiten einzig mit dem Spektralapparate begnügen und daraufhin neue Körper entdecken*”. W ponownej odpowiedzi Arnold (poz. wyk. 7) powtarza raz jeszcze argumenty, które powinny usunąć

wszelkie zastrzeżenia Wachholza. I kończy twierdzeniem „Żywię nadzieję, że po odczytaniu tej polemiki nieuprzedzeni, o ile znajomość spektroskopii krwi nie jest im obcą, znajdą się po mojej stronie”. I tak też było. Zaraz w 1901 roku opisuje Van Klaveren (*Z. physiol. Chemie* **33**, 293 (1901)) ten związek, podając ściśle dane spektroskopowe takie jak Arnold, stwierdzając, że związek ten zawiera białko i stąd zmienia nazwę „hematyny obojętnej” na „kathemoglobinę”. D. Keilin, który w ćwierć wieku później zajmuje się tymi sprawami w swoich badaniach nad cytochromami i innymi związkami hemowymi (*Proc. Roy. Soc.* **100**, 129 (1926)) potwierdza w pełni dane Arnolda, zarówno dotyczące sposobu otrzymywania kathemoglobiny, jak i charakterystyki liczbowej jej widma. O obserwacji Arnolda, że widmo „hematyny obojętnej Arnolda” tj. kathemoglobiny zmienia się po zagotowaniu roztworu, a zjawia się ponownie po jego oziębieniu, pisze (str. 138): „*This interesting observation of Arnold, confirmed by Klaveren and by the writer, shows that with the rise of temperature Kat Hb becomes dissociated into haematin and globin and that these on cooling reunite again*”. Keilin daje temu związkowi nazwę „parahematyna”, podając jej definicję w słowach (str. 139): „*Parahaematin (= Arnolds neutral haematin = kathaemoglobin of van Klaveren) is therefore an oxyhaematin united with a nitrogen compound such as: globin, histidine, pyridine, nicotine and the unknown nitrogen compounds of cytochrome and of oxyhelicorubin.*”

Omówione wyżej trzy serie prac Wincentego Arnolda, a mianowicie: reaktywność grup sulfhydrylowych białek, cysteina niebiałkowych wyciągów tkanek oraz „hematyna obojętna Arnolda” czyli kathemoglobina to powszechnie uznawany trwały dorobek biochemii.

B. Prace analityczno-lekarskie. W tej grupie mieszczą się prace, których, przedmiotem jest: 1) tzw. trawienna reakcja moczu, 2) kwas acetylooctowy moczu, 3) barwniki moczu i 4) inne doniesienia związane z analityką lekarską.

1) *Tzw. trawienna reakcja moczu* (poz. wyk. 10, 11, 23 i 25). W 1906 podał Arnold, że w moczu daje się stwierdzić po spożyciu pewnych pokarmów (zwłaszcza bulionu z mięsa wołowego) szczególna reakcja z nitroprusydkiem sodowym, odmienna od reakcji Weyla na kreatyninę, a także od reakcji na grupy sulfhydrylowe. Jeżeli do 20 ml moczu doda się kroplę 4% roztworu nitroprusydku sodowego lub potasowego, występuje silne, czyste zabarwienie fioletowe, które przechodzi w purpurowo-czerwone, brunatne, a wreszcie w żółte. Reakcja ta występuje po spożyciu pokarmów, zawierających substancje powstające przy działaniu wyższej temperatury (200—250°) na pokarmy; najintensywniejszy jednak odczyn otrzymuje się po spożyciu mocnego bulionu. Produkty, po których spożyciu występuje ta reakcja w moczu, same jej nie dają; reakcja jest odpowiedzią ustroju na pobudzenie gruczołów trawiennych; stąd jej nazwa. W przebiegu chorób gorączkowych, które na ogół wiążą się z hypo-

funkcją gruczołów trawiennych, reakcja ta wypada ujemnie lub bardzo tylko słabo. Istota związku dającego ten odczyn w moczu nie jest znana. O. Hammarsten (*Lehrb. d. Physiolog. Chem.* 1926 str. 550) podaje, że odpowiedzialnym za tę reakcję zdaje się być jakiś związek zawierający siarkę, prawdopodobnie tioamidowy.

2) *Kwas acetylooctowy moczu* (poz. wyk. 3 i 9). W końcu ubiegłego wieku odróżniano jako różne stany acetonurię od diaceturii; pogląd ten opierał się na tym, że reakcję Legala daje zarówno aceton, jak i acetylooctan; natomiast reakcję Gerhardta z chlorkiem żelaza daje acetylooctan, ale nie aceton; mała stosunkowo czułość reakcji Gerhardta była odpowiedzialna za to, że wykazywano jedynie aceton w moczach, w których acetylooctan uległ w pewnym stopniu rozpadowi na aceton i jego stężenie było za małe dla otrzymania mała czułej próby z chlorkiem żelaza. Arnold podaje nową reakcję dla wykrywania kwasu acetylooctowego; roztwór *p*-amidoacetofenonu oraz roztwór azotynu sodowego dodane do roztworu zawierającego acetylooctan powodują po dodaniu kilku kropli stężonego roztworu amoniaku czerwono-brunatne zabarwienie, które po dodaniu stężonego kwasu solnego przechodzi we fioletowe. W oparciu o to, że w przypadku „acetonurii”, w której nie wykazywano próbą Gerhardta acetylooctanu i który to stan uważano dlatego za odmienny od „diaceturii”, daje się acetylooctan wykazać próbą z *p*-amidoacetofenonem przyjmuje Arnold, że rozróżnianie „acetonurii” od „diaceturii” jest nieuzasadnione. L. Marchlewski (Por. do badań fizjol. chem. 1924 str. 233) podaje, że „Arnold po raz pierwszy wskazał na kwas acetylooctowy jako źródło acetonu”.

3. *Barwniki moczu*. Wykrywanie i znaczenie kliniczne barwika żółci w moczu jest tematem pierwszej pracy Arnolda (poz. wyk. 1). Podany przez niego sposób wykrywania nawet bardzo małych ilości bilirubiny zasługuje, moim zdaniem, na uwagę i dzisiejszych analityków klinicznych. Arnold wykonuje go, dodając do badanego moczu połowę objętości nasyconego roztworu barytowego (sporządzonego z $\frac{2}{3}$ części nasyconego na zimno wodorotlenku barowego i $\frac{1}{3}$ części nasyconego chlorku baru); powstały osad zbiera na sączku; sączek wraz z osadem bez przemywania rozkłada na bibule dla usunięcia nadmiaru wilgoci, następnie dzieli go na dwie połowy; jedną z nich kładzie na kawałku bibuły na płytce szklanej i nachylając nad miseczką polewa ostrożnie osad kroplami stężonego kwasu solnego; jeżeli osad miał jasno żółte zabarwienie, pochodzące od bilirubiny, to zmieni je pod wpływem kwasu solnego na brązowe (brunatno-czerwone); ta zmiana barwy następuje w przeciągu kilku sekund i tylko tak długo powinno trwać polewanie kwasem solnym; jeżeli tak przygotowany osad dotknie się pałeczką szklaną zanurzoną w kwasie azotowym (lekko żółtawym) najlepiej na brzegu sączka, gdzie warstwa osadu nie jest zbyt gruba, wystąpią barwne pierścienie Gmelina „wyraźniej i piękniej, niż przy zastosowaniu jakiegokolwiek innego sposobu”.

Dyskusja klinicznego znaczenia próby na barwiki żółciowe moczu może zainteresować i dzisiejszego analityka i klinicystę.

Barwikom uroazeinowym, powstającym z kwasu indolctowego w jelicie, a wydalany w moczu, poświęca Arnold dwie prace (poz. wyk. 15 i 19). Także jeden krótki artykuł (poz. wyk. 2) omawia wykazywanie barwika krwi w moczu.

4. *Inne prace analityczno-lekarskie* dotyczą: znaczenia klinicznego odczynu diazowego (poz. wyk. 29), otrzymywania hematoporfiryny z krwi tlenko-węglowej (poz. wyk. 22) oraz opisu przypadku hematoporfirynurii u chorego na dur brzuszny (poz. wyk. 21). O tym, że niełatwe były warunki pracy laboratoryjnej w okresie bezpośrednio po wojnie świadczy artykuł ogłoszony w 1922 „O możliwości zastąpienia olejku cedrowego olejkami santalowym do celów mikroskopowych (poz. wyk. 28).

Omówione prace analityczno-lekarskie mają dziś głównie znaczenie historyczne; ich omówienie, jest jednak ważne dla pełniejszego przedstawienia działalności lekarskiej Wincentego Arnolda.

C. *Prace kliniczno-lekarskie*. Jest rzeczą zrozumiałą, że ponad pół wieku, które nas dzieli od działalności lekarskiej Arnolda, zmieniło w zupełności problematykę kliniczno-lekarską. Sprawa leczenia nagminnego zapalenia opon (poz. wyk. 13, 14 i 27) opiera się dziś na zupełnie innych zasadach, aniżeli w tamtych czasach. Doświadczalne wykazanie przez Arnolda, że doniesienia o korzystnym działaniu dożylnych iniekcji kolargolu w przebiegu chorób zakaźnych nie mają podstaw, a sam zabieg nie jest dla pacjenta obojętnym, (poz. wyk. 12) miało znaczenie w tym dawnym okresie, gdy w walce z chorobami zakaźnymi brak było tak skutecznej broni, jaką dziś lekarz dysponuje i próbowano często środków bardzo ryzykownych. Na bliższe omówienie zasługują jednak prace (poz. wyk. 20, 24 i 26) wykazujące, że *neuritis optica*, występująca stosunkowo często w przebiegu zapalenia opon, a w innych ostrych chorobach zakaźnych jedynie bardzo rzadko, występuje także w przebiegu duru osutkowego tak prawie często jak w zapaleniu opon mózgowych. Arnold ogłosił to w 1911 roku w oparciu o stwierdzenie tego w 14 przypadkach duru osutkowego, ale w artykule w 1918 roku pisze: „*Epidemie lat wojennych umożliwiły mi uzupełnienie tych badań*”. Dno oka zbadał u 244 chorych; zapalenie nerwów wzrokowych znalazł 144 razy tj. w 59% chorych. Pierwsze zmiany na tarczy wzrokowej występowały nie wcześniej jak ósmego lub dziewiątego dnia choroby; prognozę wyleczenia zapalenia nerwów wzrokowych w durze osutkowym uważa za dobrą. Ponieważ w durze brzuszny *neuritis optica* nie występuje, miało stwierdzenie Arnolda istotne znaczenie epidemiologiczne. Nie należy zapominać, że wszystkie badania dodatkowe, także dna oka, wykonywał Arnold sam.

W oparciu o przedstawiony dorobek naukowy Wincentego Arnolda należy stwierdzić, że był to wybitny badacz, który w bardzo trudnych

warunkach otrzymał wyniki, których znaczenie występuje dziś jeszcze wyraźniej niż w chwili ich ogłoszenia.

Toteż w setną rocznicę urodzin tego uczonego należało ogłosić drukiem zestawienie jego naukowej działalności. Nie było to rzeczą łatwą; że udało się to, (choć z opóźnieniem i w takiej tylko postaci, jaką jest obecna praca), należy zawdzięczać wielu osobom. Wśród nich wymienię przede wszystkim: śp. dra Emiliana Ostachowskiego, który mi udostępnił kopię listu Wincentego Arnolda do Sekretariatu Akademii Nauk Lekarskich w Warszawie z wykazem prac oraz z bardzo krótkim życiorysem; oraz ks. dr. Mariana Staraka, misjonarza z Krakowa, któremu zawdzięczam list siostry Żmudzińskiej Zakonu Sercanek, która pracowała w Pawilonach Zakaźnych we Lwowie przez szereg lat. Słowa Jej listu są dla mnie jedyną wskazówką, pozwalającą podać jako przypuszczalną datę śmierci Wincentego Arnolda jesień 1942; pisze Ona w swym liście: „*Dokładnej daty śmierci nie wiemy, mimo że były siostry na śp swego Szefa dra Arnolda pogrzebie. Siostra Świętosława pisze mi na mój list, że zdaje się było to jesienią 1942 roku; tak mówi parę siostr, tego czasu tam we Lwowie będących na Pawilonach Zakaźnych. Pochowany na Cmentarzu Łyczakowskim*”.

WYKAZ OGŁOSZONYCH DRUKIEM PRAC WINCENTEGO ARNOLDA

(W publikacjach niemieckich imię Autora jest podane „Vinzenz”; dlatego skrót, spotykany w niepolskim piśmiennictwie, jest „V. Arnold”).

1. O sposobach i klinicznej doniosłości wykrycia barwika żółci w moczu. *Przegląd Lekarski*. **37**. 1898. str. 441—443; 452—454; 466—467.
2. Über die Heller'sche Probe zum Nachweis des Blutfarbstoffes im Harn. *Berliner Klinische Wochenschrift* **35**. 1898. str. 283—285.
3. Eine neue Reaction zum Nachweis der Acetessigsäure im Harn. *Wiener Klinische Wochenschrift* **12**. 1899. str. 541—544.
4. Ueber das neutrale Hämatinspektrum. *Centralblatt für medizinische Wissenschaften* **36**. 1899. str. 833—836; 849—851.
5. O widmie hematyny obojętnej. *Przegląd Lekarski*. **38**. 1899 str. 705—706.
6. Dalsze uwagi o hematynie obojętnej. *Przegląd Lekarski*. **39**. 1900. str. 114—117; 129—132.
7. Jeszcze o hematynie obojętnej. *Przegląd Lekarski*. **39**. 1900. str. 164—165.
8. Ein Beitrag zur Spectroskopie des Blutes. *Zeitschrift für physiologische Chemie* **29**. 1900. str. 78—85.
9. Über Nachweis und Vorkommen der Acetessigsäure in pathologischem Harn. *Centralblatt für innere Medicin*. **21**. 1900. str. 417—423.
10. Eine neue Harnreaktion mit Nitroprussidnatrium. *Bulletin de l'Academie des Sciences de Cracovie*. Juin 1906. str. 405—407.
11. Eine neue Nitroprussidreaktion des Harnes. *Zeitschrift für physiologische Chemie* **49**. 1906. str. 397—405.
12. Über die Wirkung intravenöser Collargolinjektionen bei einigen Infektionskrankheiten. *Centralblatt für innere Medicin*. **29**, 1907. str. 1065—1079.

13. Über die Behandlung der übertragbaren Genickstarre mit Meningokokkenheils-
serum. *Centralblatt für innere Medicin* **30**. 1908. str. 409—416.
14. Über die Therapie der übertragbaren Genickstarre. *Centralblatt für innere
Medicin*. **30**. 1908. str. 457—467.
15. Über das Vorkommen eines dem Urorosein nahestehenden Farbstoffes in ge-
wissen pathologischen Harnen. *Zeitschrift für physiologische Chemie*. **61**. 1909.
str. 240—243.
16. Nowy odczyn barwny ciał białkowych. *Rozprawy Wydziału mat-przyr. Akademii
Umiejętności w Krakowie* **50**. Ser. A. 1910.
17. Eine Farbenreaktion von Eiweisskörpern mit Nitroprussidnatrium. *Zeitschrift
für physiologische Chemie* **70**. 1911. str. 300—309.
18. Über den Cysteingehalt der tierischen Organe. *Zeitschrift für physiologische
Chemie* **70**. 1911. str. 314—325.
19. Die Uroroseinfarbstoffe des Harnes. *Zeitschrift für physiologische Chemie* **71**.
1911. str. 1—6.
20. Über Neuritis optica bei Fleckfieber. *Wiener Klinische Wochenschrift*. **24**. 1911.
21. Ein Fall von Hämatorporphyrinurie bei Abdominaltyphus. *Zeitschrift für phy-
siologische Chemie*. **82**. 1912. str. 172—174.
22. Über Darstellung von Hämatorporphyrin aus Kohlenoxydblut. *Zeitschrift für
physiologische Chemie*. **82**. 1912. str. 274—275.
23. Weitere Beobachtungen über die Arnoldsche Harnreaktion mit Nitroprussid-
natrium. *Zeitschrift für physiologische Chemie*. **83**. 1913. str. 304—314.
24. O zapaleniu nerwów wzrokowych w przebiegu duru osutkowego. *Przegląd Le-
karski* **57**. 1918. str. 169—170.
25. Die Verdauungsreaktion des Harnes und ihre Bedeutung. *Wiener Klinische
Wochenschrift*. **31**. 1918. Nr. 13.
26. Über Neuritis optica als Spätsymptom bei Fleckfieber. *Wiener Klinische Wo-
chenschrift*. **32**. 1919. str. 893—895.
27. O leczeniu napotnem nagminnego zapalenia opon. *Polskie Czasopismo Le-
karskie*. **1**. 1921. str. 1—5.
28. O możliwości zastąpienia olejku cedrowego olejkiem santalowym do celów
mikroskopowych. *Polska Gazeta Lekarska*. **1**. 1922. str. 828.
29. O znaczeniu klinicznym odczynu diazowego. *Polska Gazeta Lekarska*. **5**. 1926.
str. 165.

AUTOREFERATY PRAC HABILITACYJNYCH I DOKTORSKICH

STANISŁAW LEWAK

Leukoantocyjany głogu

Pracę wykonano w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego
Recenzenci: prof. dr I. CHMIELEWSKA, prof. dr Z. JERZMANOWSKA,
prof. dr I. REIFER

Uchwała Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Warszawskiego,
nadająca stopień naukowy *docenta w zakresie biochemii* z dn. 21. IV. 1966.

Niedostateczna znajomość budowy leukoantocyjanów w znacznym stopniu utrudnia badanie roli biologicznej tych związków. Do badań wybrano leukoantocyjany liści i owoców głogu (*Crataegus oxyacantha*) ze względu na stosunkowo znaczną ich ilość w tym materiale oraz ze względu na występowanie układów dimerycznych, których wyjaśnienie struktury rzutuje na sposób powiązania między sobą jednostek flawanowych w cząsteczkach polimerycznych leukoantocyjanów.

Stwierdzono na drodze chromatograficznej, że zarówno w liściach jak i w owocach badanej rośliny znajduje się frakcja niskocząsteczkowych (dimerycznych) leukoantocyjanów i frakcja polimerów flawanowych. Wykorzystując rozdział na chromatogramach cienkowarstwowych i zmodyfikowaną metodę Swaina i Hillisa przebadano zmiany zawartości obu frakcji leukoantocyjanów w liściach głogu podczas okresu wegetacyjnego. Zawartość frakcji dimerycznych leukoantocyjanów, bardzo niska w młodych liściach, wzrasta w okresie wegetacji ponad pięciokrotnie. Poziom związków polimerycznych przewyższa w młodych liściach ponad trzykrotnie zawartość niskocząsteczkowych leukoantocyjanów. Podczas rozwoju liścia wzrasta on powoli osiągając w okresie dojrzwania owoców wartość dwukrotnie większą niż w młodych liściach. W następnym okresie następuje spadek poziomu obu frakcji, powolniejszy w przypadku związków niskocząsteczkowych. Dane te pozwalają na stwierdzenie możliwości polimeryzacji leukoantocyjanów w liściach, a nie tylko w drewniejących częściach rośliny.

Następnym etapem badań nad leukoantocyjanami głogu były badania struktury niskocząsteczkowych związków wydzielonych z głogu. Opracowano oryginalną metodę preparatyki tych związków, której istotnym elementem było oczyszczanie frakcji zawierającej leukoantocyjany na kationicie *Amberlite IRC 50*.

Otrzymany w ten sposób główny leukoantocyjan liści głogu okazał się związkiem wyjątkowo nietrwałym, toteż większość badań budowy przeprowadzono stosując pochodne metylowe lub acylowe o większej trwałości. Analiza produktów przekształcenia badanej substancji w antocyjanidynę, dane analizy elementarnej pochodnych, oznaczenia masy cząsteczkowej i badanie reaktywności pochodnych z kwasami oraz z nadjodanem pozwoliły na zaproponowanie dla głównego leukoantocyjanu liści głogu struktury dimerycznej leukocyjanidyny zbudowanej z dwóch jednostek 3',4',5,7-tetrahydroksy-flawan-diolu-3,4 połączonych wiązaniem eterowym przy udziale drugorzędowych grup alkoholowych pierścieni heterocyklicznych.

Zarówno własności jak i dane analityczne, a co za tym idzie i proponowana budowa różnią dimeryczną leukocyjanidynę wyodrębnioną z liści głogu od związku wydzielonego z owoców tej rośliny przez Freudenberga i Weingesa (*Tetrahedron Letters* str. 267, (1961)). W celu bezpośredniego porównania obu połączeń wyodrębniono z owoców głogu frakcją zawierającą niskocząsteczkowe leukoantocyjany. Stwierdzono w niej na drodze chromatograficznej obecność trzech związków oznaczonych L_1 , L_2 i L_3 .

Leukoantocyjan L_1 , występujący w największej ilości, wydzielono chromatograficznie. Stwierdzono jego identyczność z substancją opisaną przez Freudenberga i Weingesa, natomiast jego własności fizyczne i chemiczne wyraźnie różnią się od własności dimerycznej leukocyjanidyny liści głogu. Na uwagę zasługuje znaczna trwałość leukocyjanidyny L_1 w porównaniu z leukocyjanidyną liści.

Analiza widm w podczerwieni pochodnych związku L_1 oraz badanie ich reakcji z kwasem nadjodowym pozwoliły ustosunkować się do struktur proponowanych dla tego połączenia przez Freudenberga i Weingesa. Wyniki te wskazują, że dimerycznej leukocyjanidynie owoców głogu (L_1) z większym prawdopodobieństwem można przypisać budowę 3',4',5,7-tetrahydroksy-flawan-3-on-4-olu połączonego wiązaniem semiketalowym z resztą (-)epikatechiny.

Porównano chromatograficznie produkty acetylowania mieszanin niskocząsteczkowych leukoantocyjanów wyodrębnionych z liści i owoców badanej rośliny. Stwierdzono, że główna dimeryczna leukocyjanidyna owoców głogu L_1 występuje również w liściach tej rośliny, lecz w mniejszych ilościach. Związek L_2 , znajdujący się w niewielkich ilościach w owocach odpowiada ruchliwością chromatograficzną głównej leukocyjanidynie liści głogu. Dotychczas niezbadany trzeci leukoantocyjan L_3 zawiera w swej strukturze element leukopelargonidyny i występuje zarówno w owocach jak i w liściach głogu w najmniejszej ilości.

Dotychczasowe badania wskazują na możliwość występowania dwóch rodzajów dimerycznych leukoantocyjanów. Główna leukocyjanidyna owoców głogu reprezentuje obok innych znanych dimerów grupę złożonych leukoantocyjanów, w cząsteczce których jednostka leukoantocyjanu związana jest z resztą flawan-3-olu. Główna leukocyjanidyna owoców głogu jest jedynym dotychczas znanym przedstawicielem dimerycznych leukoantocyjanów zbudowanych wyłącznie z jednostek flawan-3,4.

Fragmenty pracy ukazały się w *Rocznikach Chemii* 38, 1773 (1964), 39, 1839 (1965) oraz w *Bull. Acad. Polon. Sci. cl. II* 13, 121 (1965).

Badanie wpływu witaminy K i jej strukturalnych analogów na aktywność enzymatyczną katalazy

JAN PŁOTKOWIAK

Pracę wykonano w Zakładzie Biochemii i Zakładzie Chemii Fizycznej Akademii Medycznej w Poznaniu

Promotor: Doc. dr med. JÓZEF CHMIEL

Uchwała Rady Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Poznaniu nadająca stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych z dnia 1 kwietnia 1966 r.

Celem pracy było określenie wpływu związków z grupy *p*-chinonów: hydrochinonu, *p*-chinonu, antrachinonu oraz witaminy K_3 (2-metylo-1,4-naftochinon) i jej farmakologicznych antagonistów na aktywność enzymatyczną katalazy. Badania miały wykazać jaki jest charakter wzajemnego oddziaływania katalazy i związków

chinonowych *in vitro*, jaką rolę w tych procesach spełnia potencjał oksydacyjno — redukcyjny poszczególnych partnerów reakcji i czy obecne w środowisku związki chinonowe wpływają w sposób uchwytny na tworzenie się połączenia kompleksowego katalazy z nadtlenkiem wodoru.

Do doświadczeń zastosowano katalazę f-my *Boeinger i Boehne* w postaci zawiesiny oraz zawierający katalazę wyciąg drożdżowy w buforze fosforanowym. Aktywność enzymatyczną oznaczano manganometrycznie, a powstawanie kompleksu enzym-substrat badano polarograficznie.

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że hydrochinon, *p*-chinon i witamina K_3 w stężeniach od $10^{-4}M$ do $10^{-6}M$ hamują enzymatyczny rozkład nadtlenu wodoru, przy czym najsilniej działa hydrochinon, najslabiej zaś witamina K_3 . Kumaryna, antrachinon i dwukumarol w tych stężeniach nie wpływają na przebieg reakcji.

Liniowy charakter zależności $\Delta k'_0$ (różnica między stałymi początkowej szybkości reakcji w próbie kontrolnej i próbie właściwej) od stężenia badanych substancji umożliwił porównanie stopnia oddziaływania poszczególnych chinonów na enzymatyczny rozkład nadtlenu wodoru. Wartości k'_0 dla stężenia $10^{-4}M$ kształtowały się następująco: hydrochinon 0,0200, *p*-chinon 0,0100, witamina K_3 0,0060, kumaryna 0,0000, antrachinon-0,0010, dwukumarol (roztwór nasycony) 0,0070.

Stwierdzono zależność między potencjałem oksydacyjno — redukcyjnym poszczególnych *p*-chinonów, a stopniem hamującego oddziaływania na szybkość enzymatycznego rozkładu H_2O_2 . Obie wartości maleją ze wzrostem masy cząsteczkowej badanych związków: dla *p*-chinonu $E_0 = 0,699V$, natomiast $\Delta k'_0 = 0,0100$; dla 2-metylo-1,4-naftochinonu $E_0 = 0,396V$, a $\Delta k'_0 = 0,0060$; dla antrachinonu $E_0 = 0,154V$, a $\Delta k'_0 = -0,0010$.

Do badań polarograficznych zastosowano handlowy preparat katalazy ponieważ w polarogramach ekstraktu drożdżowego wskutek obecności substancji interferujących występował zanik zarówno fali tlenu jak i nadtlenu wodoru. Wykazano zmiany w widmie polarograficznym katalazy w obecności *p*-chinonu, hydrochinonu, 2-metylo-1,4-naftochinonu, dwukumarolu i kumaryny. Uzyskane wyniki nie pozwalają jednak wnioskować o charakterze tworzących się przejściowo połączeń.

SPRAWOZDANIA

III Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych

Warszawa, 4—7 kwietnia 1966 r.

Sesja otwarcia. III zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych otworzył Przewodniczący Federacji, Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i główny organizator Zjazdu — prof. dr Kazimierz Zakrzewski. Przy stole prezydialnym zasiedli: prof. dr S. Ochoa, Prezes Międzynarodowej Unii Biochemicznej, prof. dr J. Groszkowski, Prezes Polskiej Akademii Nauk, prof. dr J. Heller, Przewodniczący Komitetu Biochemicznego i Dyrektor Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, oraz prof. dr W. Niemierko, Dyrektor Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego.

Witając przedstawicieli Władz Państwowych i Nauki, Członków Rady Federacji, innych honorowych gości i uczestników Zjazdu prof. Zakrzewski wyraził radość organizatorów z powodu przybycia na Zjazd wielu wybitnych uczonych, co pozwoli licznemu gronu polskich biochemików przedyskutować wspólne problemy z kolegami z zagranicznych ośrodków badawczych. Następnie odczytany został powitalny list protektora Zjazdu, Przewodniczącego Komitetu Nauki i Techniki Wicepremiera Eugeniusza Szyra. W liście swym E. Szyr podkreślił doniosłą rolę biochemii w rozwoju współczesnej nauki, zwracając szczególną uwagę na liczne praktyczne zastosowania badań biochemicznych. W imieniu Polskiej Akademii Nauk prof. J. Groszkowski mówił o pozycji biochemii wśród innych nauk ścisłych oraz o roli poznawczej badań biochemicznych. W imieniu Międzynarodowej Unii Biochemicznej powitał Zjazd dr S. Ochoa.

Po przemówieniach powitalnych i krótkiej przerwie wykład inauguracyjny wygłosił P. Grabar, Dyrektor Instytutu Badań nad Rakiem (Villejuif).

Odczyt swój P. Grabar rozpoczął od szczegółowego omówienia techniki immunoforetycznego rozdziału białek i praktycznego zastosowania jej w badaniach klinicznych i eksperymentalnych. Jako ilustracje pokazał Grabar wiele interesujących diapozytywów przedstawiających immunoelektroforegramy surowic osób zdrowych lub też z różnymi zmianami patologicznymi. Wspomniał również o badaniach innych płynów ustrojowych oraz omówił zastosowanie immunoelektroforezy do badań nad nowotworami doświadczalnymi u zwierząt. W tej dziedzinie na uwagę zasługuje spostrzeżenie, że w materiale pochodzącym ze zwierząt z pewnymi zmianami nowotworowymi — można wyróżnić frakcje białkowe — nie spotykane w prawidłowych tkankach zwierząt dorosłych — a przypominające własnościami fizycznymi pewne białka z tkanek zarodkowych.

Symposium: Własności i funkcja elementów genetycznych. Rozpoczynając relację z obrad Symposium dobrze będzie krótko wspomnieć o najważniejszych osiągnięciach chemii i biochemii kwasów nukleinowych, które dały podstawy pod rozwój dzisiejszej biologii molekularnej.

Przed wszystkim zatem należy wymienić prace Browna i Todda (1952), którzy w oparciu o badania trzech pokoleń chemików i własne doświadczenia zdo-

łali zdefiniować charakter powiązania nukleotydów w kwasach nukleinowych; model makromolekularnej budowy DNA skonstruowany przez Cricka i Watsona (1953), przeprowadzoną przez Kornberga (1956) *in vitro* replikację DNA, równoznaczną z wykryciem polimerazy DNA, jak również odkrycie przez S. Ochoa i wsp. fosforylasy nukleotydowej (1956) oraz odkrycia polimeraz RNA zależnych od DNA (1960) — stanowiły dalsze etapy na drodze do poznania własności i funkcji elementów genetycznych. Szczególnie płodne okazały się badania nad wbudowywaniem aminokwasów do peptydów w układach bezkomórkowych (Zamecnik i Hoagland; Berg; Lipmann; Nirenberg i Matthaei, 1961). Zastosowanie kwasu poliurydylowego w doświadczeniu kontrolnym podczas badania wpływu wirusowego RNA na syntezę peptydów w układach bezkomórkowych z *E. coli* doprowadziło niespodziewanie do identyfikacji nukleotydu trójryborydylowego jako trypletu kodującego fenyloalaninę (Matthaei i Nirenberg, 1961). Wyniki tego doświadczenia wywołały prawdziwą eksplozję badań. Badania S. Ochoa i wsp. oraz M. Nirenberga i wsp., którzy stosowali mieszane polirybonukleotydy dały możliwość określenia składu wielu innych trypletów (kodonów), nie dały jednak jeszcze sposobów pewnego zdefiniowania sekwencji nukleotydów w kodonach. Następnym wielkim krokiem naprzód było wykazanie przez P. Ledera i M. Nirenberga (1964), że zasocjowane z rybosomami trójnukleotydy mogą specyficznie wiązać odpowiednie aminoacylo-tRNA. Umożliwiło to z kolei badania różnych trójnukleotydów jako kodonów. Niezwykle żmudne i precyzyjne metody mieszanej chemicznej i enzymatycznej syntezy trój- oraz polinukleotydów w Laboratorium H. G. Khorany oraz zastosowanie tych związków do badań nad kodem genetycznym wzmogło ogromnie zaufanie do prawidłowości rozszyfrowania poszczególnych kodonów. Przedstawione podczas Sympozjum najnowsze wyniki umożliwiły, jak zobaczymy, całkowite niemal rozszyfrowanie kodu genetycznego, co — według słów F. Sangera — jest najbardziej podniecającym i najwięcej obiecującym osiągnięciem biochemii lat ostatnich.

O badaniach struktury kwasów nukleinowych przy użyciu techniki dyfrakcji promieniowania X mówili V. Luzzati (współautorzy J. Witz i A. Mathis — Gif-sur-Yvette i Strasbourg) oraz W. Fuller (Londyn). Przedstawili oni między innymi dane na temat wpływu temperatury i *pH* roztworów oraz stopnia uwodnienia środowiska na konformację cząsteczek kwasów nukleinowych. Fuller ponadto zwrócił uwagę na dane eksperymentalne świadczące o oddziaływaniu cząsteczek niektórych antybiotyków, substancji rakotwórczych i toksycznych na cząsteczki DNA. Przedyskutował on możliwy wpływ tych antymetabolitów w zależności od ich struktury i własności oraz od struktury i własności kwasów nukleinowych, szczególnie uwzględniając prawdopodobne mechanizmy oddziaływania cząsteczek kwasów nukleinowych z pochodnymi akrydyny, jak również własności kompleksów DNA i antybiotyku duanomycyny.

Wpływ poliamin na strukturę polinukleotydów omówił w swym doniesieniu W Szer (Warszawa). Występujące powszechnie w komórkach poliaminy mogą, zdaniem autora, grać istotną rolę w procesach replikacji i syntezy kwasów nukleinowych oraz białek.

Treść wykładu F. J. Bollum'a (Lexington) o enzymatycznej replikacji poli-dezoksyrybonukleotydów stanowiły: zjawisko autokatalizy DNA oraz własności i aktywność polimeraz DNA. Wykazano, że jedynie polimeraza z niezakażonych bakterii rozpoczyna i przeprowadza replikację DNA na matrycy natywnej formy dwuniciowej (Kornberg 1961), natomiast polimerazy z bakterii zakażonych fagiem (Bollum, 1957) lub z grasicy cielęcej (Bollum, 1963) nie mają tej zdolności. Przeszkodą do rozpoczęcia procesu replikacji przez „defektywne”, polimerazy jest drugorzędowa struktura łańcucha polinukleotydowego w natywnym DNA i wiąza-

nia wodorowe łączące jego obydwie nici. Niezbędnym i wystarczającym warunkiem rozpoczęcia replikacji jest takie rozdzielenie par komplementarnych zasad obydwu nici DNA, aby wolna grupa hydroksylowa z pozycji 3' skrajnego nukleotydu jednej nici znalazła się naprzeciwko tego odcinka drugiej nici, który ma być odtwarzany. Dyskutując szczegóły tej hipotezy Bollum zaproponował kilka modeli miejsc, w których zaczyna się odtwarzanie DNA na matrycy.

W referacie pod skromnym tytułem „Synteza polinukleotydów, a kod genetyczny” H. G. Khorana (Wisconsin) przedstawił wyniki ogromnej wagi, które pozwoliły na ustalenie znaczenia wszystkich wyrazów kodu genetycznego. Otrzymane w drodze syntezy chemicznej, krótkie polidezoksyrybonukleotydy o powtarzającej się sekwencji dwu-, trój-, lub cztero-nukleotydowej służyły jako matryca dla polimerazy RNA zależnej od DNA, a w konsekwencji powstawały długie polirybonukleotydy zawierające komplementarne nukleotydy o odpowiednio powtarzającej się sekwencji. Co więcej, krótkie polidezoksyrybonukleotydy stanowiły matrycę również dla polimerazy DNA, co z kolei powodowało powstawanie długich polimerów DNA-podobnych o powtarzającej się sekwencji dwu- lub trój-dezoksyrybonukleotydów. Te długie dwuniciowe polimery o strukturze podobnej do DNA mogą służyć jako matryce dla polimerazy RNA; dodanie dwu odpowiednich rybonukleozydotrójfosforanów pozwalało na dowolną transkrypcję jednej lub drugiej nici DNA z utworzeniem komplementarnego polirybonukleotydu. Synteza wszystkich możliwych 64 trójrybonukleotydów (z czterech podstawowych mononukleotydów) oraz polinukleotydów o powtarzającej się sekwencji poszczególnych trójrybonukleotydów dała możliwość syntezy w układach bezkomórkowych odpowiednich homopolipeptydów. Syntetyczne polirybonukleotydy zawierające przemienne dwa trójnukleotydy prowadziły w układach bezkomórkowych do powstawania kopolipeptydów o również przemiennej sekwencji aminokwasów. Pod koniec wykładu zebrał Khorana wyniki badań swego laboratorium w postaci tabeli ilustrującej 64-wyrazowy kod dla wszystkich 20 aminokwasów występujących w białkach.

Poruszając zagadnienie rozpoczynania syntezy łańcucha peptydowego Khorana nawiązał do badań nad N-formylometionyl-sRNA z *E. coli* (Clark i Marker, 1966), który wydaje się grać rolę sRNA inicjatora, a kodujący go tryplet — kodonu inicjującego.

Podobne badania przedstawił następnie H. Matthaei (Göttingen). W doświadczeniach nad odczytywaniem kodu stosował on jako modele mRNA długie polirybonukleotydy oraz izolowane z *E. coli* rybosomy oczyszczone od enzymów nukleolitycznych. Otrzymane tą drogą wyniki okazały się zbieżne z wynikami badań Khorany i jego grupy z tym jednak, że według Matthaei trójnukleotyd UGA nie koduje żadnego z 20 aminokwasów i jak przypuszcza autor, może stanowić sygnał do odłączania się łańcucha peptydowego z rybosomów.

Problem kodowania początku i końca syntezy łańcucha peptydowego szerzej przedyskutował B. F. C. Clark (współautor L. Marker — Cambridge). Dane genetyczne i biochemiczne sugerują, że tryplety kodujące koniec łańcucha peptydowego mają sekwencję UAA lub UAG (według Matthaei UGA) podczas gdy początek łańcucha kodowany jest przez tryplet AUG. Clark przypuszcza, że wewnątrz cząsteczki wielocistronowego mRNA tryplety sygnalizujące koniec jednego peptydu i początek następnego występują kolejno po sobie (UAA AUG), oraz że ten sam zespół trypletów rozpoczyna również cząsteczkę mRNA. Przedstawiony przez Ochoa fakt nie odczytywania końcowego trypletu cząsteczki mRNA od strony 5' oraz dane wskazujące, że cząsteczki naturalnych mRNA zaczynają się od nukleotydów purynowych, pozwalają według Clarka założyć, że ów purynowy tryplet bierze udział w przyłączaniu mRNA do rybosomu, co jest konieczne, aby sygnał rozpoczynający został odczytany. Na temat roli N-formylo-met-tRNA w rozpoczynaniu syn-

tezy peptydu rozwinęła się następnie żywa dyskusja, w której zabrali głos specjaliści tej miary, jak S. Ochoa, P. Leder i U. Z. Littauer.

W swoim wykładzie na temat kodu genetycznego Khorana poruszył również zjawisko specyficzności rozpoznawania kodonów przez tRNA. Jak wykazały badania tRNA przenoszących argininę, serynę (Khorana) i fenyloalaninę (Littauer) bezwzględna specyficzność odczytywania dotyczy pierwszej litery trypletu; trzecia zaś litera, jeśli jest nią pirymidyna, wydaje się być wymienna bez zmiany znaczenia kodonu. Wynika z tego, zdaniem Khorany, że biologicznie niezbędna ilość sRNA w tkance mogłaby być niewielka, w rzeczywistości jednak wskutek częściowej degeneracji kodu w każdym badanym organizmie występuje więcej różnych sRNA niż jest to konieczne. Stopień degeneracji kodu może być jednakże u różnych organizmów inny, co przejawia się ostatecznie w pewnej gatunkowej specyficzności poszczególnych sRNA (O. Ciferri — Pavia; F. Kalousek, J. Černa, F. Šorm — Praga). Oznacza to, że pewne izoakceptorowe sRNA mają swoje odmienne kodony. I tak np. lizyna kodowana jest przez trzy tryplety: AAA, AAU, i AAG, lecz tylko AAA charakterystyczny jest dla drożdży, AAG dla *E. coli*, a AAA i AAU dla *A. vinelandi* (G. N. Zaistseva, R. N. Glebov — Moskwa).

Brak specyficzności natomiast przy obecności w tRNA właściwego antykodonu, względnie błędy w odczytywaniu kodonów przez niektóre tRNA tłumaczy się różnicami ich drugorzędowej struktury (U. Z. Littauer i M. Revel — Rehovoth).

Badane przez Littauera i wsp. tRNA przenoszące fenyloalaninę z egzotrofów *E. coli*, hodowanych na pełnych pożywkach lub w nieobecności metioniny różniły się ilością zmetylowanych zasad oraz odpowiedzią na różne kodony. Przy czym cząsteczki Phe-tRNA ubogie w grupy metylowe odznaczały się zdolnością wbudowywania fenyloalaniny do peptydów w odpowiedzi na kodony nietypowe dla prawidłowych cząsteczek Phe-tRNA. Są również dane wskazujące, że cząsteczki Phe-tRNA nie zawierające zmetylowanych zasad mają zmodyfikowaną strukturę trzeciorzędową. Przypuszczenie takie uzasadniają między innymi badania nad własnościami syntetycznych polinukleotydów (D. Shugar i W. Szer) oraz chemicznie zmetylowanych cząsteczek innych sRNA (Ebel, 1966). Niedostateczna jednak znajomość rozmieszczenia grup metylowych w cząsteczkach Phe-tRNA z *E. coli* utrudnia zrozumienie mechanizmu oddziaływania tych grup na zdolność odczytywania kodu.

W referacie pt. „Miejsca aktywne w RNA” G. L. Brown (współautorzy: Sheila Lee, D. Metz — Londyn) przedstawił wyniki doświadczeń, w których stosował metodę selektywnego i specyficznego podstawiania lub blokowania niektórych zasad naturalnych w sRNA, oraz przedyskutował wpływ wywołanych modyfikacji na współdziałanie badanych sRNA z syntetycznymi mRNA podczas syntezy peptydów *in vitro*.

Wpływ chemicznej modyfikacji sRNA na ich zdolność wiązania i przenoszenia aminokwasów były treścią wielu doniesień. Z badań J. P. Ebela i wsp. (Strasbourg) można wnioskować, iż dopóki chemiczna interwencja nie zmienia antykodonu oraz nie prowadzi do zmian drugorzędowej struktury naturalnych sRNA, ich zdolność wiązania i przenoszenia właściwego aminokwasu pozostaje zachowana. Modyfikacja zaś spowodowana, np. przez działanie hydroksylaminy na cytozynę antykodonu powoduje utratę zdolności „rozpoznawania” aminokwasu przez tRNA (D. G. Knorre — Nowosybirsk; N. N. Kochetkov, E. I. Budowsky, N. E. Broude; oraz V. P. Demushkin, N. K. Kochetkov, E. I. Budowsky — Moskwa; L. Frolova, T. Zhilayeva, N. Alexandrova, L. Kisselev — Moskwa).

Badania nad pierwszorzędową strukturą przenoszącego walinę tRNA z drożdży piekarskich, prowadzone przez biochemików radzieckich, przedstawił A. A. Baev

(współautorzy: T. V. Venkstern, A. D. Mirsabekov, A. J. Krutilina, V. A. Axelrod, L. Li i V. A. Engelhardt — Moskwa). Jak dotąd nie można było wprawdzie określić pełnej sekwencji nukleotydów w przenoszącym walinę tRNA, udało się jednak ustalić sekwencję nukleotydów w obu krańcowych częściach cząsteczki, tj. w części akceptorowej i nieakceptorowej. O składzie nukleotydowym oraz o sekwencji nukleotydów w tRNA przenoszącym serynę mówił H. G. Zachau (Köln). Omówił on badania, które doprowadziły do ustalenia sekwencji nukleotydów tworzących cząsteczki każdego z dwu Ser-tRNA i podał postulowaną przez siebie, a odmienną od dotychczas przyjmowanej, strukturę trzyczłonową tych makromolekuł. Cząsteczki Ser-tRNA różnią się od siebie tylko trzema nukleotydami, a w antykodonie zawierają te same nukleotydy. Nieznaczące różnice w składzie nukleotydowym, nie zmieniają biologicznej roli w przenoszeniu seryny — wpływają jednak w pewnym stopniu na własności fizyczne cząsteczek, co pozwala wyodrębnić obie frakcje Ser-tRNA techniką rozdzielania przeciwwądrowego. Według Ochoa, który zabrał głos w dyskusji, różnice w składzie nukleotydowym Ser-tRNA badanych przez Zachau'a i jego współpracowników, są tak nieznaczące, że powstały zapewne w drodze mutacji punktowych.

Zagadnienia związane z odczytywaniem kodu szczegółowo omówili w kolejnych referatach S. Ochoa i R. E. Monro. Odczytanie informacji genetycznej wymaga, jak wiadomo, wzajemnego oddziaływania aminoacylo-tRNA i mRNA na rybosomach w obecności pewnych białek supernatantu, GTP oraz kationów dwu i jednowartościowych. Kulminacyjnym momentem odczytywania jest powstanie nowego wiązania peptydowego. Udział rybosomów w syntezie wiązań był głównym tematem omawianym przez Monro. Dane doświadczalne wskazują, że wybiórcze wiązanie aminoacylo-tRNA ma miejsce na mniejszych podjednostkach rybosomalnych (o stałej sedymentacji 30S). W układach zawierających izolowane podjednostki 30S połączone z mRNA można było bowiem wykazać kierowane przez kodon, specyficzne wiązanie aminoacylo-tRNA. Według Monro w wyniku oddziaływania części cząsteczki tRNA bliskiej trypletu z podjednostką rybosomu 30S utrwała się słabe połączenie zasad kodonu i antykodonu. Skoro zaś izolowane większe podjednostki rybosomowe (o stałej sedymentacji 50S) nie wiążą ani mRNA, ani tRNA, wzmacniają natomiast siłę wiązania aminoacylo-tRNA z mRNA połączonym z podjednostkami 30S — to można sądzić, iż stabilizacja ta jest wywołana oddziaływaniem podjednostek 50S z obszarami cząsteczki tRNA niesiąsiadującymi z trypletem. Peptyd przyłączony estrowo do tRNA (poprzez skrajną resztę adenozyne) rośnie stopniowo od strony skrajnej grupy aminowej. Wiązanie peptydowe zaś powstaje w wyniku przeniesienia peptydu na świeżo przyłączoną cząsteczkę następnego aminoacylo-tRNA z równoczesnym usunięciem tRNA, z którego peptyd został przeniesiony. Zdaniem Monro wiele danych wskazuje, że w przeniesieniu peptydu nie biorą bezpośredniego udziału białka z tzw. supernatantu i GTP, lecz, że proces ten katalizowany jest przez transferazę peptydową, trwale wbudowaną w strukturę większych cząstek rybosomowych.

Kierunek odczytywania kodu omówił S. Ochoa, wskazując doświadczenia dowodzące polarności odczytywania mRNA od skrajnego 5' nukleotydu do skrajnego nukleotydu 3'.

Warto w tym miejscu zasygnalizować badania nad syntezą przeciwciał na polisomach izolowanych ze śledziony immunizowanych zwierząt (M. Bagdasarian, M. Bagdasarian, D. Borecka — Warszawa; P. Lónai, E. Kálmán, E. J. Hidvégi — Budapeszt).

Własności RNA 5S, izolowanego z rybosomów wątroby szczurzej badali R. J. Bachvaroff i V. S. Tongur (Moskwa) określając własności fizyczne,

skład nukleotydowy i dyskutując prawdopodobną rolę RNA 5S w wiązaniu aminokwasów. Sekwencja nukleotydów rybosomowego RNA o stałej sedimentacji 5S z *E. coli* stanowi obecnie przedmiot zainteresowania F. Sanger'a (Cambridge). RNA to cechuje brak nukleotydów o nietypowych zasadach oraz obecność urydyno-5' fosforanu na jednym oraz urydyny na drugim krańcu cząsteczki (Rosset, Monier, Julien, 1964). G. G. Brownlee i F. Sanger ustalili, jak dotąd, sekwencję nukleotydów w oligonukleotydach uwalnianych podczas rozkładu RNA 5S przez rybonukleazę trzustkową oraz tzw. rybonukleazę T₁, co jednak nie pozwala jeszcze na określenie pełnej sekwencji wszystkich 115, jak się wydaje, nukleotydów składowych cząsteczki tego RNA.

Z dużym zainteresowaniem przyjęty został wykład P. Borsta (współautorka A. M. Kroon, G. J. C. M. Ruttenberg — Amsterdam) na temat cytoplazmatycznego DNA. W ostatnich latach dopiero wykazano definitywnie (Gibor i Granick, 1964; Kroon, 1966), że DNA jest stałym składnikiem chloroplastów i mitochondriów. W komórkach kręgowców DNA mitochondriów ma postać kulistą. Są dane wskazujące, że cytoplazmatyczny DNA ulega replikacji w organellach komórkowych, oraz, że gra pewną rolę w biosyntezie białek mitochondrialnych. Na zakończenie Borst zaproponował i przedyskutował prawdopodobne modele biosyntezy mitochondriów i chloroplastów.

W mitochondriach bakteryjnych i zwierzęcych można wykazać (D. Neubert, H. Helge, R. Baas — Berlin-Dahlem) uzależnioną od DNA syntezę RNA, sprzężoną w pewnym stopniu z syntezą białek. Nasuwa to autorom przypuszczenie, iż badane przez nich RNA syntetyzowane w izolowanych mitochondriach, ma charakter RNA informacyjnego.

Współczesne poglądy na transformacje bakteryjne przedstawił R. D. Hotchkiss (New York) uwzględniając problemy wnikania DNA z jednej komórki do drugiej, wzajemnego oddziaływania cząsteczek DNA oraz ewentualnej wymiany nukleotydów.

Z badań nad metabolizmem wrażliwych na ciepło mutantów *E. coli* wynikało, że termolabilnym czynnikiem w zmutowanych komórkach jest enzym, który syntetyzuje przenoszącą walinę sRNA. Autorzy referatu (F. Gros i M. Yaniv — Paryż) są zdania, że gen odpowiadający za wspomnianą mutację zlokalizowany jest pomiędzy markerami Thre- i Met-.

O mechanizmach replikacji wirusowego RNA mówił w swym referacie E. M. Martin (Londyn). Zrozumienie procesu replikacji wirusowego RNA pogłębiło się znacznie z chwilą wykrycia dwuniciowego RNA w zakażonych wirusami komórkach (Montagnier i Sanders, 1963) oraz wyizolowania z tych komórek niezależnej od komórkowego DNA polimerazy, syntetyzującej wirusowe RNA i jego formą dwuniciową (Baltimore i Franklin, 1963). Na podstawie badań nad zakażonymi fagiem komórkami *E. coli* Weissmann, Borst, Burdon, Billeter i Ochoa (1964) wysunęli hipotezę, że replikacja wirusowego RNA zachodzi na komplementarnej nici podwójnej formy RNA przy równoczesnym usuwaniu nici pierwotnej przez powstającą nić wtórną. W oparciu zaś o badania nad intermediatem powstającym podczas replikacji wirusa polio (Bishop, Summers i Lewintow 1965) oraz o własne doświadczenia nad syntezą wirusa Semliki (1966) w komórkach fibroblastów kurzych — zaproponował Martin kontr-hipotezę mechanizmu replikacji. Martin postuluje mianowicie, iż dwuniciowa forma RNA zawiera obszary, w których nici są rozdzielone i gdzie, być może, zlokalizowana jest polimeraza wirusowego RNA. Replikacja więc miałaby według Martina zachodzić na komplementarnej nici odchylonej od nici pierwotnej. Na nici komplementarnej obok polimerazy można stwierdzić również pojedyncze nici nowopowstałego RNA, podobnego do RNA z dojrzałych cząstek wirusa.

Referat Martina wzbudził żywy oddźwięk. W dyskusji wypowiadali się Borst, Ochoa oraz Fuller. Komunikat Martina na temat syntezy RNA wirusa Semliki *in vivo* i *in vitro* cieszył się też bardzo dużym zainteresowaniem, a w dyskusji zabrali głos Sanger i Ochoa.

Genetyczną współzależność między bakteriami i bakteriofagami badali D. B. Cowie i P. Szafranski (Washington) stosując technikę hybrydacji DNA na agarze (polegającą na oddziaływaniu wzajemnym cząsteczek DNA o podobnej strukturze). We wszystkich badanych przypadkach stwierdzono współzależność genetyczną między DNA wirusa a DNA komórki gospodarza.

W ramach Sympozjum wygłoszono łącznie 17 referatów i 116 komunikatów, w tym 12 doniesień z laboratoriów krajowych. Przewodniczącym i organizatorem Sympozjum był prof. D. Sugar (Warszawa).

Kolokwium: Biochemia Płytek Krwi. W wykładzie rozpoczynającym pierwsze międzynarodowe Kolokwium na temat biochemii płytek krwi J. Roskam (Liege) omówił rozwój poglądów na rolę płytek w hemostazie. Agregaty płytek krwi grają pierwszorzędną rolę w hamowaniu krwawień z drobnych ran. W procesie tym obserwuje się etap przylegania płytek do włókien kolagenowych, uwalniania z płytek ADP, które jest najpotężniejszym czynnikiem agregującym oraz tzw. lepłą przemianę zlepek płytek w następstwie ich oddziaływania z trombiną i Ca^{++} . Mechanizmy tych bardzo skomplikowanych zjawisk badane są bardzo intensywnie w wielu laboratoriach biochemicznych.

W zastępstwie E. F. Lüschera badania nad białkami płytek przedstawił M. Davey (Bern); własności pochodzących z płytek czynników aktywnych w procesie krzepnięcia krwi stanowiły treść referatów S. Niewiarowskiego (współautorzy: R. Fabiszewski i A. Popławski — Białystok) oraz E. Deutscha (współautor K. Lechner — Wiedeń) i kilku doniesień.

Przemiany nukleotydów adenylowych w płytkach dyskutowali H. Holmsen (Oslo), który stwierdził istnienie co najmniej dwóch puli nukleotydów adenylowych o odmiennym metabolizmie, oraz T. H. Spaet (New York) i A. Uzan (współautorzy: J. Doumenc, M. Samama, R. Tixier — Gennevilliers, Seine). Według Spaeta agregacja płytek zachodzi na koszt energii wyzwolonej podczas rozpadu ADP do AMP i P_i . Badacze francuscy podkreślali, że *in vitro* podobne działanie wykazuje również IDP.

E. Kowalski (Warszawa) przedstawił teorię, wg której uwalnianie nukleotydów adenylowych z płytek przez trombinę i enzymy proteolityczne jest związane z aktywacją enzymów lizosomalnych i ATP-azowej czynności kurczliwego białka płytek — trombosteniny.

F. Markwardt (Erfurt) przedstawił badania nad uwalnianiem, pod wpływem trombiny, biogennych amin — serotoniny i histaminy, czemu towarzyszy spadek poziomu ATP w płytkach. Autor ten jest zdania, że podobnie jak trypsyna, papaina i subtilizyna (w badaniach *in vitro*) również i trombina (*in vivo*) może zmieniać wybiórczo przepuszczalność błony płytek krwi sprzyjając uwalnianiu amin. Okazało się, iż niektóre jady węzów wywołują analogiczny efekt. F. Crawford (Birmingham) na podstawie badań nad przechodzeniem serotoniny z osocza do płytek u chorych z nowotworem wydzielającym serotoninę wykazał istnienie co najmniej dwóch różnych mechanizmów przenoszenia serotoniny przez błonę płytek.

Badania nad ultrastrukturą płytek krwi osób zdrowych oraz pacjentów z pewnymi zaburzeniami układu krzepnięcia przedstawiła L. Libanska (Praga). Szczególną uwagę zwróciła ona na obrazy połączeń włókien fibryny z pewnymi typami ziarnistości płytek.

M. Kopeć (Warszawa) w oparciu o wyniki doświadczeń nad wzajemnym oddziaływaniem płytek krwi i produktów rozpadu fibrynogenu przypuszcza, że

fibrynogen stanowi integralną część powierzchni płytek i decyduje o zdolności płytek do ich przemian, adhezji, agregacji i lepkiej przemiany. Produkty rozpadu fibrynogenu adsorbując się na powierzchni płytek zaburzają ich funkcje.

W zastępstwie R. Grossa, G. W. Löhra i D. H. Wallera (Tübingen) badania nad defektami enzymatycznymi w genetycznie uwarunkowanych chorobach płytek przedstawił E. Lochler.

Łącznie podczas kolokwium wygłoszono 27 referatów i doniesień przy żywej dyskusji wielu spornych zagadnień wynikających z przedstawionych prac i hipotez. Kolokwium zostało zorganizowane przez prof. E. Kowalskiego (Warszawa) oraz doc. S. Niewiarowskiego (Białystok).

Kolokwium: Biochemia Mitochondriów. „Pomimo znacznego postępu naszej wiedzy o poszczególnych komponentach łańcucha oddechowego i strukturze mitochondriów dalecy jesteśmy jeszcze od zrozumienia mechanizmów, dzięki którym w mitochondrium magazynuje się energia wyzwolana w procesach oksydoredukcji łańcucha oddechowego” — tymi słowami rozpoczął wykład inauguracyjny Kolokwium* na temat Biochemii Mitochondriów E. C. Slater (Amsterdam).

W dalszym ciągu wykładu Slater wysunął szereg nierozwiązanych dotąd kwestii, formułując między innymi pytania: czy pierwszym aktem magazynowania energii jest utworzenie związku bogatego w energię (Slater, 1953), czy też utworzenie potencjału membranowego (Mitchell, 1961), lub zmiany konformacji białek (Boyer, 1964)? Jaka jest rola poszczególnych członów łańcucha oddechowego, a w szczególności cytochromu b i ubichinonu; jakie ma znaczenie fakt, że redukcji NAD⁺ i cytochromów oraz być może, niehemowego żelaza⁺³ i miedzi⁺² towarzyszy uwalnianie protonów; jaka jest rola lipoproteidowych błon?

Dwie alternatywne hipotezy dotyczące pozycji i roli ubichinonu w łańcuchu oddechowym omówili M. Klingenberg (współautor A. Kroger — Marburg) i E. R. Redfearn (współautor P. A. Whittaker — Leicester). Klingenberg przedstawił dane uzasadniające pogląd, że ubichinon nie tylko włączony jest w główny ciąg reakcji łańcucha oddechowego, lecz, co więcej, zajmuje w łańcuchu oddechowym miejsce centralne, zbierając elektrony z różnych flawoproteidów. Cytowane kilkakrotnie podczas Kolokwium prace zmarłej niedawno L. Szarkowskiej dostarczyły wielu danych wskazujących, że właśnie w ubichinonie spotykają się szlaki transportu elektronów z różnych utlenianych substratów. Odmienne stanowisko reprezentuje Redfearn, który uważa, iż ubichinon znajduje się w rozgałęzieniu szlaku oddechowego, w miejscu, w którym krzyżować się jednak mogą ciągi reakcji przenoszące elektrony z NADH₂ i bursztynianu.

Ogromnie żywa dyskusja toczyła się również wokół różnych koncepcji mechanizmu oksydacyjnej fosforylacji oraz mechanizmów i znaczenia transportu jonów przez błony mitochondrialne. Według „klasycznej” teorii oksydacyjnej fosforylacji w wyniku reakcji łańcucha oddechowego tworzy się nieufosforylowany, bogaty w energię związek pośredni o nieznaną dotąd strukturze. Stanowisko to oprócz E. C. Slatera na Zjeździe reprezentowali L. Ernster (współautorzy: C. P. Lee i S. Janda — Sztokholm), B. Chance (Philadelphia) i inni. W toku dyskusji W. Wainio (New Jersey) doniósł o izolowaniu z mitochondriów fosfodohistydyny i przedstawił dane sugerujące, że substancja ta spełnia kryteria postulowane dla intermediatu oksydacyjnej fosforylacji.

* Po zakończeniu III Zjazdu FEBS, w dniach 8 i 9 kwietnia odbyło się zamknięte Konwersatorium z udziałem 65 zaproszonych uczestników Kolokwium. Na konwersatorium tym, zorganizowanym przez Zakłady Biochemii Uniwersytetu Amsterdamskiego, Instytutu im. M. Nenckiego i Uniwersytetu Warszawskiego, kontynuowano dyskusję nad referatami i komunikatami przedstawianymi na Kolokwium. Niniejsze sprawozdanie obejmuje częściowo również wypowiedzi i dyskusje w ramach tego zamkniętego Konwersatorium.

Zupełnie odmienny mechanizm sprzężenia utleniania z syntezą ATP zakłada teoria P. Mitchella (Bodmin). Proces transportu elektronów w łańcuchu oddechowym prowadzi według Mitchella do przemieszczania protonów, a ta z kolei do wytworzenia się różnic pH i różnic potencjału elektrostatycznego po obydwu stronach błony mitochondrialnej, sprzyjając syntezie ATP. Przeciwnie zaś B. Chance, jak i J. B. Chappell (współautor K. N. Haarhof — Bristol) są zdania, że przemieszczanie się protonów jest wtórnym efektem magazynowania energii. Podstawowe różnice pomiędzy założeniami obu teorii, zilustrował podczas dyskusji Slater w następującym schemacie:

1. Chappell:

łańcuch oddechowy \rightarrow produkt pośredni bogaty w energię \rightleftharpoons ATP
 \downarrow
 pobieranie kationów = powstawanie H^+

2. Mitchell:

łańcuch oddechowy \rightarrow powstawanie $H^+ \rightleftharpoons$ ATP
 \downarrow
 pobieranie kationów

Problem transportu jonów poprzez błony mitochondrialne dyskutowali szeroko Chappell i Chance oraz E. Carafoli (współautorzy: C. S. Rossi, J. Bielawski, A. L. Lehninger — Padwa; Baltimore), A. Azzi i G. F. Azone (Padwa). Główne rozbieżności w poglądach na transport kationów dotyczyły kwestii występowania lub braku stosunków stechiometrycznych pomiędzy pobieraniem jonów wapnia a wyrzucaniem protonów. Sprawa transportu anionów przez błony mitochondrialne tak podstawowa dla zrozumienia wykorzystania (zużycia) substratów w mitochondriach dyskutowana była przez Chappella, który klasyfikując aniony według łatwości z jaką przenikają do wnętrza mitochondrium postuluje występowanie specyficznych przenośników dla każdej z grup anionów. Znaczenie czynnika regulującego przepuszczalność, jako regulatora zużycia α -ketoglutaranu wykazał E. J. de Haan (Amsterdam). Wpływ szczawiooctanu na utlenianie bursztynianu w cyklu kwasu cytrynowego oraz czynniki kontrolujące poziom szczawiooctanu dyskutowane były przez A. B. Wojtczak (Warszawa) oraz A. M. Robertsona (Oxford) i S. Papa (Bari).

Spośród enzymów mitochondrialnych odgrywających istotną rolę w metabolizmie tych organelli, omawiane były obszerniej: oksydaza cytochromowa (W. H. Vanneste — Gandawa) i dehydrogenaza bursztynianowa (P. Cerletti — Rzym i L. Wojtczak — Warszawa).

Nowe koncepcje aktywacji i utleniania kwasów tłuszczowych omawiali D. Shepherd i D. W. Yates z grupy P. B. Garlanda (Bristol). Zasadniczym punktem ich hipotezy jest założenie, że CoA wewnątrz mitochondriów niezbędny dla beta-oksydacji kwasów tłuszczowych ulegać może acetylacji jedynie przez acylo-karnitynę powstającą w mitochondriach lub poza nimi.

Referat wprowadzający w problemy zależności cytoplazma — mitochondria wygłosił H. A. Krebs (Oxford), wskazując, że $NADH_2$ niezbędne w cytoplazmie w procesach glukoneogenezy, a powstające pierwotnie w mitochondriach — transportowane jest do cytoplazmy poprzez układ szczawiooctan-jabłczan. Układ ten, pracując w odwrotnym kierunku przenosi z cytoplazmy do wnętrza mitochondrium tzw. redukcyjne równoważniki, powstające podczas glikolizy. Interesującą hipotezę na temat regulacji poziomu ATP w cytoplazmie a pośrednio również intensywności glikolizy podał S. A. Neifakh (Leningrad), opisując czynnik lipoheomoproteidowy — „kinazynę”, która wydzielana przez błony mitochondrialne ma selektywnie aktywować kinazę fosfoglicerynianu.

Ogółem podczas Kolokwium na temat Biochemii Mitochondriów wygłoszono 7 referatów oraz 81 krótkich doniesień. Biochemicy polscy przedstawili 15 doniesień, część z nich przy współpracy z biochemikami zagranicznymi. Ponadto 3 prace przedstawione przez biochemików zagranicznych wykonane były przy udziale biochemików polskich. Organizatorami Kolokwium byli prof. S. C. Slater (Amsterdam), doc. L. Wojtczak (Warszawa) oraz doc. Z. Kaniuga (Warszawa).

Doniesienia na tematy wolne. Spośród ogólnej liczby 527 krótkich doniesień wygłoszonych podczas III Zjazdu FEBS w ramy dyskusji na Sympozjum i w Kolokwium włączono 221. Wśród pozostałych 306 blisko 30 komunikatów dotyczyło syntezy białek, około 20 — procesów oksydoredukcyjnych, a dalszych kilkanaście skupiało się wokół zagadnień z dziedziny krwi. Wskazuje to jak bardzo wiodące tematy zjazdów kierunkują nadsyłane doniesienia, równocześnie jest także wyrazem zainteresowania szerokich kół biochemicznych problematyką warszawskiego Zjazdu FEBS.

Znaczną większość komunikatów przedstawionych w sekcjach, bo około 120, stanowiły prace z zakresu enzymologii w najszerszym sensie tego określenia. Na uwagę zasługują doniesienia informujące o badaniach centrów aktywnych enzymów, oraz mechanizmów aktywacji przez kationy i hamowania przez analogi substratów, a przede wszystkim, niezbyt wprawdzie liczne, prace nad regulacją syntezy enzymów. Ciekawą grupę stanowiły również prace dotyczące aktywnego transportu kationów oraz dyskusja nad aktywnym, czy biernym — modulowanym jednak przez przenośniki — transportem cukrów poprzez błony.

Inna, zwarta tematycznie, choć pochodząca z różnych ośrodków, grupa prac dotyczyła badań nad metabolizmem lipidów i steroli; szereg zaś luźniej związanych komunikatów omawiało różnie ujmowane badania glikolipidów, glikopeptydów i glikoproteidów.

Przeglądając program naukowy Zjazdu i tom streszczeń można również zauważyć, że w wielu ośrodkach europejskich bardzo intensywnie prowadzone są badania w zakresie neurochemii, oraz nad metabolizmem tkanek nowotworowych. Podczas III Zjazdu FEBS przedstawiono również wiele prac wywodzących się z fizjologii roślin, co rzadko dotychczas zdarzało się na ogólnych zjazdach biochemicznych w naszym kraju.

Informacje o organizacji III Zjazdu FEBS. Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego rozpoczął wstępne prace organizacyjne wcześniej niż rok przed terminem III Zjazdu FEBS. Pierwsze narady odbyły się w wąskim gronie kilku zaledwie osób, wkrótce jednak ukonstytuowały się Komitety Organizacyjny i Wydawniczy; Komitet Naukowy, pod przewodnictwem prof. J. Hellera rozpoczął pracę w grudniu ub. r. selekcionując prace nadesłane na Zjazd. Prace organizacyjne stopniowo wymagały coraz to więcej wysiłku i starań, trzeba zatem było dokooptować szereg osób do współpracy w różnych działach; w końcowym etapie organizacji oraz podczas Zjazdu współdziałało z Komitetem Organizacyjnym ponad 200 Kolegów, głównie z Oddziału Warszawskiego PTBioch.

Ogółem w Zjeździe wzięło udział 1566 uczestników z 29 krajów, w tym 550 z Polski. Gości zagranicznych przybywających na Zjazd witali na lotnisku i dworcach Koledzy z Sekcji Transportu, kierowanej przez mgr Lecha Nowakę. Członkowie Zjazdu, którzy we właściwym terminie załatwili konieczne formalności i wnieśli przepisane opłaty otrzymali, jeszcze przed wyjazdem ze swego kraju, informacje, w jakim hotelu zostaną ulokowani. Z dworca lub lotniska członkowie ci odwiezieni zostali specjalnymi autokarami pilotowanymi przez kolegów z Sekcji Transportu wprost do hoteli, gdzie zajęli się nimi koledzy współdziałający również z Komitetem Organizacyjnym. W hotelach czekały na zarejestrowanych członków Zjazdu przygotowane uprzednio materiały zjazdowe. Trudną pracę rozdziału kwa-

ter przeprowadził mgr Robert Krauze, rozwiązując szereg kwestii z PBP Orbis. Inni uczestnicy, którzy z różnych względów nie dopełnili wszystkich formalności, przywieźli byli do PKiN, gdzie na IV-iej kondygnacji znajdowało się Biuro Zjazdowe, z kartoteką uczestników, kasą FEBS, pocztą zjazdową i ogólną informacją. Zawikłane formalności paszportowe i finansowe sprawiły niemało kłopotu naszym kolegom z krajów Demokracji Ludowych. Duża grupa Niemców z NRD mogła wziąć udział w Zjeździe dzięki temu, że dr Andrzej Budzyński załatwił dla nich sprawy zaproszeń oraz wymiany Polska-NRD. Dr Jerzy Witwicki zaś miał pod swą opieką kolegów z Bułgarii, Czechosłowacji, Rumunii, Węgier i Związku Radzieckiego.

Całość rejestracji i recepcji członków zorganizowali doc. Stanisław Lewak i dr Irena Szumiel, sprawami finansowymi kierowała dr Anna Mazanowska, pomagali im w tym odpowiedzialnymi nietatwym zadaniu bardzo liczni koledzy z Warszawy oraz duża grupa studentów biochemii.

Na III Zjazd FEBS (nie licząc zaproszonych wykładów) zgłoszono 588 doniesień, z których przedstawiono 527, w tym 110 przez polskich uczestników Zjazdu. Tom streszczeń o objętości 537 stron ukazał się w estetycznej formie graficznej dzięki staraniom kolegów z Komitetu Wydawniczego doc. Włodzimierza Bicza, doc. Krzysztofa Murawskiego i dr Wojciecha Rossowskiego.

Obrazy toczyły się równocześnie w kilku salach na IV, VI i XII piętrze PKiN. Wszystkie sprawy związane z przygotowaniem i obsługą sal zorganizował dr Antoni Mieczysław Daniewicz. W rannych godzinach i po przerwie obiadowej zdążająca na obrady uczestnicy cisnęli się w pośpiechu do wind. W salach, gdzie odbywały się posiedzenia Sympozjum i obydwu Kolokwiów frekwencja była na ogół ogromna. Posiedzenia sekcyjne gromadziły zaś biochemików bezpośrednio zainteresowanych przedstawianymi pracami, co wprowadzało atmosferę koleżeńską dyskusji. Trzeba dodać, że dyskutanci przechodzili następnie często do bufetów, sali Biura Zjazdowego oraz „za kulisy” prowizorycznie wydzielonych na IV kondygnacji dwu sal wykładowych, co niekiedy przeszkadzało w obradach toczących się w tych właśnie salach. Goście nasi jednak, obcy z dyskusjami w różnych sytuacjach, szybko, kulturalnie i z humorem dostosowali się do warunków oraz zorientowali w rozkładzie sal.

Każdej sesji przewodniczyło w zasadzie dwóch zaproszonych biochemików, jeden spośród gości zagranicznych, drugi spośród polskich członków Zjazdu. Sekretarze sesji pomagali przewodniczącym i informowali o przebiegu obrad. Sekretarza Zjazdu doc. Tadeusza Kłopotowskiego, który kierował również wspólnie z dr. Zofią Lassotową Biurem Prasowym Zjazdu.

Wystawa. Na czwartej kondygnacji PKiN, w sąsiedztwie Biura Zjazdowego, została urządzona wystawa aparatury oraz różnych materiałów stosowanych w badaniach biochemicznych. Organizatorem wystawy z ramienia PTBioch. był dr Przesław Poszwiński. W wystawie wzięło udział szereg poniżej wymienionych firm zagranicznych i krajowych, których ciekawsze eksponaty wyliczamy.

MSE (UK) — ultrawirówka preparatywna, wirówka szybkoobrotowa o dużej pojemności

Pye-Unicam (UK) — spektrofotometry na podczerwień i ultrafiolet, spektrofotometr płomieniowy, pH-metry, chromatograf gazowy

Unipan (Polska) — kolektor frakcji, aparat rentgenowski do badań strukturalnych, wirówka laboratoryjna

BUTJ (Polska) — urządzenia do prac z izotopami, spektromonitor (spektrometr telewizyjny do zdejmowania widm w ciągu ułamka sekundy)

LKB (Szwecja) — monitory do chromatografii, urządzenia do chromatografii obiegowej

Radiometr (Dania) — automaty do miareczkowania potencjometrycznego, pH-metry z rozwiniętą skalą, mostek do badania przewodnictwa, zestaw Astrupa do oznaczeń CO₂ we krwi

PZO (Polska) — mikroskop polaryzacyjny i interferencyjny

Zeiss (NRD) — wielki mikroskop badawczy, mikromanipulatory, spektrofotometr płomieniowy

Farmacja (Szwecja) — Sephadex'y

Reeve Angle Whatman (UK) — Bibuły i kolumny chromatograficzne

The Radiochemical Center Amersham (UK) — preparaty znakowane

Biomed (Polska) — odczynniki biologiczne i biochemiczne.

O zainteresowaniu wystawą świadczyła duża frekwencja i żywo prowadzone rozmowy zwiedzających z poszczególnymi wystawcami. Organizatorów zaś cieszy również fakt, że 70% wystawionych eksponatów produkcji firm zagranicznych zostało zakupionych przez różne krajowe placówki badawcze.

Zwiedzanie placówek biochemicznych i imprezy turystyczne. W przerwach między posiedzeniami uczestnicy Zjazdu mieli możliwość zwiedzić różne ośrodki biochemiczne z terenu Warszawy. Specjalne autokary pilotowane przez kolegów z Sekcji Transportu przewiozły około 300 gości do ponad 20 pracowni w wyższych uczelniach, instytutach PAN oraz instytutach i laboratoriach branżowych.

Imprezy turystyczne zorganizowane przez doc. Witolda Drabikowskiego objęły zwiedzanie Warszawy i okolic, Żelazowej Woli oraz kilkudniowe wycieczki (przed i po terminie Zjazdu) do Krakowa i Zakopanego. Wyjazdy te obsługiwane były przez PBP Orbis.

Imprezy towarzyskie. W przeddzień otwarcia Zjazdu (3. IV. br.) wszyscy uczestnicy wraz z osobami towarzyszącymi mieli okazję spotkać się w godzinach wieczornych w salach PKiN na czwartej kondygnacji. Przyjęcie zorganizowane staraniem pań Ireny Szafrąnskiej i Marii Wojnarowskiej cieszyło się bardzo dużą frekwencją, przybyło bowiem na nie blisko 1500 osób. Spotkanie to było właściwie wstępną i nieoficjalną inauguracją III Zjazdu FEBS. Pełna uprzejmości gościnność wszystkich kolegów współdziałających z Komitetem Organizacyjnym wprowadziła już tego wieczoru nieformalną i koleżeńską atmosferę, która panowała podczas wszystkich następných dni wytężonej pracy i dyskusji zjazdowych.

W późniejszych godzinach wieczornych tegoż dnia Przewodniczący PTBioch podjął kolację Członków Rady Federacji, następnego zaś dnia (4. IV. br.) Prezes PAN przyjął w Jabłonie zaproszonych wykładowców i innych wybitnych uczonych zagranicznych przybyłych na Zjazd.

Na zaproszenie Przewodniczącego Komitetu Nauki i Techniki, Wicepremiera Eugeniusza Sz y r a w recepcji w salach Urzędu Rady Ministrów, wzięło 420 członków Zjazdu z wszystkich krajów reprezentowanych na III Zjeździe FEBS.

W salach Hotelu Europejskiego (6. IV. br.) odbyło się zorganizowane przez PBS Orbis cocktail-FEBS-party, przy niemałej frekwencji gości zagranicznych. Dobrze, iż oprócz napojów alkoholowych, „mikro”-zakąsek i kawy podano wówczas również chłodzone lodem soki owocowe. Nie zaspokoili one wprawdzie apetytów zastrzonych całodzienną dyskusją — ostudziły jednak złudzenia, że po „drinkach” podana zostanie zasłużona kolacja.

W kolejnych dniach Zjazdu Ambasady Belgijska, Brytyjska i Francuska urządziły przyjęcia dla przybyłych na Zjazd FEBS biochemików ze swoich krajów.

Program dla osób towarzyszących. Program dla osób towarzyszących, przygotowany przez Komitet Pań — Marię Z a k r z e w s k ą, Marię K o r z y b s k ą i Grace S h u g a r — objął wycieczkę nad Zalew Zegrzyński oraz zwiedzanie Warszawy, Wilanowa, szeregu galerii sztuki, sklepów DESA i CPLiA, Zakładów 22 Lipca, oraz

żłobków itp. Podziwiać można, z jakim zainteresowaniem i przejęciem uczestniczki wycieczek oglądały urządzenia socjalne, zrekonstruowane zabytki Warszawy oraz z jaką łatwością i humorem przyjmowały różne niedogodności transportu i niespodzianki zmiennej u nas w kwietniu pogody. W programie dla osób towarzyszących brało udział około 70 osób, w tym kilka pań z małymi dziećmi. Okazało się, że pozostałe blisko 70 osób z listy osób towarzyszących stanowili młodzi biochemicy nie opuszczający obrad naukowych Zjazdu.

Posiedzenia Rady Federacji. W przeddzień otwarcia III Zjazdu FEBS oraz w ostatnim dniu obrad odbyły się pod przewodnictwem prof. K. Zakrzewskiego kolejne posiedzenia Rady Federacji. W zebraniach tych z ramienia Komitetu Biochemicznego PAN uczestniczył prof. J. Heller, z ramienia zaś PTBioch doc. T. Kłopotowski i prof. Z. Zielińska.

Omówiono między innymi sprawę letnich szkół biochemicznych oraz przedyskutowano projekt wydawania przez Federację europejskiego czasopisma biochemicznego, które pozwoliłoby na szybką publikację najlepszych prac eksperymentalnych. Ustalono, że następny, tj. IV Zjazd FEBS odbędzie się w Oslo, w dniach 4—7 lipca 1967, a organizatorem Zjazdu i Przewodniczącym Rady Federacji będzie prof. A. Pihl, Prezes Norweskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Pisząc sprawozdanie w dwa miesiące po zakończeniu obrad można pozwolić sobie na ocenę programu, poziomu naukowego oraz organizacji Zjazdu. Czyniąc to sięgnę do listów nadesłanych licznie przez przedstawicieli szeregu towarzystw biochemicznych, członków Rady Federacji i niektórych innych wybitnych uczestników Zjazdu. Zwracają oni przede wszystkim uwagę na trafny wybór atrakcyjnej i aktualnej tematyki Sympozjum i Kolokwium, zaproszenie kompetentnych wykładowców oraz podkreślają wysoki poziom dyskusji; składają również gratulacje z powodu dobrej organizacji Zjazdu, a doceniając ogrom włożonego wysiłku wyrażają uznanie i dziękują wszystkim, którzy w tej pracy współdziałali z Zarządem Głównym Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Z. Zielińska

Sprawozdanie z działalności Oddziałów PTBioch w 1965 r.

Członkowie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zrzeszeni byli w 1965 r. w 11 Oddziałach działających w największych i najbardziej aktywnych ośrodkach naukowych kraju. PTBioch zrzeszało w dniu 31 grudnia 1965 r. 716 członków, w tym 84 osoby, które wstąpiły do Towarzystwa w ciągu ubiegłego roku, co wskazuje na dalszy dynamiczny rozwój Oddziałów PTBioch.

Zgodnie z postanowieniami Statutu Towarzystwa głównym celem działalności Oddziałów jest organizowanie zebrań naukowych. W okresie sprawozdawczym w 11 Oddziałach odbyły się 84 zebrania naukowe, na których 138 prelegentów wygłosiło 102 odczyty. Tematem odczytów były zarówno wyniki własnych doświadczeń (43 referaty) jak i przegląd najciekawszych osiągnięć współczesnej biochemii na podstawie danych z piśmiennictwa (51 referatów). W wielu wypadkach badania własne przedstawiono na tle ogólnego postępu biochemii w danej dziedzinie w ostatnich latach. Referowanie własnych prac doświadczalnych było stosunkowo częste na zebraniach naukowych Oddziałów: Wrocławskiego, Łódzkiego i Białostockiego. Stosunkowo mniej referatów na zebraniach Oddziałów poświęcono zagadnieniom metodyki biochemicznej.

Na 138 prelegentów jedynie 26 pochodziło spoza Oddziału organizującego zebranie, w tym 9 osób było gośćmi z zagranicy, a więc zaledwie około 12% prelegentów

zostało zaproszonych z innych ośrodków naukowych naszego kraju. Można zażytkować stwierdzenie, że świadczy to o zbyt słabo rozwiniętej wymianie myśli naukowej między Oddziałami PTBioch. Zarząd Główny PTBioch postawił w ub. roku do dyspozycji Oddziałów odpowiednie fundusze na zapraszanie prelegentów i należy żałować, że nie są one w pełni wykorzystywane.

Dla zwiększenia frekwencji na zebraniach naukowych poszczególne Oddziały poszukiwały odpowiednio atrakcyjnej formy zebrań i sposobów informacji o nich poprzez imienne zawiadomienia, drukowane afisze oraz notatki w prasie codziennej. Na podstawie przedstawionych sprawozdań wydaje się, że celowe jest organizowanie zebrań poświęconych szerszemu problemowi, gdzie kilku specjalistów z pokrewnych dziedzin nauki wygłasza krótkie referaty. Przykładem tutaj mogą być posiedzenia zorganizowane w marcu 1965 r. wspólnie przez Oddziały: Warszawski i Krakowski, a poświęcone zastosowaniu hodowli tkanek w wirusologii i onkologii doświadczalnej i połączone z projekcją francuskiego filmu naukowego. Szersze zainteresowanie i bardziej ożywioną dyskusję można było obserwować z reguły także na zebraniach wielotematycznych, przy udziale kilku prelegentów z różnych pracowni lub w obecności dyskutantów i koreferentów zaproszonych z innych ośrodków.

Wydaje się, że ciągle nie jest w pełni wykorzystana możliwość współpracy PTBioch z innymi Towarzystwami Naukowymi w organizowaniu zebrań naukowych. Ta forma działania może być szczególnie korzystna w mniejszych ośrodkach i w związku z tym należy podkreślić inicjatywę Białostockiego Oddziału PTBioch, gdzie na 16 zebrań naukowych w 13 zebraniach uczestniczyły inne Towarzystwa Naukowe.

Poza organizacją zebrań naukowych niektóre Oddziały Terenowe PTBioch rozwijały działalność popularyzatorską. Na wyróżnienie zasługuje cykl 16 wykładów akademickich z zakresu biochemii i pokrewnych nauk przyrodniczych organizo-

Działalność oddziałów PTBioch w 1965 r.

Oddział PTBioch	Ilość członków 31.XII.65	Członkowie przyjęci w 1965	Ilość zebrań naukowych	Całkowita ilość prelegentów	Ilość prelegentów zaproszonych.	Inne rodzaje zebrań
Białystok	41	10	16	23	5	2
Gdańsk	38	3	4	5	1	1*
Górny Śląsk	50	4	4	7	1	16**
Kraków	57	14	10	16	4	—
Lublin	44	5	8	9	4	—
Łódź	50	6	6	14	—	—
Olsztyn	31	2	4	4	3	—
Poznań	79	3	6	6	—	—
Szczecin	57	4	4	4	—	—
Warszawa	220	28	14	29	8	1****
Wrocław	49	5	8	21	—	1****
Razem	716	84	84	138	26	21

* IV Sympozjum PTBioch, 11—12.VI.1965.

** Cykl wykładów wspólnie z PTFizjol. i PTPrzyr.

*** Konferencja Fotobiologów, 6.XII.1965.

**** Konferencja Elektroników w Karpaczu, 4.XII.1965.

wany przez Górnośląski Oddział PTBioch przy współpracy z Polskim Towarzystwem Przyrodników im. Kopernika oraz z Polskim Towarzystwem Fizjologicznym.

Oddział Gdański PTBioch zorganizował w dnach 11 i 12 czerwca 1965 r. IV doroczne Sympozjum Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, w którym wzięło udział około 200 uczestników. Sympozjum połączone było z Walnym Zebraniem Towarzystwa; sprawozdanie z Sympozjum i Zebrania ukazało się w Postęпах Biochemii (1966 r. — zeszyt 1).

Wrocławski Oddział PTBioch był gospodarzem konferencji Elektroników i Biochemików, która odbyła się 4.XII.65 w Karpaczu. Konferencja ta była pierwszym spotkaniem biochemików z wytwórcami i dostarczyła informacji o problemach konstrukcji prototypów aparatury biochemicznej w Polsce.

W dniu 6.XII.65 odbyło się w Warszawie ogólnopolskie spotkanie fotobiologów zorganizowane staraniem zainteresowanych członków Warszawskiego Oddziału PTBioch. Spotkanie to powołało do życia Komisję Fotobiologiczną i zdecydowało o zwołaniu w maju br. specjalistycznego sympozjum w Krakowie; komunikat o spotkaniu fotobiologów został zamieszczony w Postęпах Biochemii (1966 r. — zeszyt 1).

Niektóre dane dotyczące pracy Oddziałów PTBioch w 1965 r. zebrano dla łatwiejszego porównania w formie tablicy.

Dr A Koj
Pełnomocnik ZG PTBioch
d/s Zebrań i Zjazdów

SPIS TREŚCI

Z. Kaniuga, J. Bryła — Odwracalność reakcji przenoszenia elektronów i energii w łańcuchu oddechowym	451
W. Zagórski — Transport elektronów u bakterii tlenowych	491
A. Gardas — Mechanizm działania enzymów flawinowych	513
M. Erecińska, T. Chojnacki — Udział fosfolipidów w reakcjach łańcucha oddechowego	535
A. B. Wojtczak — Transport jonów i metabolitów przez błony mitochondrialne	547
J. Zborowski — Udział karnityny w utlenianiu kwasów tłuszczowych w mitochondriach	563
R. Wierzbicki, J. Bartkowiak — Kwas dezoksyrybonukleinowy w mitochondriach	577
W. Mozołowski — Wincenty Arnold, biochemik i lekarz	587
Leukoantocyjany głogu (S. Lewak)	597
Badanie wpływu witaminy K i jej strukturalnych analogów na aktywność enzymatyczną katalazy (J. Płotkowiak)	598
III Zjazd FEBS w Warszawie (Z. Zielińska)	601
Sprawozdanie z działalności Oddziałów PTBioch. w 1965 r. (A. Koj)	613

W 1-szym zeszycie 13 tomu ukażą się

1. Drogi biosyntezy pterydyn i tetrahydrofolanu, *B. Grzelakowska-Sztabert*
2. D(-)-mleczanowe dehydrogenazy drożdży, *G. Palamarczyk-Leszczyńska, A. M. Konecka*
3. Budowa i mechanizm działania cytochromu b_2 , *A. M. Konecka, G. Palamarczyk-Leszczyńska*
4. Ceruloplazmina, *Z. Prasał*
5. O mechanizmie enzymatycznej hydrolizy ATP przez miozynę, *J. Gruda*
6. Związki fosforanowe krwinek czerwonych człowieka i zwierząt, *A. J. Hłyńczak, J. Sysa*
7. Widma absorpcyjne fotoreceptorów siatkówki oka ludzkiego, *T. Mikulski*
8. Powstawanie i wydalanie produktów azotowych u ryb, *W. Makarewicz*

POSTĘPY BIOCHEMII
November 1966

ARTICLES IN POLISH

Volume 12

Number 4

Z. Kaniuga, J. Bryła — Reversal of Respiratory Chain (Dep. Biochem. in Respiratory Chain (Dep. Biochem. Univ., Warszawa)	451
W. Zagórski — Electron Transport in Aerobic Bacteria (Dep. Biochem. Univ., Warszawa)	491
A. Gardas — Mechanism of Action of Flavin Enzymes (Dep. Biochem. the Respiratory Chain (Inst Biochem. Biophys., Warszawa)	513
M. Erecińska, T. Chojnacki — The Participation of Phospholipids in the Respiratory Chain (Inst. Biochem. Biophys., Warszawa)	535
A. B. Wojtczak — The Transport of Ions and Metabolites across Mitochondrial Membranes (Dep. Biochem. Inst. Exptl. Biol., Warszawa)	547
J. Zborowski — The Influence of Carnitine on the Oxidation of Fatty Acids in Mitochondria (Dep. Biochem Univ. Łódź)	563
R. Wierzbicki, J. Bartkowiak — The Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid (Dep. Biochem. Univ., Łódź)	577
W. Mozołowski — Wincenty Arnold, Biochemist and Physician (Dep. Physiol. Chem., School. Med., Gdańsk)	587
Chronicle	597

PRENUMERATA CZASOPISM PWN
na rok 1967

Zamówienie i wpłaty na prenumeratę przymują:
— Oddziały i delegatury „Ruchu”
— urzędy pocztowe i listonosze tylko do dnia
10.XII.1966

Czytelnicy indywidualni mogą dokonywać wpłat
również na konto PKO Nr. 1-6-100020 Centrala
Kolportażu Prasy i Wydawnictw „Ruch”
Warszawa, ul. Wronia 23.

Wszystkie instytucje państwowe i społeczne za-
mawiają prenumeratę **wyłącznie** za pośrednictwem
oddziałów i delegatur „Ruch”.

**WCZEŚNIEJSZE ZAPRENUMEROWANIE GWARANTUJE
OTRZYMYWANIE CZASOPISM PWN.**

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

SPIS TREŚCI

Z. Kaniuga, J. Bryła — Odwracalność reakcji przenoszenia elektronów i energii w łańcuchu oddechowym	451
W. Zagórski — Transport elektronów u bakterii tlenowych	491
A. Gardas — Mechanizm działania enzymów flawinowych	513
M. Erecińska, T. Chojnacki — Udział fosfolipidów w reakcjach łańcucha oddechowego	535
A. B. Wojtczak — Transport jonów i metabolitów przez błony mitochondrialne	547
J. Zborowski — Udział karnityny w utlenianiu kwasów tłuszczowych w mitochondriach	563
R. Wierzbicki, J. Bartkowiak — Kwas dezoksyrybonukleinowy w mitochondriach	577
W. Mozołowski — Wincenty Arnold, biochemik i lekarz	587
Leukoantocyjany głogu (<i>S Lewak</i>)	597
Badanie wpływu witaminy K i jej strukturalnych analogów na aktywność enzymatyczną katalazy (<i>J. Płotkowiak</i>)	598
III Zjazd FEBS w Warszawie (<i>Z. Zielińska</i>)	601
Sprawozdanie z działalności Oddziałów PTBioch. w 1965 r. (<i>A. Koj</i>)	613