

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1967
tom 13
nr 2

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, opatrzony kolejnym numerem odpowiadającym użytemu w tekście np. Tablica 1, Wzór I, Rys. 1 lub Schemat 1. Fotografie i wykresy należy oznaczyć jako rysunki. Wszystkie załączniki należy oznaczyć u góry nazwiskiem autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

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

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1967
tom XIII
zeszyt 2

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

R A D A R E D A K C Y J N A

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

PANSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1967

Nakład 1500 (1350+150)	Oddano do składania 23.I.1967
Ark. wyd. 13,25; ark. druk. 11,5	Podpisano do druku w maju 1967
Papier druk. sat. kl. V, 70×10d	Druk ukończono w maju 1967
Cena zi 20.—	Zam. nr 153/66. T-38

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

KAZIMIERZ LECH WIERZCHOWSKI *

Fotochemiczne przemiany kwasów nukleinowych

Photochemistry of Nucleic Acids

Current state of photochemistry of natural pyrimidines and pyrimidine residues in synthetic and natural polynucleotides is reviewed.

Letalne i mutagenne działanie promieniowania nadfioletowego na drobnoustroje znane jest od szeregu dziesięcioleci i wykorzystywane dla celów praktycznych oraz jako narzędzie badań genetycznych nad procesami mutacyjnymi (32, 89, 171). Dopiero jednak poznanie roli genetycznej kwasów nukleinowych i rozwój genetyki molekularnej w ostatnim dziesięcioleciu, stworzyły warunki dla rozwoju badań nad fotochemicznymi procesami wywoływanymi przez promieniowanie nadfioletowe (UV) w aparacie genetycznym komórki oraz prób korelacji pomiędzy określonymi uszkodzeniami fotochemicznymi elementów jego budowy i uszkodzeniami, względnie modyfikacjami jego funkcji w komórce.

Badania nad fotochemią elementów budowy kwasów nukleinowych jak i samych kwasów nukleinowych, a zwłaszcza DNA doprowadziły do wykrycia szeregu potencjalnie letalnych lub mutagennych reakcji fotochemicznych zasad pirymidynowych, szczególnie wrażliwych na działanie promieniowania nadfioletowego (zobacz artykuły przeglądowe 21, 115, 122, 142).

Równolegle rozwijające się prace nad poznaniem domniemanej roli genetycznej tych uszkodzeń *in vivo* uwieńczone zostały sukcesem o doniosłym znaczeniu dla badań nad molekularnymi podstawami mutageny. Udało się mianowicie wykazać, że fotochemiczna reakcja dimeryzacji reszt tyminy sąsiadujących ze sobą w łańcuchu polinukleotydowym prowadzi do inaktywacji transformującego DNA (101, 106, 113) oraz do zahamowania syntezy DNA w komórkach bakteryjnych (101, 105, 130). Jest to pierwsza poznana na poziomie molekularnym reakcja wywołująca letalne mutacje. Ostatnio okazało się, że (109, 111) również

* Doc., dr, Zakład Fizykochemii Biologicznej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa.

dimery cytozyny oraz mieszane dimery cytozyny i tyminy spełniają podobną rolę.

Dwa powszechnie występujące dziedziczne mechanizmy samoobrony drobnoustrojów przed skutkami działania UV — fotoreaktywacja i ciemna odporność na działanie nadfioletu — związane są z usuwaniem dimerów z DNA. Fotoreaktywacja (59) okazała się fotochemiczną reakcją enzymatyczną dysocjacji dimerów pirymidynowych do monomerów (95, 101, 102, 106). Natomiast odporność bakterii na działanie UV i innych czynników mutagennych związana jest z istnieniem enzymatycznego układu, który wycina z DNA powstałe dimery wraz z fragmentem łańcucha, a następnie zapełnia lukę przez syntezę tego fragmentu DNA (17, 88, 101, 105, 106, 130).

Działanie mutagenne promieniowania przypisuje się (83, 101) dwu innym reakcjom: fotochemicznej hydratacji reszt cytozyny w DNA oraz cytozyny i uracylu w RNA (wirusy zawierające wyłącznie RNA) i wtórnej ciemnej deaminacji fotohydratów i dimerów cytozyny do odpowiednich pochodnych uracylu. Odszczepienie cząsteczki wody od fotohydratu oraz fotodysocjacja dimerów uracylu prowadzi ostatecznie do zastąpienia w DNA cytozyny przez uracyl, a więc do powstania mutacji.

W tym artykule czytelnik znajdzie przegląd reakcji fotochemicznych zasad pirymidynowych oraz omówienie ich przebiegu w syntetycznych i naturalnych polinukleotydach. Natomiast badania nad związkiem pomiędzy uszkodzeniami fotochemicznymi kwasów nukleinowych i ich funkcjami genetycznymi omawia dr I. Pietrzykowska w tym samym numerze *Postępów Biochemii*.

I. Czynne fotochemicznie promieniowanie — stany wzbudzone zasad purynowych i pirymidynowych

Względna skuteczność promieniowania w funkcji długości fali w wywoływaniu inaktywacji bakterii, wirusów czy transformującego DNA *in vitro*, tak zwane widma działania, pokrywają się w bliskim ultrafioletecie z widmem absorpcji kwasów nukleinowych charakteryzującym się szerokim pojedynczym pasmem absorpcji w zakresie 300—230 m μ (89, 103, 115).

Tylko to promieniowanie wywołuje specyficzne przemiany fotochemiczne, poddające się fotoreaktywacji (89) i praktycznie tylko jego działanie jest przedmiotem badań omawianych w tym artykule.

Bardziej krótkofalowe promieniowanie $\lambda \leq 230$ m μ wywołuje wprawdzie podobne efekty biologiczne, jednak procesy fotochemiczne leżące u podstaw tych efektów różnią się zasadniczo od procesów indukowanych przez promieniowanie długofalowe. Zdolne do fotoreaktywacji drobnoustroje po inaktywacji promieniowaniem 230—300 m μ tracą tę cechę

po działaniu promieniowania krótkofalowego (89). Promieniowanie to inicjuje najprawdopodobniej szereg rodnikowych reakcji przebiegających z udziałem tlenu, jego działanie na kwasy nukleinowe jest więc zbliżone do działania promieniowania jonizującego (21, 28, 98).

W zakresie 300—230 m μ z pośród elementów budowy kwasów nukleinowych absorbują wyłącznie reszty purynowe i pirymidynowe (5). W widmach absorpcji wolnych zasad purynowych adeniny i guaniny jak i ich N₉ podstawionych pochodnych nukleozydowych i nukleotydocydnowych wyróżnia się w tym zakresie spektralnym dwa pasma absorpcji związane z singletowymi przejściami $\pi \rightarrow \pi^*$ (26, 35, 76, 127). Zasady pirymidynowe: tymina, cytozyna i uracyl oraz ich N₁ nukleozydy i nukleotydy posiadają w zasadzie tylko jedno pasmo absorpcji singletowej π , π^* (26, 76, 127). Obecność w obu grupach pochodnych purynowych i pirymidynowych amino- oraz keto-amino podstawników powoduje, że w porównaniu z niepodstawionymi związkami macierzystymi pasma absorpcji związane z singletowymi przejściami $n \rightarrow \pi^*$ (uwarunkowanymi obecnością wolnych par elektronowych na atomach N i O), są przesunięte w kierunku fal krótszych i przykryte znacznie silniejszymi pasmami π , π^* (26, 35, 67, 68, 76, 127).

Badania właściwości emisyjnych, a zwłaszcza polaryzacji emisji fluorescencji obu grup pochodnych (22, 37, 67) sugerują, że najniższy wzbudzony poziom singletowy ma charakter poziomu π , π^* . Emisja fosforescencji ma miejsce ze stanów tripletowych również o charakterze π , π^* (27, 37, 54, 67, 117). Prostopadła do płaszczyzny cząsteczki polaryzacja momentu przejścia triplet-singlet związanego z emisją fosforescencji, wskazuje na mieszanie się stanów π , π^* z prostopadle spolaryzowanymi stanami n , π^* . Obecność stanów n , π^* i ich położenie, zależne od warunków w jakich znajduje się cząsteczka, wpływa na procesy fotofizyczne prowadzące do degradacji energii elektronowej (27, 37, 67).

Obojętne cząsteczki adeniny i guaniny oraz ich nukleozydów i nukleotydocydnów bardzo słabo fluoryzują w roztworach wodnych w temperaturze pokojowej. Wydajności kwantowe fluorescencji są rzędu 10^{-2} — 10^{-3} (15, 68, 72). W tych samych warunkach omawiane pochodne pirymidynowe w ogóle nie fluoryzują (15, 72). Wydajności kwantowe reakcji fotochemicznych (Φ) dla pochodnych purynowych są rzędu 10^{-4} — 10^{-5} mola na einstein, a dla pochodnych pirymidynowych rzędu 10^{-2} M/E (115, 116), zatem u obu grup związków degradacja energii elektronowej następuje przede wszystkim drogą nie fotochemicznych procesów bezpromienistych, sprowadzających cząsteczki do stanu podstawowego.

W pojedynczych łańcuchach polinukleotydocydnowych sąsiadujące ze sobą w promieniu oddziaływań van der Waalsa, reszty zasadowe łańcuchów bocznych wykazują w roztworach wodnych wyraźną tendencję do warstwowego układania się, w wyniku czego polimer przyjmuje upo-

rządkowaną konformację. W dwułańcuchowych kompleksach oprócz orientacji warstwowej określone reszty purynowe i pirymidynowe przeciwnych łańcuchów łączą się w pary wiązaniami wodorowymi. W wyniku wzajemnych oddziaływań właściwości optyczne reszt zasadowych w takich uporządkowanych strukturach są inne niż monomerów. W porównaniu z sumą ekstynkcji mononukleotydów składowych, ekstynkcja długofalowego pasma absorpcji syntetycznych i naturalnych polinukleotydów obniżona jest o 25—50%, natomiast położenie pasm absorpcyjnych praktycznie nie ulega zmianie (5, 125, 136). Niezmieniona wielkość energii przejścia elektronowego sugeruje słabe wzajemne sprzężenie oscylatorów w sąsiadujących cząsteczkach. Brak dotychczas zadawalającej interpretacji efektu hypochromowego. Podejmowane były próby jego wyjaśnienia w oparciu o model ekscytanu zakładający oddziaływanie podstawowego stanu elektronowego z wyżej leżącymi stanami wzbudzonymi (31, 94, 137). Ostatnio Bullough (19, 20) interpretuje hypochromizm w ramach klasycznej teorii współczynnika załamania światła dla roztworów, wykazując że wcześniejsze interpretacje mieszczą się w ramach tej teorii jako jej pierwsze przybliżenie.

Badania emisji jedno i dwułańcuchowych polinukleotydów potwierdzają zmianę właściwości optycznych wbudowanych w nie reszt purynowych i pirymidynowych, w stosunku do wolnych zasad (8, 34, 36, 38, 39, 52, 55, 56, 57, 90, 91, 92, 93). Szczególnie interesujące są doświadczenia grupy pracowników *Bell Telephone Laboratories* (38, 39, 52, 90, 91, 92, 93) nad fluorescencją i fosforescencją homo- i hetero-dwunukleotydów oraz polinukleotydów i DNA w mieszaninie glikolu etylenowego i wody (1:1) w temperaturze 77°K. Emisja fluorescencji dwunukleotydów cechujących się warstwowym ułożeniem reszt zasadowych przesunięta jest zawsze długofalowo w stosunku do emisji mieszaniny składowych mononukleotydów. Wskazuje to, że charakter emisji dwunukleotydów uwarunkowany jest powstawaniem trwałych w stanie wzbudzonym dimerów (ekscimerów) z sąsiadujących reszt purynowych i pirymidynowych. Ten sam charakter ma emisja fluorescencji polinukleotydów jednołańcuchowych i dwułańcuchowych, u dwułańcuchowych jest ona jednak wielokrotnie słabsza. Dwułańcuchowe syntetyczne polimery poli rG:rC i poli dG:dC praktycznie nie fluoryzują, ani nie fosforyzują. Emisja fluorescencji DNA jest taka sama jak poli dAT co również świadczy o silnym gaszeniu emisji wodorowo związanych par G:C.

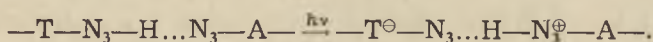
W dwunukleotydach ApC i ApU położenie, kształt pasma i czas życia fosforescencji są takie same jak u adenozy. Ponieważ fluorescencja obu dwunukleotydów (lecz nie mieszanin składowych mononukleotydów) i stosunek wydajności kwantowych fluorescencji i fosforescencji nie zależą, w obszarze absorpcji składowych nukleotydów, od długości fali

promieniowania wzbudającego, autorzy (52) dochodzą do wniosku, że energia wzbudzenia zlokalizowana jest głównie na reszcie adenyłowej ekscimerów i część jej pojawia się w wyniku bezpromienistego przejścia międzysystemowego w postaci fosforescencji właściwej adenozyne. W ten sposób w dwunukleotydach energia zaabsorbowana przez reszty pirymidynowe przenoszona jest w stanie singletowym do reszty adenyłowej.

Do wprost przeciwnego wniosku doszli Helene i wsp. (55, 56, 57) porównując gaszenie fosforescencji różnych dwunukleotydów oraz obserwując czas życia emitującego stanu tripletowego. Twierdzą oni, że przeniesienie energii wzbudzenia pomiędzy równolegle położonymi resztami purynowymi i pirymidynowymi ma wprawdzie miejsce ale zachodzi ono między stanami tripletowymi cząsteczek oraz zawsze od puryny do pirymidyny. Wyniki grupy *Bell Telephone* wydają się jednak lepiej udokumentowane doświadczalnie.

Wędrówkę energii wzbudzenia w łańcuchach polinukleotydowych w postaci zdelokalizowanego ekscytonu tripletowego postulowano (8) na podstawie gaszenia fosforescencji poli A oraz DNA przez niewielkie ilości paramagnetycznych kationów Mn^{2+} i Fe^{3+} związanych z fosforanowymi resztami polimeru. Ilościowe pomiary gaszenia fosforescencji reszt adeniny w poli A przez różne kationy paramagnetyczne w funkcji ich stężenia, potwierdziły to przypuszczenie ustalając zasięg wędrówki ekscytonu tripletowego na około 100 reszt zasadowych (39). W kopolimerze poli A_2U gaszenie występowało dopiero przy stosunku kationów do reszt zasadowych bliskim jedności. Brak migracji energii w kopolimerze, w którym reszty adenyłowe i urydyłowe rozmieszczone są statystycznie wzdłuż łańcucha, w zestawieniu z postulowanym przemieszczeniem energii wzbudzenia fosforescencji w ApU od U do A (52) sugerują, że reszty uracylowe stanowią bariery dla wędrówki ekscytonu tripletowego reszt adeniny.

Fosforescencja natywnego DNA obserwowana przy 77°K w szklkach 50% glikolu etylenowego w wodzie (91, 92), lub 0,25—0,5% roztworów glukozy w wodzie (36) przypomina czasem życia i położeniem maksimum emisję fosforescencji dwułańcuchowego poli dAT lub tyminy, względnie jej anionu. Na tej podstawie oraz w oparciu o charakterystykę emitującego stanu tripletowego przy pomocy techniki elektronicznego rezonansu paramagnetycznego Rahn i wsp. (91, 92) doszli do wniosku, że emitorem jest anion tyminy. Brak charakterystycznej emisji reszt adeniny w poli dAT (również w poli dAU) i w DNA oraz pojawienie się emisji anionu tyminy przypisują oni przeniesieniu protonu ze wzbudzonej reszty tyminowej na związaną z nią wodorowo resztą adeniny według schematu:



Reszta adeniny podobnie jak protonowana wolna adenina, traci wówczas zdolność do fosforescencji (15, 68, 72) natomiast pojawia się emisja anionu tyminy (anionu uracylu w poli rAU), który w odróżnieniu od tyminy obojętnej silnie fosforyzuje (67, 72, 90, 91). Brak emisji fosforescencji par zasadowych G:C w DNA tłumaczy się pełnym jej gaszeniem obserwowanym również w syntetycznych dwułańcuchowych polimerach poli dG:dC i rG:rC (90, 91, 92, 93).

II. Typowe reakcje fotochemiczne elementów budowy kwasów nukleinowych

Ze względu na złożoną budowę kwasów nukleinowych, wyjaśnienie charakteru fotochemicznych procesów inicjowanych w nich przez promieniowanie nadfioletowe uzależnione jest od postępu prac nad fotochemicznymi właściwościami ich elementów budowy.

Puryny w porównaniu do pirymidyn cechują się znaczną odpornością na fotochemiczne działanie promieniowania nadfioletowego. Wydajności kwantowe wynoszą dla fotolizy adeniny i guaniny odpowiednio $6 \cdot 10^{-5}$ i $2 \cdot 10^{-5}$ M/E, a dla reakcji fotochemicznych zasad pirymidynowych są około dwa rzędy wyższe (115, 116). Na podstawie dużej wrażliwości funkcji kwasów nukleinowych *in vivo* na działanie UV (58, 89, 101, 105, 106) za najbardziej prawdopodobną przyczynę biologicznych skutków tego promieniowania uznano fotochemiczne uszkodzenia pirymidyn.

Fotochemiczna reaktywność tyminy, uracylu i cytozyny związana jest z nienasyconym wiązaniem pomiędzy węglami 5 i 6 pierścienia, skłonnym do różnego typu nukleofilnych addycji w stanie podstawowym i wzbudzonym cząsteczek. Pod tym względem keto i keto-amino podstawione pirymidyny przypominają nienasycone łańcuchowe i cykliczne związki węglowe takie jak α , β -nienasycone ketony czy cykloalkeny (23).

Typowymi reakcjami fotochemicznymi w roztworach wodnych tak wolnych zasad jak i polinukleotydów są reakcje addycji wody oraz dimeuryzacji. Poza tym fotoaddycji do wiązania $C_5 = C_6$ ulegają cząsteczki alkoholi R.OH (48, 82, 116, 149, 151, 153), cysteiny (123), HCN (79) oraz ulega ono fotoredukcji w obecności BH_4^- (2, 24).

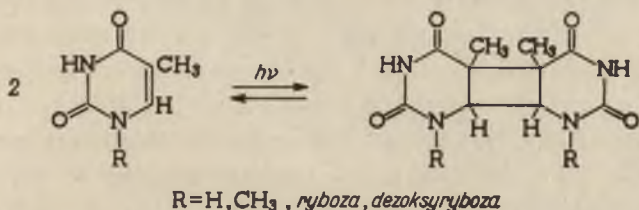
1. Tymina

Typową przemianą fotochemiczną tyminy jest zaobserwowana po raz pierwszy przez Beukers'a i Berends'a (9, 10) w zamrożonych roztworach wodnych fotochemicznie odwracalna reakcja dimeryzacji.

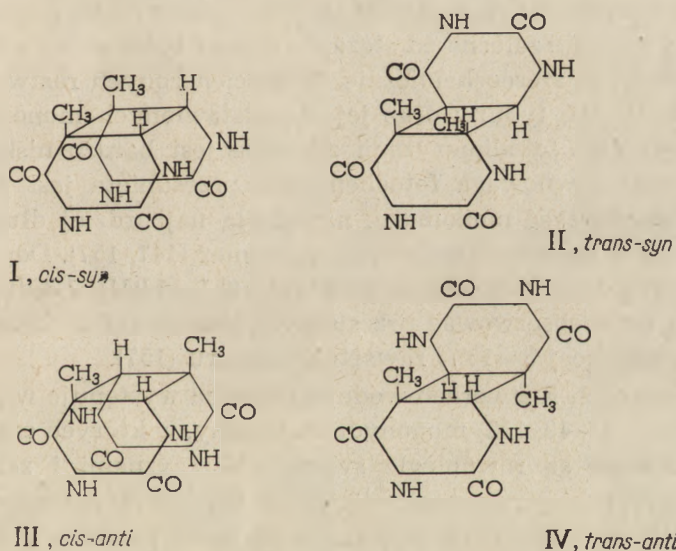
Cyklobutanowa struktura fotodimeru tyminy udowodniona została (10, 166) metodami fizykochemicznymi oraz poprzez chemiczną odbudowę (12, 13). Dimer tyminy może występować w czterech stereochemicz-

nych postaciach (166). Wszystkie te stereoisomery zostały wyizolowane, a ich struktura pośrednio (156, 166), a w przypadku izomeru *cis-syn* bezpośrednio, udowodniona przez chemiczną odbudowę (12, 13).

Przebieg reakcji fotodimeryzacji tyminy był przedmiotem szeregu prac poświęconych wolnej zasadzie (9, 10, 11, 69, 104, 135, 147, 151, 153, 159), jej *N*-metylowanym pochodnym (69, 126, 151, 153, 159, 166), tymidynie i kwasowi tymidylowemu (147, 151, 153), dwunukleotydom TpT, TpTp, TppT (30, 63, 64, 133, 146) oraz jedno-, dwu- i trójłańcuchowym



Schemat 1. Odwracalna reakcja dimeryzacji tyminy



Rys. 1. Izomeryczne formy dimeru tyminy (153, 166).

polinukleotydom poli-T, poli rT, poli dAT i poli A:2rT (30, 111, 140). Dimeryzację reszt tyminy w DNA *in vitro* oraz *in vivo* stwierdzono (10, 143) niemal równocześnie z jej odkryciem.

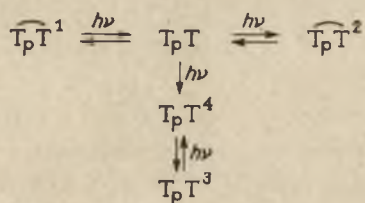
Fotocchemiczna odwracalność fotodimeryzacji tyminy prowadzi do stanu pozornej równowagi, zależnej od długości fali promieniowania i wzajemnego usytuowania cząsteczek tyminy (lub jej pochodnej) w środowisku. Pozorność równowagi jest skutkiem ubocznych reakcji fotocchemicznych (1, 63, 86, 140, 154). Zależność jej od długości fali jest wy-

nikiem zmieniającego się w funkcji długości fali stosunku ekstynkcji pasm absorpcyjnych monomeru i dimeru. Tymina na przykład, posiada długofalowe pasmo absorpcji o maksimum przy $264 \text{ m}\mu$ i ekstynkcji molowej 7890, natomiast odpowiednie pasmo dimeru wobec braku sprzężonego układu wiązań podwójnych jest silnie przesunięte w kierunku fal krótszych ($\lambda_{\text{max}} < 220 \text{ m}\mu$). W rezultacie ekstynkcja dimeru w maksimum absorpcji monomeru jest o około dwa rzędy niższa (104) i promieniowanie długofalowe przesuwają równowagę w kierunku dimeryzacji, a bardziej krótkofalowe — w kierunku fotodysocjacji. Na położenie równowagi fotochemicznej przy danej długości fali wpływa również stosunek wydajności kwantowych reakcji dysocjacji i dimeryzacji. Fotodysocjacja dimerów jako proces wewnątrzcząsteczkowy nie zależy od stężenia dimeru i jej wydajność kwantowa ($\Phi \sim 1$) jest bliska teoretycznej, zarówno dla wolnych dimerów w roztworze jak i wewnątrz nukleotydowych dimerów w dwu- i polinukleotydach tyminy (30, 63, 104, 133, 135). W fazie stałej wydajność kwantowa dysocjacji dimerów tyminy i 1,3-dwumetylotyminy jest około dwukrotnie wyższa od teoretycznej (69), co wskazuje na migrację energii wzbudzenia. Fotodimeryzacja natomiast, jako proces dwucząsteczkowy jest silnie zależna od stężenia i czasu życia stanu wzbudzonego oraz kontrolowana stereochemicznie. W rozcieńczonych roztworach wodnych, 10^{-5} — 10^{-2} M , tyminy oraz jej *N*-podstawionych monomerów wydajność kwantowa fotodimeryzacji zapewne jest bardzo niska ($\Phi \sim 10^{-3} \text{ M/E}$) ponieważ równowaga fotochemiczna przesunięta jest praktycznie całkowicie na korzyść monomeru, nawet dla najbardziej długofalowego promieniowania absorbowanego przez monomer (147, 157). Dopiero w stosunkowo stężonych roztworach wodnych (0,1—1,0M) 1,3-dwumetylotyminy udało się zaobserwować przesunięcie równowagi w stronę dimeryzacji odpowiadającej 5—15% zawartości dimeru (157).

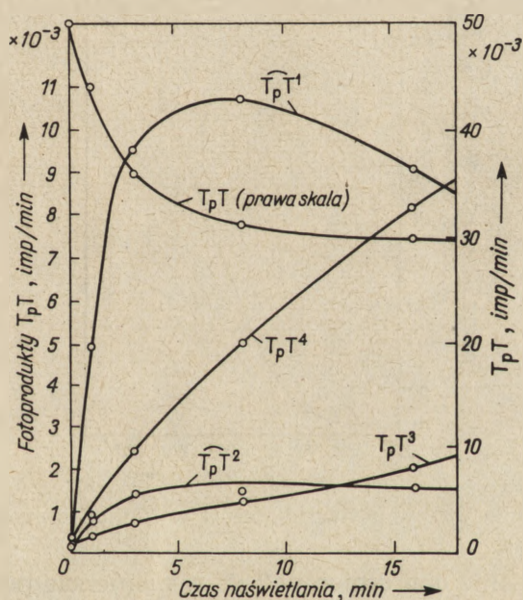
W zamrożonych roztworach wodnych tymina występuje w postaci mikrokryształów (48, 49, 152) monohydratu tyminy, w których cząsteczki tyminy upakowane są równolegle swymi płaszczyznami i zorientowane w sposób sprzyjający powstaniu dimeru o konfiguracji *cis-syn* (49, 152, 153). W tych warunkach oszacowana wydajność kwantowa dimeryzacji jest bliska teoretycznej wartości ($\Phi = 2$). Równowaga fotochemiczna reakcji dzięki wysokiej wartości Φ przesunięta jest nawet dla stosunkowo krótkich fal $253,7 \text{ m}\mu$ powyżej 50% na korzyść dimeru (120, 135, 151). Podobnie przebiegają procesy fotochemiczne w kryształach 1- i 1,3-dwumetylotyminy. Budowa tych kryształów zależna w dużej mierze od tendencji cząsteczek do układania się równolegle płaszczyznami determinuje zarówno stereochemiczną budowę fotoproduktu jak i wysoką wydajność kwantową dimeryzacji (69, 126, 159).

Wzajemne usytuowanie reszt tyminy w oligonukleotydach i jednołańcuchowych polinukleotydach można traktować jako pośrednie pomiędzy

stężonym roztworem wolnej zasady, w którym obserwuje się już tendencję do warstwowej asocjacji (141), a fazą krystaliczną. Bliskie sąsiedztwo (rzędu 3,5 Å) reszt tyminy wzdłuż łańcucha polimeru sprzyja ich warstwowej asocjacji pod wpływem sił hydrofobowych (38, 118), przy zachowaniu ograniczonej swobody wzajemnej orientacji poprzez obrót wokół wiązania nukleozydowego. W rezultacie w wodnych roztworach dwunukleotydów i jednołańcuchowych polinukleotydów tyminy obserwuje się wyraź-



Schemat 2. Reakcje fotochemiczne dwunukleotydów tyminy

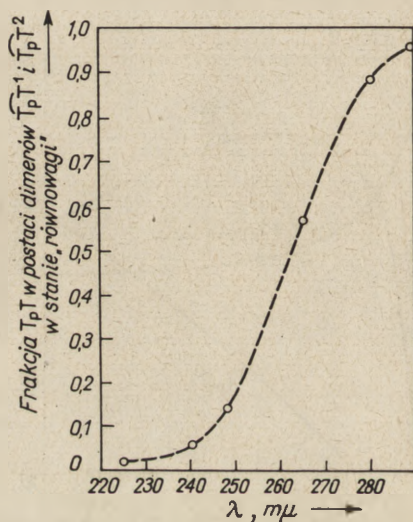


Rys. 2. Zanik $[^{32}P]$ -TpT i powstawanie fotoproduktów w funkcji dawki promieniowania 254 m μ . Natężenie wiązki 0.3 $\mu E \cdot cm^{-2} \cdot min^{-1}$, roztwór wodny (63).

nie wewnątrzcząsteczkową fotodimeryzację reszt tyminy prowadzącą do powstania przynajmniej dwu różnych stereoizomerycznych dimerów i przebiegającą z początkową wydajnością kwantową $\Phi \sim 10^{-2}$ M/E.

Szczególnie dokładnie opracowany został przebieg procesów fotochemicznych w dwunukleotydach tyminy. Zastosowanie chromatograficznego rozdzielania i ilościowego oznaczania poszczególnych fotoproduktów znaczących ^{32}P (63) pozwoliło określić prawdopodobieństwa powstawania pod-

stawowych stereoisomerów dimeru dwunukleotydu oraz uwzględnić uboczne procesy fotochemiczne. W oparciu o krzywe (rysunek 2) narastania poszczególnych fotoproduktów w czasie naświetlania roztworu promieniowaniem 253,7 m μ zaproponowano schemat reakcji (schemat 2). Wewnątrzcząsteczkowa dimeryzacja reszt tyminy stanowiąca główny proces fotochemiczny zwłaszcza w początkowej fazie reakcji, prowadzi do powstania dwu dimerów. Pierwszy z nich TpT¹ powstający z pięciokrotnie większą szybkością okazał się (156) stereoisomerem *cis-syn*, a drugi TpT², *trans-syn*. Wskazuje to na poważne zahamowanie obrotu reszt tyminy wokół wiązań nukleozydowych i preferencję równoległego i symetrycznego ich ułożenia, odpowiadającego konfiguracji *cis-syn*. Maksymalne stężenie oba dimery osiągają równocześnie i ten moment odpowiada pozornej równowadze fotochemicznej, zakłóconej przez tworzenie się bezpośrednio z TpT trzeciego fotoproduktu TpT⁴.



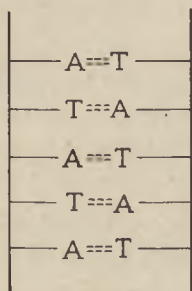
Rys. 3. Frakcja TpT w postaci dimerów w funkcji długości fali (63).

Względne stężenie obu dimerów TpT w momencie pozornej równowagi silnie zależy od długości fali stosowanego promieniowania (rysunek 3). Czwarty fotoprodukt, TpT³, powstaje w wyniku wtórnej reakcji fotochemicznej TpT⁴. Budowa obu fotoproduktów nie jest jeszcze ustalona. Ponieważ jednak TpT³ przekształca się odwracalnie w TpT⁴ J o h n s ze wsp. (62, 86) określa TpT³ jako innego typu wewnątrzcząsteczkowy dimer TpT⁴.

W beładnie zwiniętych łańcuchach poli dT i poli rT wzbudzona reszta tyminy sąsiaduje z obu stron ze zdolnymi do dimeryzacji resztami, w rezultacie czego prawdopodobieństwo zajścia reakcji zwiększone jest w przybliżeniu dwukrotnie w porównaniu z TpT (30, 140). Z chwilą, gdy polinukleotyd przyjmuje strukturę uporządkowaną, szybkość dimeryzacji

rośnie. Wskazują na to wyniki doświadczeń (40) z poli rT, który w temperaturze pokojowej przy odpowiedniej sile jonowej ma uporządkowaną strukturę typu podwójnego heliksu stabilizowanego przez kooperatywne oddziaływanie pomiędzy resztami tyminy (131). Początkowa wydajność kwantowa dimeryzacji dla promieniowania $253,7 \text{ m}\mu$ wynosi $2,12 \times 10^{-2} \text{ M/E}$ i szybko spada w miarę postępu reakcji. Pojawienie się dimerów destabilizuje strukturę, co przejawia się również w stopniowym obniżaniu się temperatury kooperatywnego przejścia od formy uporządkowanej do bezładnie zwiniętego łańcucha. Dimeryzacja zaledwie około 20% reszt tyminy w poli rT uniemożliwia przyjęcie uporządkowanej struktury. Dimeryzacja jest jednak dominującym procesem tylko przy naświetlaniu polimeru promieniowaniem długofalowym $\lambda \geq 275 \text{ m}\mu$. Promieniowanie $253,7 \text{ m}\mu$ obok dimeryzacji prowadzi do powstania jeszcze innego, nieznanego fotoproduktu, być może identycznego z TpT⁴ (62, 86).

W dwułańcuchowych kompleksach poli dAT oraz poli A:2rT, w których reszty tyminy tworzą wodorowo związane pary z resztami adeniny, fotodimeryzacja tyminy bądź praktycznie zupełnie nie zachodzi jak w poli dAT (30), bądź też początkowa jej szybkość jest poważnie obniżona (140) nawet w stosunku do TpT. W poli dAT, (schemat budowy patrz rysunek 4), brak sąsiadujących ze sobą w tym samym łańcuchu



Rys. 4. Schemat budowy poli dAT

reszt tyminy, natomiast najbliższej siebie leżące reszty w przeciwległych łańcuchach nie są zdolne do dimeryzacji (powstawałyby tutaj dimery *trans-anti*) ze względów sterycznych. W trójłańcuchowym kompleksie poli A:2rT początkowa wydajność kwantowa dimeryzacji dla promieniowania $\lambda = 275 \text{ m}\mu$ jest w porównaniu z uporządkowaną formą poli rT o około dwa rzędy niższa. Wskazuje to najprawdopodobniej na sztywność całej struktury potrójnego kompleksu utrudniającą niekorzystnie stereochemicznie usytuowanym względem siebie resztom tyminy utworzenie dimeru. Poza tym, niska wydajność kwantowa fluorescencji w dwu- i trójłańcuchowych polinukleotydach (36, 93) wskazuje, że w tego typu strukturze usieciowanej poprzecznie wiązaniami wodorowymi znacznie

większe jest prawdopodobieństwo bezpromienistej degradacji energii wzbudzenia co obniża populację reaktywnego stanu wzbudzonego.

Promieniowanie 253,7 m μ wywołuje w poli A:2rT podobnie jak i w poli rT obok dimeryzacji jeszcze inną reakcję fotochemiczną (140). Reakcja ta nie jest w takim samym stopniu stereochemicznie uwarunkowana jak reakcja dimeryzacji, ponieważ dysocjacja kompleksu wywołana nagromadzeniem się fotoproduktów obserwowana jest w tym przypadku bez początkowego opóźnienia charakterystycznego dla działania bardziej długofalowego promieniowania. Reakcja ta najwidoczniej poprzedza dimeryzację i przyspiesza ją wywołując lokalne denaturacje, w obrębie których reszty tyminy mogą dzięki ruchom cieplnym uzyskać właściwe ułożenie przestrzenne.

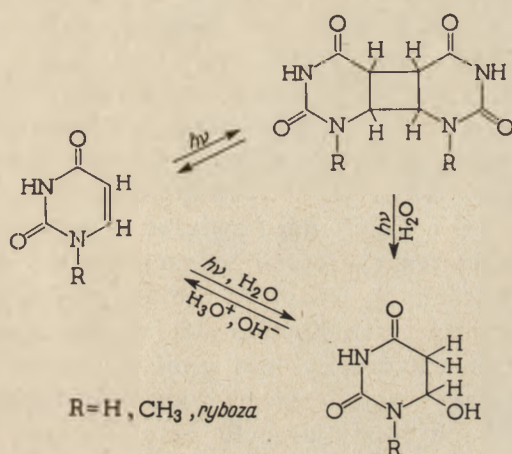
Dotychczas nie wyjaśniono, w którym z najniższych wzbudzonych stanów elektronowych S_{π,π^*} czy T_{π,π^*} cząsteczka tyminy jest zdolna do utworzenia dimeru z cząsteczką tyminy w podstawowym stanie elektronowym. M a n t i o n e i P u l l m a n (73) oraz ostatnio D a n i ł o w (29) sugerują w oparciu o kwantowo-mechaniczne obliczenie rozkładu gęstości elektronowej w stanach S^0 , S^1_{π,π^*} i T^1_{π,π^*} tyminy, że reaktywnym stanem jest najprawdopodobniej stan tripletowy cechujący się lokalizacją wzbudzenia na etylenowym wiązaniu 5,6.

Jony Br^- , J^- oraz tlen cząsteczkowy deaktywujące stany tripletowe nie wpływają na dimeryzację TpT (70, 133), jakkolwiek hamują silnie dimeryzację innej 2,4-dwuketopirymidyny, kwasu orotowego (14, 70, 132, 134). Kwas orotowy dimeryzuje jednak w odróżnieniu od tyminy w rozcieńczonych roztworach wodnych ($10^{-4}M$) z wydajnością kwantową rzędu 10^{-1} M/E. Czas życia reaktywnego stanu wzbudzonego $\tau = 1,4$ μ sek., wskazuje na jego tripletowy charakter (14, 134). Jeżeli więc dimeryzacja TpT przebiega z udziałem stanu tripletowego, stała szybkości tej reakcji musi być przynajmniej o dwa rzędy większa od stałej szybkości dyfuzyjnie kontrolowanego procesu gaszenia tripletu przez O_2 , Br^- czy J^- . Wyniki wstępnych doświadczeń nad uczulaną przez aceton fotodimeryzacją 1,3-dwumetylotyminy (40, 70), w której energia wzbudzenia wymieniana jest pomiędzy stanami tripletowymi cząsteczek dowodzą, że dimeryzacja pochodnych tyminy w tych warunkach przebiega poprzez stan tripletowy. Mechanizm dimeryzacji reszt tyminy w łańcuchach polinukleotydowych może być jednak inny niż dla cząsteczek monomerów w roztworze. Emisja fluorescencji w TpT i polinukleotydach zawierających tyminę ma miejsce najprawdopodobniej ze stanu ekscimerowego (38). Nie jest więc wykluczone, że jedna z dróg bezpromienistej deaktywacji wzbudzonego dimeru jakim jest ekscimer, prowadzi do trwałego w stanie podstawowym cyklobutanowego dimeru tyminy. Również sugerowane przez R a h n' a i w s p. (91, 92) przeniesienie protonu z tyminy na adeninę z utworzeniem anionu tyminy powinno wpływać na przebieg

reakcji fotochemicznej. Anion nukleozydowo związanej reszty tyminy w stanie wzbudzonym może najprawdopodobniej ulegać dimeryzacji na co wskazuje zdolność do fotoaddycji cząsteczek wody anionu 1-metylo-uracylu (43).

2. Uracyl

Uracyl, jego *N*-podstawione pochodne oraz reszty uracylu w polinukleotydach ulegają w roztworach wodnych dwu podstawowym fotochemicznym reakcjom: dimeryzacji oraz addycji wody do wiązania 5,6 pierścienia (21, 115, 122).



Schemat 3. Reakcja fotodimeryzacji i fotohydratacji uracylu

Struktura obu typów pochodnych została udowodniona bezpośrednimi metodami. Dimery uracylu mają cyklobutanową budowę podobnie jak i dimery tyminy (33). Produktami fotoaddycji wody są 5,6-dwuhydro-6-hydroksy pochodne (78, 81, 148). Dimery są związkami chemicznie trwałymi (135) i tylko niektóre stereoizomery przypuszczalnie ulegają rozkładowi w środowisku alkalicznym (18) podobnie jak 5,6-dwuhydro pochodne 2,4-dwuketopirymidyn. 5,6-dwuhydro-6-hydroksy pochodne uracylowe są natomiast związkami stosunkowo nietrwałymi i w ciemnej katalizowanej kwaso-zasadowo reakcji tracą odwracalnie cząsteczkę wody (78, 81, 82, 115, 148, 164). Stała szybkość reakcji eliminacji wody oraz wpływ *pH* zależą od charakteru podstawnika na N₁ (44, 71, 82), a dla reszt uracylowych w polinukleotydach od długości łańcucha (71). Obliczony $t_{1/2}$ reakcji w 37° przy *pH* 7, waha się w granicach od około 20 do 200 godzin w zależności od tego czy reszta uracylowa znajduje się w nukleozydzie, w którymś z mononukleotydów czy w wysokocząsteczkowym poli U. Zatem w warunkach fizjologicznych fotohydratowane pochodne

uracylu są trwałe w okresie cyklu rozwojowego komórek drobnoustrojów.

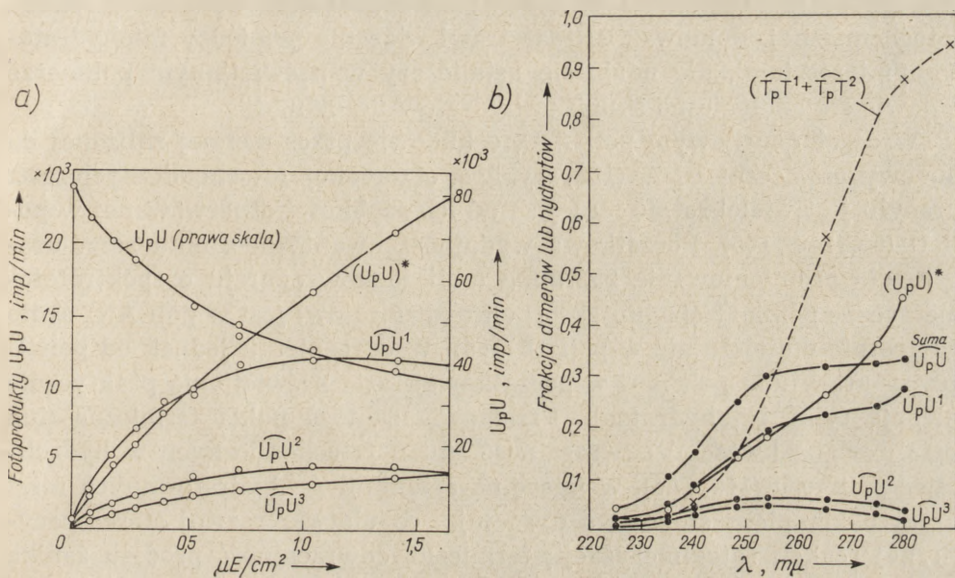
Fotochemiczne właściwości uracylu w reakcji dimeryzacji są bardzo zbliżone do szeroko omówionych już właściwości jego 5-metylowej pochodnej, tyminy. Równowaga fotochemiczna tej reakcji przesunięta jest wyraźnie na korzyść dimerów tylko w zamrożonych wodnych roztworach monomerycznych pochodnych (120, 135, 145, 151, 153) albo w łańcuchach oligo- i polinukleotydów (18, 87, 129, 162). W niezamrożonych roztworach wodnych monomerów tylko w pierwszej fazie reakcji względna ilość dimerów odpowiadająca ich quasi-stacjonarnemu 2–5% stężeniu jest większa od ilości fotohydratów; pod koniec reakcji te ostatnie stanowią ponad 95% fotoproduktów (81, 115, 144, 162). Wydajność kwantowa addycji wody jest funkcją stężenia naświetlonego związku (162). W roztworach rozcieńczonych rzędu 10^{-5} M $\Phi=0,01-0,02$ M/E, w bardziej stężonych roztworach rzędu 10^{-2} M osiąga ona w przypadku urydyny początkową wartość 0,04 M/E i maleje w miarę przebiegu reakcji. Ta zależność jest prawdopodobnie wynikiem addycji wody również do fotodysocjujących cząsteczek dimerów, których quasi-stacjonarne stężenie rośnie wraz ze stężeniem naświetlanego związku (115, 135).

W polinukleotydach reakcja fotodimeryzacji znacznie skuteczniej konkuruje z reakcją fotoaddycji wody. W początkowej fazie naświetlania, w zakresie niewielkich pochłoniętych dawek, względne stężenie dimerów jest większe od stężenia hydratów, lecz w miarę przedłużania ekspozycji stężenie hydratów stale rośnie, częściowo kosztem dimerów, tak że pod koniec fotohydratowane reszty uracylu są głównym produktem przemiany.

Zależności te ostatnio ponownie przebadano identyfikując rozdzielone chromatograficznie fotoprodukty znaczonych ^{32}P dwunukleotydów UpU (18), dUpU (58) oraz dla poli U (87). Wśród fotoproduktów UpU znaleziono trzy izomeryczne wewnątrzcząsteczkowe dimery oznaczone $\overline{\text{UpU}}^1$, $\overline{\text{UpU}}^2$ i $\overline{\text{UpU}}^3$, natomiast rozdział monohidratów od dwuhidratów był niepełny. Obie frakcje hydratów wydzielono z fotoproduktów dUpU. Krzywe narastania poszczególnych fotoproduktów UpU w funkcji dawki promieniowania 248 mμ (rysunek 5a) dają sumaryczny obraz przemiany zgodny z wcześniejszymi obserwacjami (129, 162) opartymi wyłącznie na pomiarach spektrofotometrycznych i termicznej odwracalności fotohydratacji. Dimer $\overline{\text{UpU}}^1$, powstający około sześciokrotnie szybciej od pozostałych izomerów, odpowiada najprawdopodobniej swą budową *cis-syn* dimerowi TpT¹ (156). Warto zaznaczyć, że pomiary dyspersji rotacji optycznej (ORD) dla UpU (155) nie wskazują na warstwowe ułożenie reszt uracylu w tym dwunukleotydzie.

Maksymalna ilość dimerów w stanie quasi-równowagi fotochemicznej jest funkcją długości fali (rysunek 5b). Stosunek pomiędzy ilością utwo-

rzonych dimerów i hydratów zmienia się zatem również w funkcji długości fali. Ponieważ wydajność kwantowa fotohydratacji rośnie wraz z długością fali (62), promieniowanie długofalowe sprzyja fotohydratacji, a krótkofalowe dimeryzacji, jakkolwiek w tym ostatnim przypadku maksymalna ilość dimerów jest kilkakrotnie mniejsza niż dla promieniowania długofalowego (rysunek 5b).



Rys. 5a. Zanik ^{32}P -UpU i powstawanie fotoproduktów w funkcji dawki promieniowania 248 m μ , bufor: winian potasu, 0.005 M pH 4.5 (18).

Rys. 5b. Maksymalna frakcja UpU w postaci dimerów oraz frakcja UpU w postaci hydratów $(U_pU)^*$ (w momencie gdy frakcja $\widehat{U_pU}^1$ osiąga 90% maksymalnej wartości) w funkcji długości fali promieniowania (18). Maksymalna ilość dimerów $\widehat{T_pT}$ wg. (63).

W poli U wydajności kwantowe reakcji hydratacji i dimeryzacji w całym zakresie spektralnym pokrywającym się z długofalowym pasmem absorpcji uracylu są takie same jak w przypadku UpU (87). Z enzymatycznych hydrolizatów polimeru wyodrębniono tylko dwa stereoisomeryczne dimery $\widehat{U_pU}^1$ i $\widehat{U_pU}^3$. Chromatograficzny rozdział i identyfikacja produktów rozkładu naświetlonego polimeru RN-azą ujawniły różne od statystycznego rozmieszczenie dimerów wzdłuż łańcucha. RN-aza nie atakuje wiązań fosfodwuestrowych pomiędzy zdimeryzowanymi resztami pirymidynowymi (60, 84, 168). W produktach hydrolizy naświetlonego polimeru znaleziono zatem trójnukleotydy o budowie $\widehat{U_pU}^1\widehat{U_pU}^1$, $\widehat{U_pU}^1\widehat{U_pU}^3$ $\cdot \text{H}_2\text{O}$ oraz wyższe oligomery o budowie $(\widehat{U_pU})_n\text{Xp}$, gdzie $n \geq 2$, a $\text{Xp} = \text{Up}$; $\text{Up} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (84, 87). Początkowa szybkość pojawiania się fragmentów zawierających sąsiadujące dimery, bez wstępnego okresu indukcji, ocze-

kiwanego w przypadku statystycznego rozkładu fotoproduktów, wskazywałaby na zbiorowy, ekscytonowy charakter wzbudzenia reszt uracylowych połączony z przeniesieniem energii wzdłuż łańcucha polimeru. Fala pobudzenia nie jest w stanie przekroczyć zdimeryzowanych reszt uracylowych ze względu na niearomatyczny, nasycony ich charakter. W miejscu „odbicia się” na dimerze fali pobudzenia dochodzi do degradacji energii fotochemicznej, co zwiększa prawdopodobieństwo zajścia reakcji fotochemicznej. Ponieważ RN-aza trawi wiązania pomiędzy fotohydratowanymi resztami, nie udało się ustalić czy w naświetlonym polimerze pojawiają się analogiczne skupiska hydratów uracylu.

W dwułańcuchowym poli A:U, o budowie przestrzennej zbliżonej do budowy cząsteczki DNA (125) szybkość obu reakcji fotochemicznych reszt uracylu jest wielokrotnie mniejsza od ich szybkości obserwowanej w poli U (85, 140, 165). Początkowa wydajność kwantowa zaniku reszt uracylu dla promieniowania 253,7 m μ (obliczona w oparciu o spektrofotometryczne pomiary spadku absorpcji hydrolizatów) jest w poli A:U około 20-krotnie mniejsza niż w poli U (165). W odróżnieniu jednak od poli U reszty uracylu w poli A:U w początkowej fazie naświetlania praktycznie ulegają tylko fotohydratacji. Przemawia za tym pełna termiczna (lub katalizowana kwasem) odwracalność zmian fotochemicznych w hydrolizacji polimeru (140, 165). W miarę narastania ilości hydratowanych reszt uracylu kompleks stopniowo dysocjuje, co ułatwia rozwój stereospecyficznej reakcji fotodimeryzacji; termiczna odwracalność procesu zanika dopiero po uwodnieniu około 20% reszt uracylu. Obecność fotohydratów w kompleksie w mniejszym stopniu destabilizuje jego strukturę drugorzędową niż obecność dimerów, które trwale deformują łańcuch główny polimeru. Przy porównywalnej ilości fototransformowanych reszt U w poli A:U i T w poli A:2rT rzędu około 20% temperatura przejścia kooperatywnego do formy nieuporządkowanej pierwszego kompleksu obniża się tylko o około 4°C, podczas gdy drugi praktycznie jest już całkowicie zdenaturowany. Kompletnie fototransformowany poli U (85% reszt U hydratowanych, 15% dimerów) nie tworzy jednak kompleksu z poli A (140) podobnie jak i 5,6-dwuhydro-poli U otrzymany przez fotoredukcję poli U w obecności BH $_4^-$ (25).

Nieco inne wyniki doświadczeń nad fotolizą poli A:U pod wpływem promieniowania 280 m μ oraz wprost przeciwstawną ich interpretację podali ostatnio Pearson i Johns (85). Śledzili oni przebieg reakcji fotochemicznych rozkładając RN-azą znakowany polimer ^{32}P , i oznaczając uwalniające się nukleotydy UpUp $\cdot\text{H}_2\text{O}$ UpUpUp i UpUpUp $\cdot\text{H}_2\text{O}$ stwierdzili, że początkowa szybkość uwodnienia jest około 10-krotnie, a dimeryzacji około 5-krotnie mniejsza niż w poli U. W oparciu o te obserwacje oraz o kinetyczną analizę danych doświadczalnych, polegającą na przybliżonym rozwiązywaniu układu równań różniczkowych, doszli oni do

wniosku, że fotohydratacja zachodzi łatwiej w pobliżu utworzonego dimeru, wobec czego dimeryzacja powoduje lokalne denaturacje i rozwój fotohydratacji. Wniosek ten jednak nie budzi zaufania, ponieważ autorzy w obliczeniach szybkości obu reakcji nie uwzględnili około 40% fotoproduktów zawartych w wyższych oligonukleotydach hydrolizatu oraz ze względu na arbitralność doboru wartości przekrojów czynnych (proporcjonalnych do wydajności kwantowej) dla obu reakcji w różnych jej fazach.

Obniżeniu wydajności kwantowej obu reakcji fotochemicznych reszty uracylu w poli A:U towarzyszy obniżenie wydajności fluorescencji tego polimeru, co wskazuje, że w sztywnej strukturze kompleksu rośnie skuteczność bezpromienistych procesów degradacji energii. Przepuszczalnie ma w tym też swój udział postulowane przeniesienie (52) energii wzbudzenia od reszty uracylowej do adeniny, na co wskazuje też obniżona w ApU w porównaniu z Up wydajność kwantowa hydratacji reszty uracylowej (165). Natomiast większe względne prawdopodobieństwo reakcji addycji wody do reszt uracylu niż ich dimeryzacji niewątpliwie wynika ze sztywności struktury. Obrócenie sąsiadujących reszt uracylu względem siebie o kąt około 30° stanowi przestrzenną zawadę dla dimeryzacji, natomiast wysunięte ku zewnętrznej powierzchni polimeru wiązania 5,6 mogą reagować z wodą warstwy solwatacyjnej.

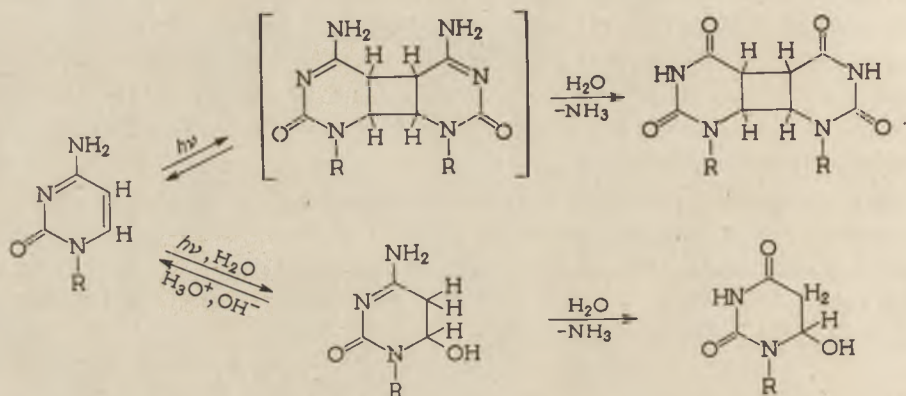
3. Cytosyna

Nietrwałość powstających w roztworach wodnych fotoproduktów cytozyny i jej pochodnych uniemożliwia ich wyizolowanie i bezpośrednią identyfikację. Nie mniej badania przebiegu reakcji fotochemicznych oraz właściwości fotoproduktów cytozyny (41, 80, 142, 160, 164), jej N_1 - i N^6 -metylowanych pochodnych (44) cytydyny i dezoksycytydyny (41, 160, 164), kwasów cytydylowych (41, 61, 99, 119, 160), dwu- i trójnukleotydów cytozyny (46, 163, 165) oraz kwasu polirybozocytydylowego (83, 111, 163, 165) dowodzą pośrednio, że fotochemiczne reakcje obserwowane w roztworach wodnych związków uracylowych — uwodnienie i dimeryzacja — są również charakterystyczne dla pierścienia cytozyny. Reakcja dimeryzacji cytozyny została dopiero niedawno odkryta (46, 111) i jest mało zbadana.

Fotohydraty cytozyny i jej pochodnych podobnie jak i 5,6-dwuhydro-pochodne charakteryzują się mocnym pasmem absorpcji ($\epsilon_M \sim 13$ — $14\ 000$) z maksimum położonym około $240\ m\mu$ (61, 119, 160, 164), a widma dimerów cytozyny jako związków z nasyconym wiązaniem 5,6 są niewątpliwie zbliżone (109). W rezultacie stosunek współczynników molarnej ekstynkcji monomeru ($\lambda_{max} \sim 270\ m\mu$, $\epsilon_M \sim 9\ 000$) i dimeru, decydujący o położeniu równowagi fotochemicznej, $C, C \xrightleftharpoons{h\nu} \overline{CC}$ dla danej dłu-

gości fali, maleje z długością fali, a wraz z nim i quasi-stacjonarne stężenie dimerów znacznie szybciej niż w przypadku tyminy i uracylu. Ta charakterystyczna zmiana położenia równowagi fotochemicznej wraz z długością fali stanowi jedno z kryteriów dimeryzacji cytozyny w polinukleotydach (46, 109, 111).

Wydatność dimeryzacji cytozyny nawet w zamrożonych roztworach wodnych (142) i w polinukleotydach (46, 109, 111) jest niska, a utworzone dimery szybko ulegają dezaminacji do dimerów uracylu. Na podstawie ich obecności w produktach reakcji wnioskuje się o utworzeniu dimerów cytozynowych.



R = H, ryboza, dezoksyryboza

Schemat 4. Reakcja fotodimeryzacji i fotohydratacji cytozyny

Dominującymi końcowymi produktami fotochemicznej przemiany N_1 -nukleozydów i nukleotydów cytozyny oraz reszt cytozyny w dwu- i polinukleotydach w roztworach wodnych (85—95% wydajności) są ich fotohydraty. Wydajność kwantowa reakcji w przypadku monomerycznych pochodnych waha się w granicach od 2×10^{-3} M/E do 10^{-2} M/E. W polinukleotydach CpCp i poli-C wydajność kwantowa reakcji w porównaniu z jej wartością dla nukleotydów rybocytydyny obniżona jest średnio o 30—40% (163, 165). Fotohydraty pochodnych cytozyny są znacznie mniej trwałe od analogicznych fotohydratów związków uracylowych. W fizjologicznych warunkach pH i temperatury (pH 7,5; $37^\circ C$) okres półtrwania fotohydratu Cp wynosi około 50 minut, a fotohydratu Up około 4 dni. Pierwszorzędowe stałe szybkości reakcji eliminacji cząsteczki wody w porównywalnych warunkach, są dla 5,6-dwuhydro-6-hydroksy pochodnych cytozyny przynajmniej o dwa rzędy wyższe (pH 7 k_{20} 10^{-3} — 10^{-4} s^{-1}) od wartości dla fotohydratów pochodnych uracylowych (w maksimum trwałości fotoproduktu przy pH 5, k_{20} 10^{-6} s^{-1}). (61, 71). Stała szybkości reakcji eliminacji wody z fotoproduktów pochodnych

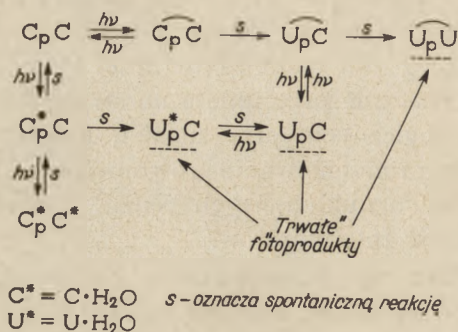
cytozynowych zależy od charakteru podstawników na N_1 , na azocie N_4 grupy egzo-aminowej, obecności grupy fosfoestrowej i położenia jej w pierścieniu rybozy względnie dezoksyrybozy w mono- (44, 164) i polinukleotydach (46, 163).

Znaczna szybkość ciemnej reakcji eliminacji wody przy naświetlaniu roztworów pochodnych cytozynowych wiązkami o natężeniu rzędu 10^{16} — 10^{17} kwantów/min/cm² prowadzi do ustalenia się quasi równowagi pomiędzy reakcjami addycji wody i jej eliminacji (164). W przypadku wolnej cytozyny wydajność kwantowa fotoaddycji jest bardzo niska $\Phi = 2 \times 10^{-3}$ M/E, a k_{20} dla reakcji odwrotnej wynosi 10^{-3} s⁻¹ i równowaga jest tylko nieznacznie przesunięta na stronę fotohydratu (30, 164). W warunkach fizjologicznych, przy niskich natężeniach wiązki czynnego fotochemicznie promieniowania, równowaga ta dla reszt cytozyny w naturalnych kwasach nukleinowych będzie w bardzo małym stopniu przesunięta na korzyść fotohydratów.

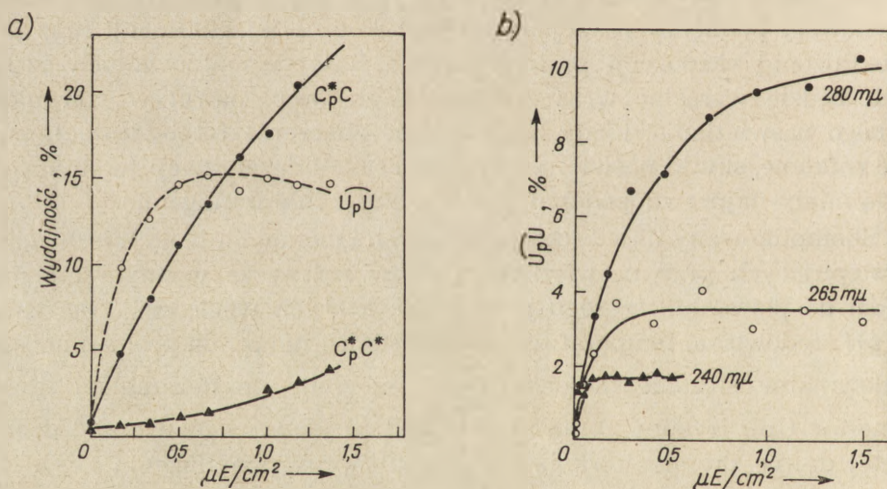
Równoległe z eliminacją wody z fotohydratów pochodnych cytozyny przebiega ich dezaminacja (99, 61). Powstający przez dezaminację fotohydratu Cp fotohydrat Up ulega z kolei dehydracji do kwasu urydylowego. Szybkość dezaminacji jest około dwa razy mniejsza od szybkości eliminacji wody tak, że maksymalna ilość dezaminowanych cząsteczek wynosi około 10% utworzonych fotohydratów. Jednak w warunkach równowagi pomiędzy reakcjami addycji wody i jej eliminacji oraz przy przedłużonej ekspozycji promieniowania ilość dezaminowanych cząsteczek będzie wzrastać wraz z dawką. Tak więc, nawet w warunkach słabego naświetlania, kiedy bezpośrednio znaczenie fotohydratacji może być znikome, skutki naświetlania dzięki reakcji dezaminacji fotohydratów będą miały najprawdopodobniej istotne znaczenie mutagenne.

Skomplikowany układ fotochemicznych i ciemnych reakcji (schemat 5) występujących przy naświetlaniu CpC w roztworze wodnym (46) prowadzi do powstania szeregu produktów, których względne ilości zależą od pH środowiska, temperatury, długości fali i natężenia promieniowania. Maksymalne stężenie dimerów CpC (mierzone po dezaminacji ilością dimerów UpU (rysunek 6) osiągnięte zostaje już przy niewielkiej pochłoniętej dawce promieniowania 280 mμ, ale przy przedłużeniu ekspozycji obniża się ono w wyniku przemiany dimerów w fotohydraty. To maksymalne stężenie dimerów CpC jest około dwukrotnie niższe od stężenia wszystkich dimerów UpU w UpU naświetlanym w analogicznych warunkach. Ponieważ położenie równowagi dimeryzacji znacznie silniej zależy od długości fali dla cytozyny niż dla tyminy czy uracylu, maksymalne stężenie dimerów CC w CpC przy 265 mμ wynosi już tylko około 3,5%, a przy 240 mμ poniżej 2% podczas gdy odpowiednie wartości dla dimerów UU w UpU (rysunek 5b) wynoszą około 30% i 15%.

Przebieg procesów fotochemicznych w poli C badano tylko z punktu widzenia fotohydratacji (83, 163, 165). Wstępnie wykazano, że w dwułańcuchowym kompleksie poli C:I wrażliwość wodorowo związanych reszt cytozyny na promieniowanie 253,7 mμ jest w porównaniu z resztami C w poli C około dwukrotnie niższa (165). Na podstawie zmian spektralnych wskazujących na nasycenie wiązania 5,6 cytozyny oraz ich częściowej odwracalności termicznej przyjęto, że fotohydratacja ma miejsce



Schemat 5. Reakcje fotochemiczne i ciemne CpC.



Rys. 6a. Wydajność powstawania $\widehat{\text{U}}_p\text{U}$ (jako procent przereagowanego CpC) oraz monohydratów C^*pC i dwuhydratów C^*pC^* z CpC w funkcji dawki promieniowania 280 mμ

bufor: mrówczan amonu, 0,003M pH 4,5, temp. 4°C. $\widehat{\text{U}}_p\text{U}$ wydzielano elektroforetycznie po 24 godz. stania fotolizatu w temp. pokojowej. C^*pC i C^*pC^* wydzielano natychmiast elektroforetycznie w temp. 4°C (46).

Rys. 6b. Wydajność powstawania U_pU wyrażona jako procent przereagowanego CpC naświetlanego 280, 265, 240 mμ,

bufor: mrówczan amonu, 0,002M pH 5,1, temp. 25°C (46)

również i w dwułańcuchowym kompleksie. Obecność fotoproduktów powoduje dysocjację kompleksu poli C:I podobnie jak kompleksów poli A:U i poli A:2rT.

Setlow i wsp. (111) badali skutki naświetlania kompleksu poli dC:dI niską dawką rzędu 10^4 — 10^5 ergów/mm² promieniowania 280 mμ. Powodowała ona około 6% spadek absorpcji przy 270 mμ oraz podobny przyrost przy 240 mμ związany z nasyeniem wiązania 5,6 około 8% reszt cytozyny. Zmiany te nie odwracalne spontanicznie w temperaturze pokojowej, można było częściowo odwrócić działaniem promieniowania 239 mμ. Na tej podstawie wykluczyli oni powstawanie mierzalnych ilości fotohydratacji w początkowej fazie naświetlania, przypisując zmiany spektralne obecności dimerów, a następnie pośrednio wykazali istnienie dimerów cytozyny, wyodrębniając dimery UU. Autorzy ci pominęli jednak w rozważaniach reakcję dezaminacji dimerów CC, która biegnąc zapewne równocześnie z odszczepianiem wody z fotohydratów C uniemożliwia odtworzenie drugorzędowej struktury kompleksu co miało stanowić kryterium obecności fotohydratów. Niewątpliwie konieczne są dalsze badania nad ustaleniem wydajności obu reakcji w dwułańcuchowych polinukleotydach w zakresie małych dawek promieniowania.

III. Fotochemiczne uszkodzenia kwasów nukleinowych

Wyniki badań nad syntetycznymi polinukleotydami dowodzą możliwości powstawania w cząsteczkach naturalnych kwasów nukleinowych zarówno dimerów jak i hydratów zasad pirymidynowych. Jednak wykrycie poszczególnych fotoproduktów w kwasach nukleinowych napotyka na duże trudności techniczne.

Dawki UV powodujące u drobnoustrojów: wzrost częstości mutacji, zahamowanie syntezy DNA czy ich inaktywację, zawarte są w granicach od 1 do 10^4 ergów/mm² (59, 101, 105, 106). W dwułańcuchowych polinukleotydach zaś pod wpływem dawki 10^4 erga/mm², ilość reszt pirymidynowych ulegających fotochemicznej reakcji nie przekracza 1%. Zmiany chemiczne i fizykochemiczne w naświetlanym DNA wykrywa się klasycznymi metodami dopiero po pochłonięciu dawki przynajmniej rzędu 10^4 — 10^5 erga/mm² (74, 167, 169), gdy zaczynają już występować objawy lokalnej denaturacji. Ponieważ bezwzględna szybkość poszczególnych reakcji fotochemicznych jak i stosunek szybkości reakcji dimeryzacji i uwodnienia zależy od stanu struktury drugorzędowej polimeru, niemożliwa jest ekstrapolacja wyników obserwowanych przy dużych dawkach do dawek małych. Dopiero wprowadzenie techniki znakowania w DNA reszt tyminy i cytozyny, względnie fosforu promieniotwórczymi izotopami umożliwiło oznaczanie dimerów pirymidynowych powstających pod wpływem dawek 10^3 — 10^4 erg/mm². Nierozwiązany pozostał jednak

problem wykrycia w DNA i RNA nietrwałych fotohydratów cytozyny. Część znacznie trwalszych hydratów uracylu można wydzielić z enzymatycznych hydrolizatów RNA (99). Ponieważ jednak żadna ze stosowanych do hydrolizy nukleaz nie atakuje wiązań fosfodwuestrowych pomiędzy dimerami lub resztami pirymidynowymi dimerów (60, 75, 84, 110, 168), pozostała część występuje w nie łatwo poddającej się rozdzielowi i identyfikacji frakcji wyższych oligonukleotydów. Z tych samych względów oznaczenia ilości dimerów pirymidynowych w hydrolizatach DNA również ogranicza się do dimerów występujących w trójnukleotydach $pXpPypPy$ (109), trójnukleotydy te stanowią jednak główny produkt rozkładu DNA naświetlonego małymi dawkami. Wreszcie istotną przeszkodę stanowi niejednorodność większości preparatów naturalnych kwasów nukleinowych oraz nieznaną ich sekwencji nukleotydowych.

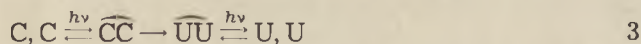
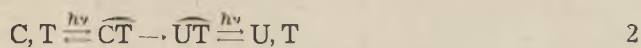
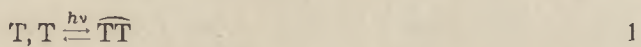
1. DNA

Stwierdzenie bezpośrednio po odkryciu dimeryzacji tyminy obecności dimerów \overline{TT} w DNA naświetlonym *in vitro* (10) i (143), a następnie wykazanie związku tej reakcji z inaktywacją transformującego DNA (95, 102, 113) skupiło uwagę przede wszystkim na jej skutkach biologicznych (101, 105, 106). Jednostronność spojrzenia, późne odkrycie reakcji dimeryzacji cytozyny, trudności metodyczne oraz nie wystarczające postępy doświadczeń z modelowymi polinukleotydami tłumaczą szczupłość informacji o procesach fotochemicznych w DNA (21, 115, 122, 142).

Blackburn i Davies (13) wyodrębnili z DNA *E. coli* naświetlonego dużą dawką promieniowania dwa stereoizomeryczne dimery tyminy w ilościach odpowiadających 2,0% i 0,6% całej zawartości tyminy i wykazali, że izomer występujący w większej ilości jest typu *cis-syn* (I, rysunek 1). Dimery tyminy w DNA powstają zatem zgodnie z oczekiwaniem przede wszystkim w wyniku dimeryzacji sąsiadujących ze sobą w tym samym łańcuchu reszt zasadowych. Drugi stereoizomer mógłby być według autorów produktem dimeryzacji reszt tyminy z przeciwnymi, komplementarnymi łańcuchów.

Setlow i wsp. (108, 113) obserwowali, że w różnych DNA, kilkuprocentowy spadek absorpcji roztworów wywołany promieniowaniem długofalowym (280 m μ), można było częściowo odwrócić promieniowaniem krótkofalowym (239 m μ) do poziomu zbliżonego do otrzymywanego pod wpływem porównywalnej dawki wyłącznie promieniowania krótkofalowego. Ponieważ wielkość odwracalnych zmian w różnych DNA korelowała się w przybliżeniu z częstotliwością sekwencji TT, obserwowane zmiany interpretowano wyłącznie jako wynik przesuwania równowagi fotochemicznej $T,T \xrightarrow{h\nu} \overline{TT}$. Wykazanie dimeryzacji cytozyny w CpC (46) i w poli dT:dC (111) oraz prawdopodobieństwo udziału fotoche-

micznej reakcji cytozyny w uszkodzeniach funkcji biologicznych DNA (101) stanowiły punkt wyjścia opublikowanych w 1966 roku doświadczeń Carrier'a i Setlow'a (109) nad ustaleniem rodzaju i ilości dimerów pirymidynowych indukowanych fotochemicznie w DNA. Znakowany promieniotwórczą tyminą i cytozyną DNA z naświetlanych bakterii poddali oni enzymatycznej hydrolizie i w otrzymanych trójnukleotydach $pXpPyPy$ stwierdzili wyłącznie dimery \overline{TT} oraz \overline{UT} i \overline{UU} powstające z hydrolitycznej dezaminacji \overline{CT} i \overline{CC} . Spontaniczna dezaminacja \overline{CT} i \overline{CC} jest wystarczająco powolna by do wykazania obecności obu dimerów wykorzystać także różną dla reszt dwuketopirymidyn (T i U) cytozyny zależność quasi-stacjonarnego stanu równowagi fotochemicznej $Py \xrightleftharpoons{h\nu} PyPy$ od długości fali i dawki promieniowania. Przy promieniowaniu 280 m μ stężenie dimerów \overline{CT} i \overline{CC} mierzone jako \overline{UT} i \overline{UU} osiąga szybko stan quasi-stacjonarny, podczas gdy natężenie dimerów \overline{TT} ciągle jeszcze wzrasta liniowo wraz z czasem ekspozycji. Początkowa szybkość dysocjacji pod wpływem promieniowania krótkofalowego (239 m μ) jest dla cytozyny pięciokrotnie wyższa niż dla \overline{TT} i \overline{UU} . Zgodnie z tym w DNA naświetlonym promieniowaniem długofalowym, a następnie ogrzanym w celu dezaminacji \overline{CT} i \overline{CC} i ponownie naświetlonym promieniowaniem krótkofalowym ilość dimerów \overline{UT} i \overline{UU} była większa niż w DNA nie poddanym ogrzaniu. Jednocześnie obserwowano zwiększoną ilość uracylu, powstającego w wyniku dysocjacji \overline{UT} i \overline{UU} . Procesy związane z fotodimeryzacją reszt pirymidynowych we fragmentach DNA zawierających dłuższe sekwencje zasad pirymidynowych $-(PypPyp)_n-$ gdzie $n \geq 2$ można zatem przedstawić następującym układem schematów reakcji:



Względne ilości różnych dimerów pirymidynowych w DNA zależą ponadto od składu nukleotydowego samego DNA i od częstotliwości występowania danej sekwencji nukleotydowej w DNA. Proporcjonalność ta nie zależy od dawki. Suma wszystkich dimerów pirymidynowych przypadających na jeden nukleotyd rośnie wraz ze wzrostem procentu molowego par AT w DNA. Zależności te dla DNA trzech różnych rodzajów bakterii zestawiono w tabelicy 1.

Z danych tych wynika, że ilości dimerów pirymidynowych w DNA naświetlonym dawkami w zakresie 10^3 — 10^4 erg/mm² są znikome. Na przykład, w DNA *E. coli* naświetlonym dawką 4×10^4 erg/mm² promieniowania 280 m μ na jednostkę ciężaru cząsteczkowego 10^6 daltona (około

Tablica 1*

DNA	%AT	Częstość występowania skwencji			Właściwości fotochemiczne					
		CC/N	CT + TC/N	TT/N	Długość fali stos. prom. (m μ)	Dawka (erg/mm ²)	PyPy/N	Procent względny dimeru		
								CC	CT	TT
<i>H. influenzae</i>	62	0,0037	0,106	0,125	265	2×10^3	0,27	5	24	71
<i>E. coli</i>	50	0,054	0,114	0,079	280	4×10^4	2,06	3	19	78
					265	2×10^3	0,20	7	34	59
<i>M. lysodei-cticus</i>	30	0,113	0,124	0,017	280	4×10^4	1,34	6	26	68
					265	2×10^3	0,14**	26	55	19
					280	4×10^4	0,69	23	50	27

* Kompilacja danych z pracy Setlow i Carrier (109)

** Wartość szacunkowa.

3000 nukleotydów) przypada wszystkiego około 30 dimerów: ~ 2 dimery \overline{CC} , ~ 8 dimerów \overline{CT} i ~ 20 \overline{TT} . Dla dawki promieniowania $265 \text{ m}\mu$ 2×10^3 erga na mm^2 ilość dimerów jest 5—6 razy mniejsza. Osłabienie termodynamicznej trwałości struktury drugorzędowej DNA przy tak niewielkiej ilości uszkodzeń fotochemicznych jest najprawdopodobniej za małe aby wystąpiły lokalne denaturacje zmieniając kinetykę reakcji fotochemicznych. Wobec tego usprawiedliwiona jest ekstrapolacja ilości dimerów od tych dawek do jeszcze mniejszych, rzędu 5—20 ergów/ mm^2 , powodujących pełne zahamowanie syntezy DNA w bakteriach *E. coli* B_s-1 . Przy założeniu, że dimery stanowią absolutny blok dla syntezy DNA po dawce 2 ergów/ mm^2 przeciętnie 1 dimer przypada na 200 μ długości DNA czyli koło 1/5 całej długości chromosomu bakteryjnego o ciężarze cząsteczkowym rzędu 10^9 daltona (105, 130).

Fotohydratację reszt cytozyny stwierdzono pośrednio tylko w zdenaturowanym DNA w oparciu o termicznie odwracalny przyrost absorpcji roztworu przy 240 $\text{m}\mu$ (108). O obecności fotohydratów w natywnym DNA naświetlonym dużą dawką promieniowania może świadczyć ciemna reakcja przywracająca częściowo wywołany przez promieniowanie spadek absorpcji roztworu (150). Przy daleko posuniętej fotolizie reszt pirymidynowych struktura drugorzędowa DNA jest jednak tak poważnie zdysocjowana, że warunki przebiegu procesów fotochemicznych są podobne jak w zdenaturowanym DNA. Setlow i Carrier (108) nie zauważyli spektrofotometrycznie ciemnej reakcji dehydracji reszt cytozyny w natywnym DNA naświetlonym niewielką dawką promieniowania, nie jest to jednak wystarczające kryterium, ponieważ obecność dimerów \overline{TT} i \overline{CC} oraz spontaniczna dezaminacja tych ostatnich mogą uniemożliwiać odtworzenie drugorzędowej struktury nawet po regeneracji fotohydratowanych reszt cytozynowych.

Wyjaśnienie czy fotohydratacja cytozyny w dwułańcuchowych strukturach konkuruje z fotodimeryzacją wymaga dalszych badań.

Doświadczenia z modelowymi kompleksami polinukleotydowymi pokazują, że w uporządkowanych, dwułańcuchowych strukturach typu DNA rozwój denaturacji pod wpływem promieniowania spowodowany jest dimeryzacją i hydratacją pirymidyn. Utworzenie dimeru trwale deformuje łańcuch uniemożliwiając przyjęcie prawidłowej helikoidalnej konformacji. Poza tym zasady pirymidynowe po nasyceniu wiązania 5,6 tracą zdolność do stabilizujących strukturę drugorzędową oddziaływań z sąsiadującymi resztami zasadowymi oraz z resztami purynowymi komplementarnego łańcucha.

Uszkodzenia struktury drugorzędowej DNA zmieniają jego właściwości. Obserwuje się obniżenie temperatury denaturacji, spadek lepkości roztworu, wzrost pozornej gęstości w gradiencie CsCl i wzrost szybkości reakcji grup aminowych zasad z formaldehydem (74, 167).

W polimerze o nieuszkodzonej strukturze drugorzędowej ta ostatnia reakcja jest silnie zahamowana, ponieważ grupy NH_2 są związane wodorowo z komplementarnymi zasadami i znajdują się wewnątrz polimeru. Niewielka czułość metod pozwala zauważyć te objawy denaturacji DNA dopiero po dawce rzędu 10^5 — 10^6 erga/ mm^2 (74, 169). Uwalniające się grupy aminowe jako kryterium lokalnej denaturacji DNA można wykryć jednak już po dawkach 6 — 8×10^4 erga/ mm^2 mierząc zmianę czasu życia fluorescencji oranżu akrydyny agregującego się warstwowo na tych grupach (96, 169, 170).

Badanie własności hydrodynamicznych naświetlonego i poddanego denaturacji w formamidzie DNA ujawnia dwa dalsze rodzaje uszkodzeń struktury polimeru: utworzenie wiązań poprzecznych oraz pękanie wiązań fosfodwuestrowych (47, 50, 74, 75, 158).

Pojawienie się podczas frakcjonowania naświetlonego DNA w gradiencie CsCl (97) frakcji nie denaturującej się w formamidzie uważa się za skutek tworzenia się kowalentnych wiązań poprzecznych pomiędzy komplementarnymi łańcuchami w wyniku dimeryzacji przeciwległe położonych reszt tyminy (74, 75, 169). W natywnej, sztywnej strukturze DNA, podobnie jak i w poli dAT warunkiem międzyłańcuchowej dimeryzacji pirymidyn jest lokalna dezorganizacja struktury polimeru. Rzeczywiście, wraz z postępującą dysocjacją struktury drugorzędowej w podwyższonej temperaturze rośnie frakcja DNA nie denaturująca się w formamidzie osiągając maksimum przy dysocjacji około 10% wiązań wodorowych w przypadku DNA faga T2 (158), a w przypadku DNA *Salmonella typhimurium* po dysocjacji około 20% wiązań wodorowych (50). Brak jednak bezpośrednich dowodów, że wiązania te są rzeczywiście wynikiem utworzenia międzyłańcuchowych dimerów TT względnie $\overline{\text{CC}}$ i $\overline{\text{CT}}$.

W DNA faga T2 oszacowano ilość poprzecznych wiązań przypadających średnio na jedną cząsteczkę (158) zakładając, że jedno wiązanie poprzeczne w cząsteczce DNA powoduje już jej niedenaturowalność oraz, że rozmieszczenie wiązań poprzecznych w całej populacji cząsteczek jest zgodne z rozkładem Poissona. Po dawce rzędu 10^4 erga/ mm^2 nie ulegająca denaturacji frakcja stanowiła około 1/3 całej ilości DNA czemu odpowiadało średnio 0,5 poprzecznego wiązania na cząsteczkę o ciężarze cząsteczkowym rzędu $1,3$ — $1,6 \times 10^8$. Przy tej dawce zaś ilość dimerów pirymidynowych w cząsteczce DNA o ciężarze rzędu 10^8 jest rzędu 10^3 . Zatem prawdopodobieństwo powstania wiązania poprzecznego jest znikome w porównaniu z prawdopodobieństwem dimeryzacji sąsiadujących reszt pirymidynowych. W świetle tych danych sugestia (13), że wyodrębniona z DNA *E. coli* frakcja stanowiąca około 1/3 frakcji dimerów o budowie *cis-syn* może pochodzić z dimeryzacji przeciwległe położonych reszt tyminy wydaje się mało prawdopodobna. Dimer ten jest przypuszczalnie stereoisomerem *trans-syn* (II, rysunek 1), powstającym z reszt tyminy

sąsiadujących w tym samym łańcuchu lecz wyprowadzonych z warstwowej konfiguracji przez ruchy cieplne. Również poglądy (96, 169, 170) wiążące pojawienie się lokalnych denaturacji w DNA wyłącznie z międzyłańcuchową dimeryzacją tyminy nie znajdują potwierdzenia w danych doświadczalnych.

Ciężar cząsteczkowy naświetlonego DNA praktycznie nie zmienia się w funkcji dawki. Spadek ciężaru cząsteczkowego naświetlonego DNA ujawnia się dopiero po denaturacji w formamidzie, co wskazuje na sporadyczne pęknięcie wiązań fosfodwuestrowych. Podobnych efektów nie obserwuje się w syntetycznych polimerach typu poli A:U (74). Nie jest wykluczone, że pęknięcia wiązań fosfodwuestrowych w natywnym DNA wywołane są procesami fotodynamicznymi (6, 7, 21, 142) uczulonymi przez minimalne ilości zanieczyszczeń takich jak kationy ciężkich metali czy cząsteczki barwników.

W stanie suchym, w błonach DNA (oraz niektórych syntetycznych polinukleotydów pirymidynowych) obserwuje się pod wpływem UV międzyłańcuchową polimeryzację (158, 159), DNA staje się nierozpuszczalny (158). Natomiast DNA naświetlany w postaci kompleksu z białkiem *in vitro* lub *in vivo*, a także w roztworze zawierającym białko wiąże się z nim kowalentnie (121, 122, 124). Efekty te wskazują przypuszczalnie na innego typu reakcje nukleofilnej addycji do pierścienia pirymidynowego względnie na jakieś reakcje rodnikowe. Smith (123, 124) uważa wiązanie się DNA z białkiem za skutek addycji grup -OH seryny, względnie tyrozyny bądź też grup -SH białka do pirymidynowego wiązania 5,6 w DNA. Podstawę takiej interpretacji stanowią reakcje nukleofilnej addycji grup OH alkoholi lub SH-cysteiny do uracylu i tyminy (45, 82, 116, 123, 151). Produktem addycji cysteiny do uracylu jest 5-S-cysteino-6-hydrouracyl (123). Cysteina reaguje przypuszczalnie w podobny sposób z resztami uracylu w poli U, cytozyny w poli C oraz tyminy i cytozyny w DNA, ponieważ naświetlanie tych polimerów w roztworze wodnym zawierającym ³⁵S-cysteinę prowadzi do wbudowywania izotopu do polimerów (123).

2. RNA

Bardzo niewiele dotychczas wiadomo o reakcjach fotochemicznych w RNA (115, 122). Na podstawie wyników doświadczeń z modelowymi oligo- i polinukleotydami zawierającymi uracyl i cytozynę można się spodziewać, że w cząsteczkach RNA obie reszty pirymidynowe ulegają fotoaddycji wody i fotodimeryzacji. Rzeczywiście około 50% spadek absorpcji wodnego roztworu RNA z drożdży wywołany promieniowaniem 253,7 m μ jest częściowo odwracalny termicznie co wskazuje na obecność fotohydratów pirymidyn (161). Z produktów enzymatycznej

hydrolizy RNA wirusa mozaiki tytoniowej naświetlonego dużą dawką promieniowania 253,7 m μ wyodrębniono hydraty (99) kwasu urydylowego w ilości odpowiadającej maksymalnie 64% przereagowanego fotochemicznie uracylu. Oznaczając w alkalicznym hydrolizacie tego samego RNA grupy ureidowe powstające w wyniku otwarcia pierścienia pirymidynowego 5,6-dwuhydro-6-hydroksy pochodnych uracylu oraz dimerów uracylu stwierdzono, że z pośród 37% fotochemicznie transformowanych reszt uracylu 78% utworzyło hydraty, a 11% dimery. Większa zawartość fotohydratów uracylu w hydrolizatach alkalicznych może być wynikiem częściowej dezaminacji hydratów i dimerów cytozyny w tych warunkach. Ponadto nie wiadomo czy metoda alkalicznej hydrolizy nadaje się do oznaczania reszt wbudowanych w łańcuch polinukleotydowy.

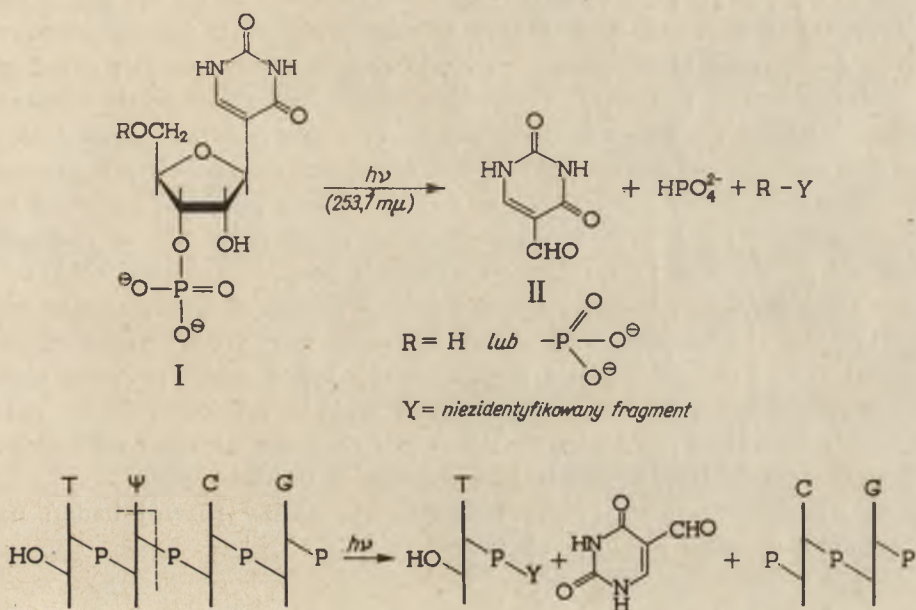
Wiele prac poświęcono próbom stwierdzenia powiązania przypuszczalnych fotoproduktów zasad pirymidynowych RNA z uszkodzeniem funkcji biologicznych sRNA (42, 51, 53, 128, 168) i infekcyjnego RNA wirusa mozaiki tytoniowej (65, 66). Badania przesunięcia przy pomocy promieniowania krótkofalowego równowagi fotochemicznej Py , $Py \xrightarrow{h\nu} \overline{PyPy}$ w RNA inaktywowanym promieniowaniem długofalowym nie wykazały związku pomiędzy dimeryzacją, a inaktywacją (42, 51, 53, 65, 128). Metodę tę można jednak stosować tylko wówczas, jeżeli pod wpływem promieniowania długofalowego osiąga się większe niż dla promieniowania krótkofalowego stacjonarne stężenie dimerów pirymidynowych, co prawdopodobnie nie jest spełnione w przypadku wrażliwego na promieniowanie infekcyjnego RNA wirusa mozaiki tytoniowej (66, 114). Harriman i Zachau (53) stwierdzili, że wydajność kwantowa inaktywacji fenyloalaninowego i lizynowego sRNA zmienia się wraz z długością fali podobnie jak i wydajność kwantowa dimeryzacji reszt U w dUpU (58, 62). Ponieważ promieniowanie krótkofalowe nie usuwało skutków działania promieniowania długofalowego wysunęli przypuszczenie, że w RNA podobnie jak w dUpU stacjonarne stężenie dimerów uracylowych (58) praktycznie nie zależy od długości fali.

Podatność RNA wirusa mozaiki tytoniowej na fotoreaktywację enzymatyczną (4, 77) jest jednak większa po inaktywacji promieniowaniem długofalowym niż krótkofalowym (77) co wskazywałoby na udział dimeryzacji i pirymidyn w inaktywacji.

Nie udało się wykazać związku fotoaddycji wody z inaktywacją biologiczną RNA drogą termicznego rozkładu fotohydratów pirymidyn (42, 53, 128), nie świadczy to jednak, że addycja wody nie wpływa na funkcje biologiczne RNA. W podwyższonej temperaturze częściowa dezaminacja fotohydratów i dezaminacja dimerów cytozynowych mogą prowadzić do istotnych zmian funkcjonalnych w cząsteczce RNA. Poza tym znaczna trwałość hydratów uracylu pozwala na pełny ich rozkład

w podwyższonej temperaturze dopiero wówczas, gdy obserwuje się już termiczną inaktywację nienaświetlonego RNA.

Ostatnio Tomasz i Chambers (138, 139) odkryli nową fotochemiczną reakcję reszt uracylowych wbudowanych do łańcuchów sRNA w postaci C₅-nukleozydów (pseudourydyna), która może mieć znaczenie dla inaktywacji rozpuszczalnych RNA zawierających znaczne ilości pseudourydyny. 3'-monofosforan, 3',5'-dwufosforan pseudourydyny oraz pseudourydyna w tetranukleotydzie TpΨp-CpGp pod wpływem promieniowania 253,7 mμ ulegają degradacji do 5-formylouracylu (schemat 6).



Schemat 6. Degradacja pseudourydyny

Reakcja ta wywołuje zatem rozszczepienie łańcucha poliribozylofosforanowego w miejscu wbudowania reszty pseudourydyny. W tetranukleotydzie reakcji tej towarzyszą inne procesy fotochemiczne prowadzące do zaniku absorpcji reszt zasadowych. Dawka promieniowania rzędu 10⁶ erga/mm² powodująca rozerwanie łańcucha w 60% cząsteczek wywołuje jednocześnie fotochemiczną przemianę 50% fragmentów pCpGp oraz 70% fragmentów w TpY. Wstępne wyniki badań alaninowego sRNA, którego chemiczna budowa jest znana wskazują, że promieniowanie powoduje rozerwanie łańcucha w miejscach gdzie znajdują się reszty pseudourydyny.

IV. Uwagi końcowe

Mimo szybkiego rozwoju i znacznych sukcesów badań nad fotochemią kwasów nukleinowych wiele problemów pozostaje ciągle jeszcze do rozwiązania. Nadal dalecy jesteśmy od pełnego zrozumienia mechanizmu podstawowych reakcji fotochemicznych.

Badania nad optycznymi właściwościami reszt zasadowych w syntetycznych polinukleotydach o znanej budowie chemicznej i fizycznej, prowadzące do wyjaśnienia dróg degradacji i przenoszenia energii elektronów, znajdują się dopiero w początkowej fazie, podobnie jak i ilościowe studia nad przebiegiem znanych reakcji fotochemicznych w syntetycznych kompleksach polinukleotydowych. Konieczne są dalsze prace nad poznaniem ubocznych reakcji fotochemicznych oraz fotochemicznych właściwości rzadziej występujących w kwasach nukleinowych zasad pirymidynowych i purynowych, zwłaszcza w rozpuszczalnych kwasach rybonukleinowych. Istniejące poglądy na przebieg podstawowych reakcji fotochemicznych w cząsteczkach DNA oparte są na nielicznych pracach zawierających dane doświadczalne, wartościowe z punktu ilościowej ich interpretacji. Praktycznie nic nie wiadomo o ich przebiegu w cząsteczkach RNA. Niewielkie rozmiary cząsteczek rozpuszczalnego RNA oraz poznanie chemicznej budowy szeregu tych kwasów, stwarzają dobre perspektywy dla szczegółowych badań fotochemicznych. Wreszcie sprawą przyszłości są dotychczas nie podejmowane prace nad wpływem obecności cząsteczek białka w kompleksach nukleoproteidowych na całości kształt procesów prowadzących do pojawienia się określonych końcowych fotoproduktów w cząsteczkach kwasów nukleinowych.

Nadchodzące lata przyniosą niewątpliwie dalszy rozwój badań nad fotochemią kwasów nukleinowych.

LITERATURA

1. Alcantara R., Wang S.Y., *Photochem. Photobiol.* **4**, 473 (1965).
2. Balle G., Cerutti P., Wittcop B., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3946 (1966).
3. Baranowska J., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 505 (1960).
4. Bawden F.C., Kleczkowski A., *Nature* **183**, 503 (1959).
5. Beaven G.H., Holiday E.R., Johnson E.A., w *The Nucleic Acids*, tom I, red. E. Chargaff i J. N. Davidson, New York, 1955, str. 493.
6. Bellin J.S., Grossman L., *Photochem. Photobiol.* **4**, 45 (1965).
7. Bellin J.S., Grossman L., *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 363 (1966).
8. Bersohn R., Isenberg I., *J. Chem. Phys.* **40**, 3175 (1964).
9. Beukers R., Berends W., *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 550 (1960).
10. Beukers R., Berends W., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 181 (1961).
11. Beukers R., Ijlst J., Berends W., *Rec. Trav. Chim.* **78**, 883 (1959).
12. Blackburn G.M., Davies R.J.H., *Chem. Comm.* **11**, 215 (1965).
13. Blackburn G.M., Davies R.J.H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 704 (1966).

14. Boag J.W., Sztumpf-Kulikowska E., Shugar D., *Photochem. Photobiol.* **6**, 41 (1967).
15. Børrensen H.C., *Acta Chem. Scand.* **17**, 921 (1963).
16. Børrensen H.C., *Acta Chem. Scand.* **19**, 2100 (1966).
17. Boyce R.P., Howard-Flanders P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 293 (1964).
18. Brown I.H., Freeman K.B., Johns H.E., *J. Mol. Biol.* **15**, 640 (1966).
19. Bullough R.K., *J. Chem. Phys.* **43**, 1927 (1965).
20. Bullough R.K., *Kgl. Danske Videnskab. Selskab. Mat. Fys. Medd.* (w druku).
21. Burr J.G., w *Advances in Photochemistry*, tom. IV, red. A. Noyes, jr. J.N. Pitts, New York 1966, str. 000.
22. Callis P.R., Rosa E.J., Simpson W.T., *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 2292 (1964).
23. Calvert J.G., Pitts J.N., *Photochemistry*, New York 1966.
24. Cerutti P., Ikeda K., Witkop B., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 2506 (1965).
25. Cerutti P., Miles H.T., Frazier J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 466 (1966).
26. Clark L.B., Tinoco I., Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 11 (1965).
27. Cohen B.J., Goodman L., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 5487 (1965).
28. Daniels M., Grimson A., *Nature* **197**, 484 (1963).
29. Daniłow V.I., *Photochem. Photobiol.* **6**, 233 (1967).
30. Deering R.A., Setlow R.B., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 526, (1963).
31. De Voe H., *Biopolymers Symp.* **1**, 251 (1964).
32. Dobrzański T., *Post. Mikrobiol.* **4**, 3 (1965).
33. Donges K.H., Fahr E., *Z. Naturforsch.* **21b**, 87 (1966).
34. Douzou P., Francq J., Hanss M., Ptak M., *J. Chim. Phys.* **58**, 926 (1961).
35. Drobnik J., Augenstein L., *Photochem. Photobiol.* **5**, 83 (1966).
36. Drobnik J., Kleinwächter V. (w druku).
37. Drobnik J., Kleinwächter V., Augenstein L., *Photochem. Photobiol.* **6**, 147 (1967).
38. Eisinger J., Gueron M., Shulman R.G., Yamane T., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1015 (1966).
39. Eisinger J., Shulman R.G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 1387 (1966).
40. Elad D., Kruger C., Schmidt G.M.J., *Photochem. Photobiol.* (w druku).
41. Fahr E., Kleber R., Boebinger E., *Z. Naturforsch.* **21b**, 219 (1966).
42. Fawa-Estrup F., Setlow R.B., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 28 (1964).
43. Fikus M., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **13**, 39 (1966).
44. Fikus M., Wierzchowski K.L., Shugar D., *Photochem. Photobiol.* **1**, 325 (1962).
45. Fikus M., Wierzchowski K.L., Shugar D., *Photochem. Photobiol.* **4**, 521 (1965).
46. Freeman K.B., Hariharan P.V., Johns H.E., *J. Mol. Biol.* **13**, 833 (1965).
47. Freifelder D., Davison P.F., *Biophys. J.* **3**, 97 (1963).
48. Füchtbauer W., Mazur P., *Photochem. Photobiol.* **5**, 323 (1966).
49. Gerdil R., *Acta Cryst.* **14**, 333 (1961).
50. Glisin V., Doty P., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 458 (1962).
51. Gottschling H., Zachau H.G., *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 418 (1965).
52. Gueron M., Shulman R.G., Eisinger J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 816 (1966).
53. Harriman P.D., Zachau H.G., *J. Mol. Biol.* **16**, 387 (1966).
54. Haug A., Douzou P., *Z. Naturforsch.* **20b**, 509 (1965).
55. Helene C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 237 (1966).

56. Helene C., Douzou P., Michelson A.M., *Biochim. Biophys. Acta* **109**, 261 (1965).
57. Helene C., Douzou P., Michelson A.M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 376 (1966).
58. Helleiner C.W., Pearson C.L., Johns H.E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 761 (1963).
59. Jagger J., *Bacteriol. Revs.* **22**, 99 (1958).
60. Johns H.E., w *Methods in Enzymology*, red. A. Collowick, G. Kaplan (w druku).
61. Johns H.E., Le Blance J.C., Freeman K.B., *J. Mol. Biol.* **13**, 849 (1963).
62. Johns H.E., Pearson M.L., Helleiner C.W., Logan D.M., w *Cellular Radiation Biology*, Baltimore 1965, str. 29.
63. Johns H.E., Pearson M.L., Le Blanc J.C., Helleiner C.W., *J. Mol. Biol.* **9**, 503 (1964).
64. Johns H.E., Rapaport S.A., Delbrück M., *J. Mol. Biol.* **4**, 104 (1962).
65. Kleczkowski A., *Photochem. Photobiol.* **2**, 497 (1963).
66. Kleczkowski A., *Photochem. Photobiol.* **4**, 941 (1963).
67. Kleinwächter V., Drobnik J., Augenstein L., (w druku).
68. Kleinwächter V., Drobnik J., Augenstein L., *Photochem. Photobiol.* **6**, 133 (1967).
69. Lisewski R., Wierzchowski K.L., *Photochem. Photobiol.* (1967), w druku.
70. Lisewski R., Wierzchowski K.L., (nieopublikowane wyniki).
71. Logan D.M., Whitmore G.F., *Photochem. Photobiol.* **5**, 143 (1966).
72. Longworth J.W., Rahn R.O., Shulman R.G., *J. Chem. Phys.* **45**, 2930 (1966).
73. Mantione M.J., Pullman B., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 387 (1965).
74. Marmur J., Anderson W.F., Matthews L., Berns K., Gajewska E., Lane D., Doty P., *J. Cellular Comp. Physiol.* **58**, Suppl. 1, 33 (1961).
75. Marmur J., Grossman L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 778 (1961).
76. Mason S.F., w *Physical Methods in Heterocyclic Chemistry*, tom II, red. A. R. Katritzky, New York 1963, str. 1.
77. Merriam V., Gordon M.P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 1261 (1965).
78. Moore A.M., *Can. J. Chem.* **36**, 281 (1958).
79. Moore A.M., *Can. J. Chem.* **37**, 1281 (1959).
80. Moore A.M., *Can. J. Chem.* **41**, 1937 (1963).
81. Moore A.M., Thomson C.H., *Science* **122**, 594 (1955).
82. Moore A.M., Thomson C.H., *Progr. Radiobiol.* **4**, 75 (1956).
83. Ono J., Wilson R., Grossman L., *J. Mol. Biol.* **11**, 600 (1965).
84. Pearson M., Johns H.E., *J. Mol. Biol.* **10**, 303 (1966).
85. Pearson M., Johns H.E., *J. Mol. Biol.* **20**, 251 (1966).
86. Pearson M.L., Ottensmeyer F.P., Johns H.E., *Photochem. Photobiol.* **4**, 739 (1965).
87. Pearson M., Whillans D.W., Le Blanc J.C., Johns H.E., *J. Mol. Biol.* **20**, 215 (1966).
88. Pettijohn D., Hanawalt P., *J. Mol. Biol.* **9**, 395 (1964).
89. *Radiation Biology*, tom II, red. A. Hollaender, New York 1955, str. 1—593.
90. Rahn R.O., Longworth J.W., Eisinger J., Shulman R.G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1299 (1964).
91. Rahn R.O., Shulman R.G., Longworth J.W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 893 (1965).
92. Rahn R.O., Shulman R.G., Longworth J.W., *J. Chem. Phys.* **45**, 2955 (1966).

93. Rahn R.O., Yamane T., Eisinger J., Longworth J.W., Shulman R.G., *J. Chem. Phys.* **45**, 2947 (1966).
94. Rhodes W., *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 3609 (1961).
95. Rupert C.S., w *Photophysiology*, tom II, red. A. C. Giese, New York, 1964, str. 283.
96. Sawicz A.P., Zawilgielskij G.B., *Doklady Akad. Nauk SSSR* **162**, 952 (1965).
97. Schildkraut C.L., Marmur J., Doty P., *J. Mol. Biol.* **3**, 595 (1961).
98. Scholes G., *Progr. Biophysics Mol. Biol.* **13**, 59 (1963).
99. Schuster H., *Z. Naturforsch.* **19b**, 815 (1964).
100. Schweizer M.P., Chan S.I., Ts'o P.O.P., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 5241 (1963).
101. Setlow J.K., w *Current Topics in Radiation Biology*, red. M. Ebert, A. Howard, Amsterdam 1965, str. 191.
102. Setlow J.K., Setlow R.B., *Nature* **197**, 560 (1963).
103. Setlow R.B., *Adv. Med. Biol. Phys.* **5**, 37 (1957).
104. Setlow R.B., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 237 (1961).
105. Setlow R.B., *J. Cellular Comp. Physiol.* **64**, Suppl. 1, 51 (1964).
106. Setlow R.B., w *Mammalian Cytogenetics and Related Problems in Radiobiology*, red. C. Pavan, C. Chagas, D. Frota-Pessoa, L.R. Caldas, Oxford, 1964, str. 291.
107. Setlow R.B., *Science* **153**, 379 (1966).
108. Setlow R.B., Carrier W.L., *Photochem. Photobiol.* **2**, 49 (1963).
109. Setlow R.B., Carrier W.L., *J. Mol. Biol.* **17**, 237 (1966).
110. Setlow R.B., Carrier W.L., Bollum F.J., *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 446 (1964).
111. Setlow R.B., Carrier W.L., Bollum F.J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1111 (1965).
112. Setlow R.B., Doyle B., *Biochim. Biophys. Acta* **15**, 117 (1954).
113. Setlow R.B., Setlow J.K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1250 (1962).
114. Setlow R.B., Setlow J.K., *Photochem. Photobiol.* **4**, 939 (1965).
115. Shugar D., Mc Laren A.D., *Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids*, Pergamon Press, Oxford 1964.
116. Shugar D., Wierzchowski K.L., *Post. Biochem.* **4**, Suppl., 243 (1958).
117. Shulman R.G., Rahn R.O., *J. Chem. Phys.* **45**, 2940 (1966).
118. Sinanoglu O., Abdunur S., *Photochem. Photobiol.* **3**, 333 (1964).
119. Sinsheimer R.L., *Rad. Res.* **6**, 121 (1957).
120. Smith K.C., *Photochem. Photobiol.* **2**, 503 (1963).
121. Smith K.C., *Photochem. Photobiol.* **3**, 415 (1964).
122. Smith K.C., w *Photophysiology*, tom II, red. A. C. Giese, New York 1964, str. 329.
123. Smith K.C., Alpin R.T., *Biochemistry* **5**, 2125 (1966).
124. Smith K.C., Hodgkins B., O'Leary M.E., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 1 (1966).
125. Steiner R.F., Beers R.F., *Polynucleotides*, Amsterdam 1961.
126. Stewart R.F., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 131 (1963).
127. Stewart R.F., Davidson N., *J. Chem. Phys.* **39**, 255 (1963).
128. Swenson P.A., Nishimura S., *Photochem. Photobiol.* **3**, 85 (1964).
129. Swenson P.A., Setlow R.B., *Photochem. Photobiol.* **2**, 419 (1963).
130. Swenson P.A., Setlow R.B., *J. Mol. Biol.* **15**, 201 (1966).
131. Szer W., Świerkowski M., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **10**, 87 (1963).
132. Sztumpf-Kulikowska E., Boag J.W., Shugar D., *Abstr. III Intern. Congress Rad. Res. Cortina d'Ampezzo 1966*, str.
133. Sztumpf E., Shugar D., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 555 (1962).
134. Sztumpf E., Shugar D., *Photochem. Photobiol.* **4**, 719 (1963).

135. Śmietanowska A., Shugar D., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II* **9**, 375 (1961).
136. Tinoco I., Holcomb D.N., *Ann. Rev. Phys. Chem.* **15**, 371 (1964).
137. Tinoco I., Woody R.W., Bradley D.F., *J. Chem. Phys.* **38**, 1317 (1963).
138. Tomasz M., Chambers R.W., *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 4216 (1964).
139. Tomasz M., Chambers R.W., *Biochemistry* **5**, 773 (1966).
140. Tramer Z., Wierzchowski K.L., Shugar D., *Photochem. Photobiol.* (w druku).
141. Ts'o P.O.P., Melvin I.S., Olson A.C., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1289 (1963).
142. Wacker A., w *Progress in Nucleic Acid Research*, t. I, red. J. N. Dawidson, W.E. Cohn, New York 1963, str. 369.
143. Wacker A., Dellweg H., Lodemann E., *Naturwissenschaften* **20**, 477 (1960).
144. Wacker A., Dellweg H., Trager L., Kornhauser A., Lodemann E., Truck G., Selzer R., Chandra P., Ishimoto M., *Photochem. Photobiol.* **3**, 369 (1964).
145. Wacker A., Jacherts D., Jacherts B., *Angew. Chem.* **74**, 653 (1962).
146. Wacker A., Lochman E.R., *Z. Naturforsch.* **17b**, 351 (1962).
147. Wacker A., Trager L., Weinblum D., *Angew. Chem.* **73**, 65 (1961).
148. Wang S.Y., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6199 (1958).
149. Wang S.Y., *Nature* **184**, 59 (1959).
150. Wang S.Y., *Nature* **188**, 84 (1960).
151. Wang S.Y., *Nature* **190**, 690 (1961).
152. Wang S.Y., *Nature* **200**, 879 (1963).
153. Wang S.Y., *Federation Proc.* **24**, S-71 (1965).
154. Wang S.Y., Alcantara R., *Photochem. Photobiol.* **4**, 477 (1965).
155. Warshaw M.M., Tinoco I., *J. Mol. Biol.* **13**, 54 (1965).
156. Weinblum D., Johns H.E., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 450 (1966).
157. Wierzchowski K.L. (wyniki nieopublikowane).
158. Wierzchowski K.L. (wyniki nieopublikowane).
159. Wierzchowski K.L., Lisewski R., Abstr. III rd Intern. Congress Rad. Res., Cortina d'Ampezzo, 1966, str. 236.
160. Wierzchowski K.L., Shugar D., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 355 (1957).
161. Shugar D., Wierzchowski K.L., *J. Polymer Sci.* **31**, 269 (1958).
162. Wierzchowski K.L., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 313 (1959).
163. Wierzchowski K.L., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **7**, 377 (1960).
164. Wierzchowski K.L., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 219 (1961).
165. Wierzchowski K.L., Shugar D., *Photochem. Photobiol.* **1**, 21 (1962).
166. Wulf D.L., Fraenkel G., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 332 (1961).
167. Venner H., Zimmer Ch., Horn R., *Naturwissenschaften* **49**, 542 (1962).
168. Zachau H.G., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **336**, 176 (1964).
169. Zawilgielskij G.B., w zbiorze artykułów Molekularnaja Biofizika, Moskwa 1965.
170. Zawilgielskij G.B., Minczienkowa L., Je, Minjat E. Je., Sawicz A.P., *Biochimija* **30**, 625 (1965).
171. Zetterberg G., w *Photophysiology*, tom II, red. A. C. Giese, New York 1964, str. 247.

STEFAN PASZYC*

Fotochemia związków flawinowych

Photochemistry of Flavins

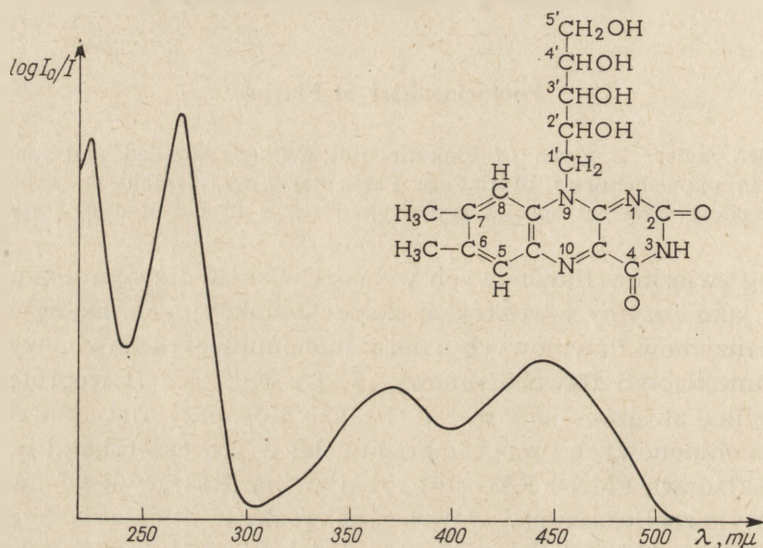
A brief review is given of experimental methods applied and mechanisms proposed in photochemistry of flavins. Particular stress is laid on experimental data concerning transient species and excited states produced during irradiation.

Szereg związków flawinowych wchodzi w skład flawoproteidów działających jako enzymy w reakcjach oksydo-redukcyjnych. Do najważniejszych koenzymów flawinowych należą: mononukleotyd flawinowy (FMN) oraz dwunukleotyd flawoadeninowy (FAD). Niektóre flawoproteidy zawierają silnie związane jony metali (Fe, Cu, Mo) sprzyjające powstawaniu form semichinonowych i mogące brać udział w procesach katalitycznych. Częścią składową FMN i FAD jest ryboflawina (Rf) czyli 6,7-dwumetylo-9-rybityloizooaloksazyna. Odwracalne reakcje utleniania i redukcji FMN, FAD i ryboflawiny przebiegają w ich pierścieniu izoaloksazynowym. Przyłączenie się wodoru do dwóch atomów azotu tego pierścienia w pozycji N₁ i N₁₀ (rysunek 1) przeprowadza flawiny w ich formy zredukowane (FMNH₂, FADH₂ i RfH₂).

Pokaźna liczba procesów biochemicznych, w których zaangażowane są enzymy flawinowe związana jest z emisją i absorpcją światła, a więc ze zjawiskiem fluorescencji, fotolizy, fotoutleniania, fotoredukcji i fotobłaknięcia (*photofading*). Udział flawin w procesach działania fotodynamicznego, fototropii, fototaksji i fotomorfogenezy jest dobrze znany biologom. Flawiny na przykład spełniają niepoślednią rolę w fosforylacji fotosyntetycznej (9) i enzymatycznej fotoredukcji azotanów. Szczególną fotoaktywnością odznacza się ryboflawina. Związek ten jak i wiele innych barwników może uczulać na wpływ światła reakcje utleniania wielu substratów w obecności tlenu. Takie działanie objawia się w przypadku inaktywacji enzymów (8, 10, 34), zahamowania funkcji niektórych mikroorganizmów i hemolizy czerwonych ciałek krwi. Ukazały się także, jak dotąd nieliczne, prace na temat fotochemicznej inaktywacji fungicydów

* Doc. dr, Zakład Fotochemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Wykaz używanych skrótów: Rf — ryboflawina, EPR — elektronowy rezonans paramagnetyczny.

w obecności flawin (2, 13). Szczególne zainteresowanie botaników wzbudziła uczulona przez ryboflawinę reakcja fotoutlenienia kwasu indoloocetowego. Rozkład tego hormonu wzrostowego roślin jest prawdopodobnie związany ze zjawiskiem fototropowym (8, 9, 30). Thimann i Curry (44) jednak na podstawie porównania widm flawin i widma działania (*action spectrum*) dla fototropii w ultrafiolecie kwestionują udział ryboflawiny jako uczulacza tej reakcji. Zagadnienie to jest jak dotąd otwarte.



Rys. 1. Wzór strukturalny ryboflawiny i jej widmo absorpcji w wodzie destylowanej.

Ryboflawina jest prawdopodobnie także tym czynnikiem, który odgrywa istotną rolę w zjawisku zwanym „negatywną fotofobotaksją” występującą u chloroplastów algi *Vaucheria sessilis* (12). Na zakończenie tego niepełnego oczywiście przeglądu udziału flawin w procesach fotobiologicznych dodać trzeba, że ryboflawinę znaleziono w źrenicach oczu wielu ssaków i to nawet w stanie krystalicznym (28). Według niektórych badaczy chemiluminescencja towarzysząca procesom fotosyntezy może być spowodowana emisją światła przez ryboflawinę (38).

I. Fotoliza flawin

Udział flawin w wielu procesach fotobiologicznych, fakt, że budowę chemiczną flawin ustalono na podstawie badań fotochemicznych oraz specyficzna właściwość tych związków, które mogą działać jako fotouczulacze, ponieważ ich pobudzone cząsteczki są donatorami elektronów (17) zwróciły na nie szczególną uwagę zarówno chemików jak i biologów. Charakterystyczny żółty kolor flawin związany jest z silną absorpcją

światła w zakresie fioletowym i niebieskim widma. Ryboflawina, FMN i glukozyd ryboflawiny mają niemal identyczne widma absorpcji charakteryzujące się trzema pasmami ($\lambda_{\max} = 445, 373, 260 \text{ m}\mu$), a widmo FAD różni się nieznacznie ($\lambda_{\max} = 450, 375, 263 \text{ m}\mu$) (5, 46). Wartości absorpcji światła dla wymienionych długości fali używane są często jako kryteria oceny czystości związków flawinowych.

Badanie fotolityczne flawin zapoczątkowali Warburg i Christian, którzy w roku 1932 stwierdzili, że grupa prostetyczna żółtego fermentu jest światłoczuła, a w rok potem wyodrębnili substancję krystaliczną, która okazała się 6,7,9-trójmetyloizoalloksazyną i została później nazwana lumiflawiną ($\lambda_{\max} = 445, 385, 265 \text{ m}\mu$). Rodzaj produktów fotolizy ryboflawiny w dużej mierze zależy od pH środowiska. Lumiflawina tworzy się w środowisku alkalicznym, natomiast w kwaśnym i obojętnym pozostaje głównie lumichrom czyli 6,7-dwumetylo-alloksazyna ($\lambda_{\max} = 385, 350, 260 \text{ m}\mu$). Po przeprowadzeniu fotolizy ryboflawiny lub jej pochodnych w warunkach beztlenowych, doprowadzeniu tlenu powietrza i oddzieleniu lumichromu otrzymuje się deuteroflawinę (deutero-Fl) czyli 9-formylometyloflawinę. Związek ten odznacza się znaczną światłoczułością i wrażliwością na działanie alkali (14, 35). Fotolizę ryboflawiny, FMN, FAD i innych flawin wykrywano metodami chemicznymi, polarograficznymi (3, 4, 7, 21, 23) chromatograficznymi (24, 35, 45), spektroskopowymi (2, 24, 47), fluorometrycznymi (4, 24) i na drodze prób mikrobiologicznych (35). Halwer (11) prowadził kinetyczne badania procesu fotolizy. Najlepiej poznanymi produktami fotolizy są lumiflawina, lumichrom, deuteroflawina i leukodeuteroflawina czyli zredukowana deuteroflawina (deutero-FlH₂), Prace Karrera, Koshary, a także innych autorów wskazują na to, że podczas fotolizy ryboflawiny utlenia się boczny łańcuch rybitylowy. Świadczy o tym powstawanie estrów kwasu 6,7-dwumetyloizoalloksazyno-9-octowego w czasie fotorozkładu jak też i wielu produktów zawierających atomy węgla od 1' do 5', wytwarzanych na skutek pęknięcia bocznego łańcucha rybitylowego. Stwierdzono także, że wolna grupa hydroksylowa w położeniu 2' sprzyja szybkiej reakcji fotolizy. Halwer (11) wykazał, że fotoliza ryboflawiny i jej pochodnych w roztworze kwaśnym jest przykładem katalizy kwasowo-zasadowej. Sugeruje on również, że aktem pierwotnym fotorozkładu jest oderwanie się protonu od grupy hydroksylowej w położeniu 2' i pobranie go następnie przez atom azotu w położeniu 9 pierścienia izoalloksazynowego. Przejście protonu zachodzi łatwiej w środowisku odpowiednio zbuforowanym. Kozioł (24) fotolizując ryboflawinę w niektórych rozpuszczalnikach organicznych i w wodzie w obecności tlenu powietrza stwierdził znaczną odporność tego związku, a także lumichromu na działanie światła uwarunkowaną powstawaniem wiązania wodorowego między tymi związkami, a roz-

puszczalnikiem. Wyniki badań nad fotolizą flawin i flawoproteidów wskazują na to, że RFl i FMN odznaczają się jednakową światłoczułością, natomiast flawoproteidy są daleko mniej podatne na działanie światła, a FAD zajmuje pozycję pośrednią. Czynniki wzmagającymi fotolizę są: *pH* roztworu, stężenie buforów i warunki beztlenowe. Należy również dodać, że ryboflawina w formie zredukowanej (RFH₂) jest bardziej odporna na działanie światła. W literaturze można także znaleźć dane o wpływie Cu²⁺, Mg²⁺ i Fe³⁺ (47) oraz niektórych jonów metali ciężkich (39) na szybkość fotorozkładu flawin w roztworach.

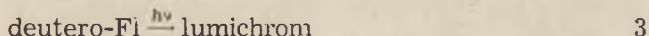
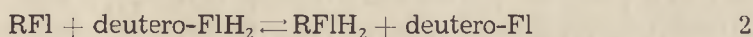
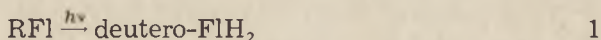
II. Fotobłaknięcie i fotoredukcja*

Badania nad fotobłaknięciem ryboflawiny i jej pochodnych prowadzili przede wszystkim Oster i Holmström (15, 17). Beztlenowe fotoodbarwienie RFl w nieobecności donatorów elektronów prowadzi początkowo do powstawania leukodeuteroflawiny. Dwa wodory przyłączone do pierścienia aromatycznego pochodzą z łańcucha bocznego. Leukodeuteroflawina ma zdolności redukcyjne, przy czym sama utlenia się do deuteroflawiny. Szybkość błaknięcia ryboflawiny w roztworach buforowych zwiększa się wraz z kwadratem stężenia buforu. Proces ten zachodzi zarówno w obecności jak i nieobecności tlenu, a także przy *pH* kwaśnym lub obojętnym. Tworzenie się leukodeuteroflawiny związane jest z katalizą kwasowo—zasadową co objawia się zwiększaniem wydajności kwantowej wraz z podwyższeniem stężenia buforu. Nieznaczny dodatek KJ (rzędu 10⁻⁶ M) w wyraźny sposób zmniejsza wydajność kwantową fotobłaknięcia ryboflawiny. Tak nieznaczne stężenie KJ nie wpływa natomiast na fluorescencję tego związku. Czas życia produktów fluoryzujących S₁ (rysunek 2) jest rzędu 10⁻⁸ s a gaszenie fluorescencji występuje dopiero przy stężeniu KJ rzędu 0,1 M.

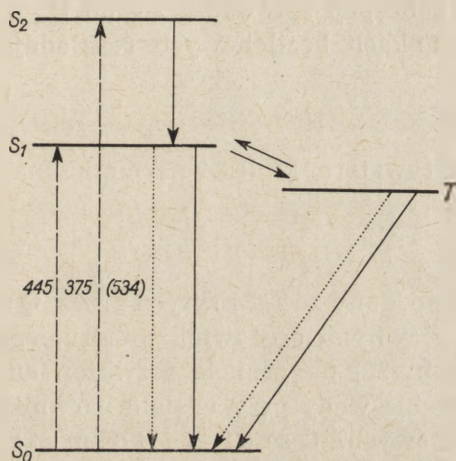
Ponieważ do zahamowania procesu fotobłaknięcia wystarczające jest mikromolarne stężenie KJ Oster i Holmström doszli do wniosku, że powstające w tym procesie chemiczne aktywne produkty (T) są względnie trwałe i obliczyli, że czas ich życia wynosi 10⁻³ s. A zatem one, a nie S₁ są związkami przejściowymi w procesie fotobłaknięcia. Nowsze badania nad fotobłaknięciem ryboflawiny, a właściwie jej estru 5' fosforanowego przeprowadził Holmström (15). Posługując się fotolizą błyskową w połączeniu ze spektroskopią kinetyczną śledził on zmiany widm w toku fotobłaknięcia RFl w roztworze obojętnym w obecności lub w nieobecności tlenu oraz w roztworach nasyconych powietrzem i z do-

* Termin fotobłaknięcie (*photofading*) związany jest z rozkładem łańcucha bocznego barwnika w odróżnieniu od „czystej fotoredukcji” (*pure photoreduction*) zachodzącej w obecności dodanego czynnika redukcyjnego.

datkiem H_2O_2 . Fotoliza w warunkach beztlenowych biegnie według następującego schematu:



Fotorozkład RFl następuje w wyniku naświetlania, a nie na skutek wprowadzonego do badanego układu tlenu z powietrza jak to sądzono uprzednio. Niewielkie ilości tlenu zwiększają jednak wydajność powstawania lumichromu. W warunkach tlenowych fotoliza prowadzi do powstawania obok lumichromu, również bliżej nie zidentyfikowanego związku czy mieszaniny związków o maksimum absorpcji w okolicy 400 m μ .



Rys. 2. Wykres poziomów energetycznych i możliwych przejść pomiędzy poziomami. (wg 26)

Liczby (w m μ) odnoszą się do absorpcji. Strzałki kreskowane — absorpcja z pominięciem poziomów odpowiadających długościom fali 260 i 224 m μ ; strzałki kropkowane — luminescencja; strzałki ciągłe — przejścia bezpromienne. Fluorescencja powstaje na skutek przejścia z pierwszego wzbudzonego singletu (S_1) do poziomu podstawowego (S_0). Fosforescencja w temperaturze pokojowej objawia się przejściem od nietrwałego stanu T do S_0 przez S_1 , a w niskich temperaturach bezpośrednio od T do S_0 .

Fotoredukcja ryboflawiny przebiega nawet bez udziału donatorów elektronów, a w obecności takich czynników jak etylenodwuaminocztro-octan (EDTA) proces fotoredukcji jest odwracalny. Powstawanie form semichinonowych w toku tego procesu sugerowano już dawniej na podstawie wyników badań spektrofotometrycznych i polarograficznych. Holmström (14) stosując w badaniach nad flawinami metodę fotolizy błyskowej postuluje, że fotoredukcja RFl w obecności EDTA jest reakcją dwustopniową, jednoelektronową, przechodzącą przez stan tripletowy. Potwierdzeniem takiego przebiegu procesu było znaczne zmniejszenie się wydajności semichinonu w obecności małych ilości jonów jodu.

Katalityczne działanie ryboflawiny w procesie fotoredukcji Fe^{3+} i fotoutleniania Fe^{2+} wykazał R u t t e r (31). Z badań jego wynika, że pomiędzy RFl, a jonami żelaza następuje bezpośrednie przeniesienie elektronu. Według podobnego mechanizmu działają flawoproteidy. Prace cytowanych tu autorów dowodzą, że fotoprocesy, które omówiliśmy spowodowane są przede wszystkim zmianami w bocznym łańcuchu rybitylowym. Próbuąc szerzej wyjaśnić reakcje fotochemiczne flawin zaproponowano dwa możliwe mechanizmy:

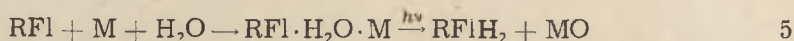
a) pobudzona światłem ryboflawina rozkłada cząsteczki wody (7, 11, 20, 37, 48).

b) cząsteczka ryboflawiny w stanie pobudzonym staje się aktywnym donatorem elektronów i w wyniku katalizuje swój własny fotorozkład (14, 17, 25, 26, 35).

Pierwsza z koncepcji sprowadza się do tego, że pobudzone światłem flawiny w warunkach beztlenowych rozkładają wodę z wydzieleniem H_2O_2 :



W obecności aktywatora M (EDTA, metionina) reakcja przebiega następująco:



Mechanizm ten poddany został krytyce przez O s t e r a i H o l m s t r ö m a, którzy są głównymi orędownikami drugiego mechanizmu. Również R a b i n o w i t c h (29) na gruncie rozważań energetycznych krytykuje teorię fotoutleniania wody przy udziale barwników organicznych w warunkach beztlenowych. O s t e r i H o l m s t r ö m dowodzą, że jeśli woda związana (reakcja 4) miałaby mniejszą trwałość niż zwykła cząsteczka wody to zgodnie z dalszym przebiegiem reakcji musiałaby być pokonana dodatkowa energia wiązania. W przeciwieństwie do pierwszej koncepcji sugerującej, że pobudzona działaniem światła RFl pobiera wodór z wody postulują oni udział wodoru pochodzącego z bocznego łańcucha rybitylowego. W toku reakcji fotochemicznej rozkłada się równoważna ilość RFl. Potwierdzeniem takiego przebiegu fotoreakcji są wyniki badań fotoelektrochemicznych i reakcji redukcji uczulanych na światło przez ryboflawinę. Jako przykład tej ostatniej przytoczyć można zastosowanie RFl do uczulania reakcji fotopolimeryzacji akrylamidu (27) przy czym czynnikiem redukującym jest tutaj łańcuch rybitylowy.

III. Stany wzbudzone i produkty przejściowe w fotochemii flawin

Już dawniej przypuszczano, że podczas redukcji niektórych flawoproteidów powstają bardzo reaktywne formy semichinonowe. Tworzą się one na skutek bezpośredniego przeniesienia elektronu lub atomu

wodoru w kierunku od substratu do flawiny. W czasie przebiegu reakcji katalizowanych przez flawiny, a także w wyniku dodania do flawin odpowiednich substratów powstają silnie zabarwione na kolor czerwony lub zielony produkty przejściowe absorbujące światło o długości fali 540—580 m μ lub odpowiednio 465—475 m μ (1). Widma ich są bardzo zbliżone do odpowiednich widm semichinonów powstających podczas reakcji redukcji wolnych flawin do ich leukoformy. Pozwala to przypuszczać, że produkty przejściowe tworzące się podczas zwykłych reakcji chemicznych i reakcji enzymatycznych mają jednakową budowę. Dimer semichinonu ma szerokie pasmo absorpcji w zakresie od 700—1200 m μ z maksimum przy 900 m μ . Redukcję wolnych flawin można przeprowadzić stosując typowe substancje redukujące, promienie rentgena (40) lub światło widzialne (15, 37).

Posługując się metodą fotolizy błyskowej w warunkach beztlenowych Holmström (16) wykrył nietrwały produkt przejściowy o budowie semichinonowej RFlH \cdot o maksimum absorpcji około 500 m μ . Autor oznaczył bezwzględne stężenie produktu przejściowego, jego współczynnik absorpcji i szybkość zanikania. Proces odbarwiania się RFl jest zupełnie inny w obecności aktywatorów niż bez nich. W tym ostatnim przypadku ma miejsce tylko degradacja bocznego łańcucha ryboflawiny. W dalszych pracach Holmström (18) stosując tę samą metodę wyznaczył bezwzględne wartości współczynnika absorpcji semichinonu o budowie \cdot FMNH lub \cdot FMNH $^-$ w roztworach FMN w zakresie pH 5—9.

Ostatnio Tegnér i Holmström (41) zastosowali metodę fotolizy błyskowej (18) do naświetlania lumiflawiny. Na podstawie otrzymanych widm nietrwałych produktów przejściowych odmiennych od widm semichinonów oraz ich wrażliwości na nieznaczną zawartość tlenu lub jodku potasu wnioskują oni, że widma te obrazują stan tripletowy lumiflawiny.

Stan tripletowy wykryto u pochodnych flawin i oksydazy D-amino-kwasowej metodą EPR w świetle widzialnym i nadfiolecie w temperaturze 77°K (32, 33). Tripletety flawinowe ($\Delta m \mp 2$) dla FMN i FAD pochodzą z pierścienia izoalloksazynowego. Okres półtrwania tripletu FMN w 1N HCl wynosi 15 ms. Przebadano także wpływ tlenu, zmiany pH, stężenia roztworów jodku potasowego oraz tryptofanu na czas trwania i zaniku tripletu.

Na uwagę zasługują także prace Terenina i wsp. (42) nad fotolizą błyskową roztworów RFl i lumiflawiny w obecności dwufenyloaminy. Autorzy ci zarejestrowali pasma absorpcji rodnika kationowego dwufenyloaminy i semichinonu flawiny. Lumichrom w tych samych warunkach odrywa wodór od dwufenyloaminy. Dalsze prace tych autorów zmierzają w kierunku wyjaśnienia, która z postaci fotoaktywowanych flawin reaguje z dwufenyloaminą singletowa czy tripletowa. Również

Knowles i Roe (22) wykryli krótkotrwałe widmo absorpcji w roztworach ryboflawiny i lumiflawiny o okresie półtrwania 1,5 ms, które przypisują stanowi tripletowemu.

Badając mechanizm działania fungicydu primaricyny na komórki drożdży stwierdzono, że światło widzialne rozkłada ten związek w obecności ryboflawiny (13). Zjawisko to jest o tyle interesujące, że primaricyna nie wykazuje żadnej absorpcji w dziedzinie widzialnej. Berends i Posthuma (2) badali uczulany przez RFl i lumichrom fotorozkład primaricyny światłem o długości fali 445 m μ w roztworach wodnych. Zaproponowali oni dla fotodynamicznego rozkładu primaricyny przejście triplet—triplet według następującego schematu:



Podczas naświetlania nie stwierdzono powstania H₂O₂.

IV. Uwagi końcowe

Prace z zakresu fotochemii flawin posunęły się znacznie naprzód od lat trzydziestych. W ostatnich latach rozwinęły się zwłaszcza badania postaci semichinonowych i stanów wzbudzonych przy użyciu metody fotolizy błyskowej w połączeniu ze spektroskopią kinetyczną i metody EPR. Wydaje się, że końcowe produkty fotolizy flawin są dobrze poznane, jednakże mechanizm ich powstawania oraz mechanizm fotoredukcji tych związków czeka jeszcze na wyjaśnienie. Dwie koncepcje omówione uprzednio nie są w pełni zadowalające. Odrzucona przez Ostersa i Holmströma hipoteza rozkładu wody powraca jednak w pracach niektórych badaczy na łamy czasopism naukowych (7). Przedstawione tutaj rozważania nad fotochemią flawin oparte są na wynikach doświadczeń prowadzonych w warunkach, które ograniczają ich biologiczną sprawdzalność. Użycie silnych energetycznie źródeł światła błyskowego pozwala wprawdzie na wykrycie krótkotrwałych produktów przejściowych i stanów wzbudzonych, jednakże nasuwa wątpliwości czy reakcje wywołane tak intensywnym światłem mogą być porównywane z reakcjami zachodzącymi przy zastosowaniu mniejszych energii promieniowania. Prowadzenie badań EPR flawin w niskich temperaturach rzędu 77°K (6, 32, 33) pozwala co prawda na uchwycenie produktów przejściowych o krótkim okresie trwania lecz układ jest daleki od warunków *in vivo*. Niemniej jednak wyniki uzyskane dotąd zwłaszcza w badaniach podstawowych stanowią dla biologów cenny materiał pozwalający na interpretację zjawisk fotobiologicznych szczególnie fotodynamicznych (36) i fototropowych (43).

LITERATURA

1. Beinert H., *J. Biol. Chem.* **225**, 465 (1957).
2. Berends W., Posthuma J., *J. Phys. Chem.* **66**, 2547 (1962).
3. Brdička R., *Coll. Czeskoslov. Chem. Comm.* **14**, 130 (1962).
4. Chung Shu Yang, Mc Cormick D.B., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 5763 (1965).
5. Cerletti P., Siliprandi, *Arch. Biochem.* **76**, 214 (1958).
6. Ehrenberg A., *Arkiv Kemi* **19**, 97 (1962).
7. Enns K., Burgess W.H., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 1822 (1965).
8. Galston A.W., Baker R.S., *Science* **109**, 485 (1949).
9. Galston A.W., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **35**, 10 (1949).
10. Ghiron C.A., Spikes J.D., *Photochem. Photobiol.* **4**, 13 (1965).
11. Halwer M., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 4870 (1951).
12. Haupt W., Schönfeld J., *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **75**, 14 (1962).
13. Hendricks B., Berends W., *Rec. Trav. Chim. Pays Bas* **77**, 145 (1958).
14. Holmström B., *Arkiv Kemi* **22**, 329 (1964).
15. Holmström B., *Arkiv Kemi* **22**, 281 (1964).
16. Holmström B., *Bull. Soc. Chim. Belg.* **71**, 869 (1962).
17. Holmström B., Oster G., *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1867 (1961).
18. Holmström B., *Photochem. Photobiol.* **3**, 97 (1964).
19. Nakamoto T., Krogmann D.W., Vennesland B., *J. Biol. Chem.* **234**, 2783 (1959).
20. Nickerson W.J., Strauss G., *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 5007 (1960).
21. Knobloch E., IV-th International Congress on Polarography, Prague Czechoslovakia, 1966.
22. Knowles A., Roe E.M.F., Abstr. VII Europ. Congr. Mol. Spectr. (1963), s. 183; Abstr. IV. Intern. Photobiol. Congress, Oxford, 59 (1964).
23. Kočent A., *Chem. Listy* **47**, 195, 652 (1953).
24. Kozioł J., *Photochem. Photobiol.* **5**, 55 (1966).
25. Moore W.M., Spence J.T., Raymond F.A., Colson S.D., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3367 (1963).
26. Oster G., Bellin J.S., Holmström B., *Experientia* **18**, 249 (1962).
27. Oster G.K., Oster G., Prati G., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 595 (1957).
28. Pirie A., *Nature* **186**, 352 (1960).
29. Rabinowitch E.J., *Photosynthesis and Related Photoprocesses*, tom I, New York 1945, str. 69.
30. Reinert J., *Zs. Bot.* **41**, 103 (1953).
31. Rutter W.J., *Acta Chem. Scand.* **12**, 438 (1958).
32. Shiga T., Piette L.M., *Photochem. Photobiol.* **3**, 213, 223 (1964).
33. Shiga T., Piette L.M., *Photochem. Photobiol.* **4**, 769 (1965).
34. Shugar D., *Bull. Soc. chim. biol.* **33**, 710 (1951).
35. Smith E.C., Metzler D.E., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3285 (1963).
36. Spikes D.J., Glad B.W., *Photochem. Photobiol.* **3**, 471 (1964).
37. Strauss G., Nickerson W.J., *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 3187 (1961).
38. Strehler B.L., *Arch. Biochem. Biophys.* **34**, 239 (1951).
39. Sukai K., *Chem. Abstr.* **50**, 11828 (1956).
40. Swallow A.J., *Nature* **176**, 793 (1955).
41. Tegnér L., Holmström B., *Photochem. Photobiol.* **5**, 223 (1966).
42. Terenin A., Tachin V., Shakhverdov, *Photochem. Photobiol.* **4**, 505 (1965).
43. Thimann K.V., *Photochem. Photobiol.* **3**, 463 (1964).

44. Thimann K., Curry G.M., w *Light and Life*, wyd. Mc Elroy W.D. and Glass B., The John Hopkins Press, Baltimore, 1961, str. 646—670.
45. Tukumachi C., Sakurai, *Vitamins (Kyoto)* 7, 939, 1014 (1954).
46. Whitby L.G., *Biochem. J.* 54, 437 (1953).
47. Wojtczak J., Kasprzyk T., *Przem. Spoż.* 18, 399 (1964).
48. Vernon L.P., *Biochim. Biophys. Acta* 36, 177 (1959).

IRENA PIETRZYKOWSKA*

Biologiczne skutki promieniowania UV u mikroorganizmów

Biological Effects of UV Radiation in Microorganisms

A review is given of biological inactivation of microorganisms under the influence of ultraviolet irradiation, and mechanisms the living cell disposes of for the repair of photochemical damage.

Działanie letalne i mutagenne promieni ultrafioletowych (UV) na mikroorganizmy związane jest ze zmianami fotochemicznymi w kwasach nukleinowych. Badania lat ostatnich prowadzone *in vitro* jak i *in vivo* przyczyniły się w znacznym stopniu zarówno do poznania natury uszkodzeń prowadzących do inaktywacji biologicznej, jak też do zrozumienia mechanizmów obrony mikroorganizmów wobec promieni UV. Artykuł ten poświęcony jest tym właśnie zagadnieniom.

Ponieważ w części omawiającej efekt biologiczny promieni UV będące powoływała się na mechanizmy reaktywacji, przed ich szczegółowym omówieniem wydaje się konieczne krótkie przedstawienie tych zjawisk. *In vitro* inaktywację DNA wywołaną UV można odwrócić działając promieniowaniem o długości fali 239 m μ (fotorewersja) lub pod wpływem światła widzialnego w obecności enzymu fotoreaktywującego (fotoreaktywacja enzymatyczna). Oba procesy powodują rozszczepienie dimerów pirymidyn. Fotoreaktywacja enzymatyczna bierze udział także w odwracaniu efektu letalnego *in vivo* w mikroorganizmach podobnie jak reaktywacja ciemna, która polega na enzymatycznym wycinaniu fotoproduktów z łańcucha DNA.

I. Fotoprodukty w kwasach nukleinowych a inaktywacja biologiczna

Główną rolę w procesie inaktywacji biologicznej pod wpływem UV przypisuje się dimerom pirymidyn powstającym w kwasach nukleinowych. Do niedawna jeszcze znano tylko dimery tyminy (\overline{TT}), ostatnio zaś wykazano (82, 83), że pod wpływem promieni UV, mogą powstawać w DNA dimery cytozyny (\overline{CC}) i uracylu (\overline{UU}), a także dimery mieszane

* Dr, adiunkt, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

tymina — cytozyna (TC) oraz tymina — uracyl (TU). Dimery TU oraz UU znajdujące w DNA są wynikiem deaminacji cytozyny. Wydaje się, że główną rolę w procesie inaktywacji biologicznej odgrywają dimery TT i TC. Świadczy o tym zarówno zależność między zawartością tyminy w mikroorganizmach, a ich wrażliwością na promienie UV (35), jak i fakt, że w DNA *E. coli* naświetlonym UV, 50% dimerów stanowią TT, 40% — TC, a tylko 10% dimery CC (82). W DNA naświetlonych bakterii wykazano, że ilość TT zależy od dawki UV (95). Poza tym obserwowano zanik TT w DNA transformującym po fotoreaktywacji enzymatycznej (94, 102) i po fotorewersji (77). Wykazano też w reaktywacji ciemnej wycinanie z łańcucha DNA oligonukleotydów zawierających TT (7, 81). Przytoczone fakty wyraźnie wskazują, że dimery, zwłaszcza tyminy, grają istotną rolę w inaktywacji biologicznej pod wpływem UV.

Są jednak obserwacje, że nie tylko dimery pirymidyn, ale również inne fotoprodukty w DNA mogą brać udział w inaktywacji biologicznej. Żaden ze znanych mechanizmów reaktywacji, w tym również fotoreaktywacja prowadząca do całkowitej monomeryzacji pirymidyn (75) nie daje 100% reaktywacji. U fagów T₄ po naświetleniu promieniami UV o długości fali 302 mμ, powstają w DNA fotoprodukty, które nie są usuwane przez fotoreaktywację enzymatyczną, a są usuwane przez występującą u tego faga reaktywację ciemną (U-gen. reaktywacja) (10). Znaczna trwałość dimerów, zwłaszcza tyminy, sprzyja wykrywaniu ich obecności w kwasach nukleinowych i na nich skupia uwagę, co nie wyklucza jednak, że inne fotoprodukty mniej trwałe i trudniejsze do wykrycia, mogą pojawiać się w DNA i również prowadzić do inaktywacji czy mutacji. Przykładem może być uwodniona cytozyna czy uracyl, których powstawanie pod wpływem UV zaobserwowano *in vitro* (84), ale których dotąd nie udało się wykryć w kwasach nukleinowych mikroorganizmów. *In vitro* uwodniona cytozyna ulega odwodnieniu pod wpływem podwyższonej temperatury lub w kwaśnym środowisku (84). Na podstawie termicznego odwrócenia skutków UV *in vivo* można by zatem wnioskować o udziale w nich fotohydratów cytozyny.

U mikroorganizmów inaktywowanych UV istotnie zaobserwowano zwiększenie przeżycia w podwyższonej temperaturze (2, 9), jednakże taka termiczna reaktywacja u bakterii jest najprawdopodobniej wynikiem działania mechanizmu reaktywacji ciemnej, a rola temperatury ogranicza się zapewne tylko do zahamowania wzrostu komórek, co ułatwia reaktywację ciemną przedłużając czas jej działania. Gdyby reaktywacja termiczna polegała istotnie na odwodnieniu cytozyny, należałoby się spodziewać reaktywacji termicznej wolnych bakteriofagów inaktywowanych UV, jednakże pozytywne wyniki uzyskano tylko po wnikięciu faga do komórki gospodarza (8, 60). Jedynym przykładem, który może świadczyć

o dehydratacji cytozyny jest termiczna reaktywacja indukowanej UV mutacji faga *Kappa Serratia marcescens*, zachodząca podczas ogrzewania faga wolnego (44).

Na znaczenie biologiczne uwodnienia cytozyny pod wpływem UV wskazują jednak wyniki badań nad syntetycznymi polinukleotydami (55). Kwas policytydylowy, użyty jako matryca dla polimerazy RNA, po naświetleniu promieniami UV zmienia swoje własności kodowania; zanika wówczas zdolność wbudowywania GTP, a w zamian wbudowywany jest ATP. Pierwotne właściwości poli C można przywrócić przez ogrzanie w podwyższonej temperaturze lub po obniżeniu *pH*, co jak wiadomo sprzyja dehydratacji cytozyny (84). Nie udało się jednak bezpośrednio wykazać w materiale biologicznym, że uwodniona cytozyna powoduje biologiczną inaktywację. Nie stwierdzono także w DNA natywnym zmian spektrofotometrycznych charakterystycznych dla uwodnionej cytozyny (80).

Na rolę uwodnienia cytozyny w procesie inaktywacji UV zwraca uwagę Sh u g a r (85). Sądzi on, że pierwszym efektem promieni UV w DNA może być uwodnienie cytozyny, co dawałoby rozluźnienie sztywnej struktury dwuniciowej DNA, które ułatwia dimeryzację reszt tyminy i cytozyny. Za takim poglądem przemawiają wyniki badań nad dwupasmowym poli A:U naświetlanym UV, gdzie jedyną, pierwszą reakcją jest uwodnienie uracylu, po której dopiero zaczyna się dimeryzacja (96) oraz obserwacje, że polimer A:rT, w którym nie ma możliwości hydratacji, jest znacznie bardziej odporny na działanie UV, niż polimer rT o strukturze nieuporządkowanej (92). Ostatnio wykryto uwodniony uracyl w naświetlonym promieniami UV poli U (58, 96).

Być może dalsze badania przy użyciu delikatniejszych metod pozwolą wykazać rolę uwodnionej cytozyny w inaktywacji czy mutacji wywołanej UV.

Dzisiaj jednak panuje ogólny pogląd, że głównym fotoproduktem powstającym w kwasach nukleinowych pod wpływem promieni UV są dimery pirymidyn i im przypisuje się główną rolę w inaktywacji biologicznej.

II. Skutki powstawania dimerów pirymidyn w DNA mikroorganizmów

Od dawna obserwowano, że w komórkach naświetlanych UV ulega zahamowaniu synteza DNA (46), przy czym zahamowanie to mogło być przejściowe lub też całkowite i trwałe, w zależności od dawki UV oraz indywidualnej wrażliwości szczepów bakteryjnych. Synteza białek i RNA okazały się mniej wrażliwe na działanie promieni UV, co sugerowało, że uszkodzenia powstające *in vivo* dotyczą głównie syntezy DNA.

W układach bezkomórkowych wykazano (5), że naświetlenie promieniami UV znacznie obniża zdolność DNA do działania jako matryca

w enzymatycznej syntezie DNA, chociaż nie hamuje jej całkowicie. DNA utworzone na tak zmienionej matrycy ma wyższy stosunek A/G. Na tej podstawie wnioskowano, że w enzymatycznej replikacji DNA miejsca, w których utworzyły się dimery pirymidyn są omijane, albo przez przerwanie syntezy łańcucha DNA w tym miejscu i podjęcie syntezy poza dimerami, albo też przez przyłączanie przypadkowych zasad w miejscu gdzie są dimery (*end addition*) (4). Po ominięciu dimeru replikacja odbywałaby się ponownie na matrycy DNA, co prowadziłoby do powstania pętli w nowo utworzonym łańcuchu DNA i mogłoby dać mutację w następnym cyklu replikacji. Na to, że uszkodzone miejsca w matrycowym DNA zawierały dimery pirymidyn, wskazuje częściowa fotorewersja efektu UV, a także większa wrażliwość DNA — matrycy na promieniowanie o długości fali 280 m μ , niż o długości 239 m μ . Badając różne DNA stwierdzono zależność pomiędzy wrażliwością funkcji matrycowych na UV, a zawartością sekwencji zawierających sąsiadujące cząsteczki tyminy. W DNA utworzonym na matrycy naświetlonej UV wykazano brak sekwencji zawierających sąsiadujące cząsteczki adeniny (78).

O udziale dimerów pirymidyn w blokowaniu syntezy DNA *in vivo* świadczą wyniki badań nad syntezą DNA w szczepach *E. coli* wrażliwych i opornych na UV. Wiadomo było, że szczepy odporne mają zdolność wycinania dimerów tyminy w okresie poprzedzającym ponowne podjęcie syntezy DNA po naświetleniu UV, natomiast szczepy wrażliwe tej zdolności nie posiadają (7, 81). Swenson i Setlow (89) wykazali, że po naświetleniu UV synteza DNA w szczepie wrażliwym jest zahamowana w sposób trwały w szczepach opornych, natomiast zahamowanie jest przejściowe.

Autorzy ci mierząc syntezę DNA ilością wbudowywanej [³H]-tymidyny stwierdzili, że w szczepie wrażliwym jest ona proporcjonalna do dawki UV. Synteza może odbywać się wzdłuż łańcucha DNA, tylko do miejsca, w którym znajduje się blok, a że ze wzrostem dawki maleje odcinek nie zawierający bloku, zatem zmniejsza się również ilość syntetyzowanego DNA. Natomiast w szczepach opornych, obdarzonych zdolnością wycinania dimerów czy innych fotoproduktów tworzących blok w replikacji DNA, po okresie przejściowego zahamowania, w czasie którego odbywa się usuwanie dimerów, zaczyna się synteza DNA na nowo. O dominującej roli dimerów pirymidyn w zahamowaniu syntezy DNA po naświetleniu UV świadczy możliwość odblokowania syntezy zarówno drogą reaktywacji ciemnej jak i fotoreaktywacji; ta ostatnia przywraca syntezę DNA także w szczepach wrażliwych. Oba procesy reaktywacji dotyczą wprawdzie usuwania dimerów, jednak reaktywacja ciemna jest jak się wydaje mało specyficzna i nie można wykluczyć, że usuwa także inne fotoprodukty. Swenson i Setlow zaobserwowali też, że inkubacja inaktywowanych komórek szczepu wrażliwego, przez okres pozwalający na syntezę

DNA do miejsca gdzie się znajduje blok, bardzo znacznie obniża wydajność fotoreaktywacji. Wskazywałoby to, że enzym fotoreaktywujący może rozszczepiać dimery blokujące syntezę DNA tylko zanim punkt replikacyjny DNA dojdzie do miejsca, w którym znajduje się blok, nie może zaś działać na dimer, który znajduje się w aktualnym punkcie replikacji.

Autorzy ci wykazali również, że dawki UV, które hamują syntezę DNA w szczepach wrażliwych nie wpływają bezpośrednio na syntezę RNA, ani białka, a zahamowanie tych syntez powodują dopiero znacznie wyższe dawki (200 ergów/mm²). W warunkach przywracających zdolność syntezy DNA wznowione zostają również syntezy RNA i białka w komórkach. Na niewielką wrażliwość syntez RNA i białka na promienie UV wskazywały także wcześniejsze badania nad fagami T-parzystymi. Fagi te inaktywowane nawet dużymi dawkami UV, zdolne są do indukcji syntezy specyficznych białek fagowych, chociaż synteza ich DNA jest zahamowana (12, 19, 26, 93).

III. Mechanizmy naprawy uszkodzeń wywołanych działaniem promieniowania UV w mikroorganizmach

1. Fotoreaktywacja

Fotoreaktywacja enzymatyczna. Spośród znanych dzisiaj procesów reaktywacji najwcześniej została zaobserwowana fotoreaktywacja (PR). Jako pierwszy fotoreaktywację zaobserwował Kelner w konidiach *Streptomyces griseus* (45), a zaraz po nim Dulbecco u fagów (20), później zaś okazało się, że jest to zjawisko bardzo powszechne, spotykane w wielu mikroorganizmach, a także u organizmów wyższych. Mikroorganizmy inaktywowane promieniami UV ulegają fotoreaktywacji jeśli poddać je działaniu światła widzialnego o długości fali powyżej 3200 Å; w tych warunkach przeżycie znacznie wzrasta w porównaniu z kontrolą utrzymywaną w ciemności.

Do poznania i wyjaśnienia mechanizmu fotoreaktywacji przyczyniły się głównie badania R u p e r t a i wsp. prowadzone *in vitro* na modelu DNA transformującego. Inaktywowany promieniami UV DNA transformujący, poddany następnie działaniu światła widzialnego o długości fali powyżej 3200 Å, w obecności ekstraktu komórkowego z *E. coli* lub z drożdży, odzyskiwał w znacznym stopniu aktywność transformującą (29). Dalsze badania (64, 65, 66, 67) wyjaśniły, że fotoreaktywacja jest reakcją enzymatyczną. Enzym fotoreaktywujący (enzym PR) wykazuje specyficzność w stosunku do DNA naświetlonego UV (DNA-UV), nie jest natomiast specyficzny gatunkowo. Można uzyskać fotoreaktywację DNA z *H. influenzae* czy też z fagów przy użyciu enzymu z drożdży lub z *E. coli*.

Specyficzność enzymu PR wobec DNA-UV wykazano na drodze badania kompetycji przez obcy DNA. Metoda ta opracowana przez R u -

perta (64) oddała ogromne usługi w badaniach nad fotoreaktywacją. Stwierdzono, że obcy DNA może konkurować o enzym PR w układzie zawierającym DNA transformujący inaktywowany promieniami UV, tylko wtedy gdy był uprzednio naświetlony UV. Jeśli natomiast konkurujący DNA-UV podda się uprzedniej fotoreaktywacji przestaje wykazywać własności konkurowania, ponieważ preinkubacja w świetle zniósła efekt UV i przestał on być substratem dla enzymu PR.

Działanie kompetycyjne DNA-UV *in vivo* wykazali w procesie fotoreaktywacji fagów Harm i Hillebrandt (34). Zakażali oni komórki bakteryjne dwoma fagami różniącymi się markerami genetycznymi, z których jeden był inaktywowany promieniami UV w nieznacznym stopniu, a drugi bardzo silnie. Przeżycie faga mniej inaktywowanego po fotoreaktywacji było znacznie obniżone przez obecność DNA-UV faga drugiego. Podobne działanie kompetycyjne w fotoreaktywacji faga może mieć DNA-UV komórki gospodarza (50).

Substratem dla enzymu PR może być DNA-UV, zarówno dwuniciowy jak i jednoniciowy, naturalny pochodzący z faga Φ X174 lub uzyskany po denaturacji DNA dwuniciowego (68), a także syntetyczny poli dC (76), a więc struktura drugorzędowa DNA nie wydaje się mieć istotnego znaczenia w procesie fotoreaktywacji. Enzym PR i DNA-UV tworzą kompleks, który jest trwały w ciemności, a ulega dysocjacji pod wpływem światła widzialnego (67), co świadczy, że enzym uwalnia się z kompleksu po rozszczepieniu dimerów pirymidyn w DNA-UV.

Opracowanie metody kompetycji jak również fakt, że enzym PR ulega inaktywacji cieplnej oraz inaktywacji przez jony metali ciężkich tylko w stanie wolnym pozwoliły rozszerzyć badania nad fotoreaktywacją *in vitro* i wykazać, że tylko DNA-UV lub syntetyczne polidezoksyrybonukleotydy naświetlone UV są substratem dla enzymu PR, natomiast nie są nimi RNA-UV (68), ani syntetyczne polirybonukleotydy (poli A-U i poli AU-GC). Biorąc pod uwagę, że DNA faga SP2 *B. subtilis* zawierający uracyl w miejsce tyminy po naświetleniu UV staje się substratem dla enzymu PR, zarówno w formie natywnej jak i zdenaturowanej, natomiast nie jest substratem naturalny ani syntetyczny RNA-UV, Rupert i Harm (70) są zdania, że istotną rolę w wiązaniu się substratu z enzymem PR, odgrywa raczej grupa hydroksylowa przy C-2 w cząsteczce cukru niż grupa metylowa tyminy.

Izolowanie mutantów phr^- nie zdolnych do fotoreaktywacji i wykorzystanie ich ekstraktów do badań nad fotoreaktywacją w układach *in vitro* przyczyniło się do wykazania, że enzym PR odgrywa istotną rolę w procesie fotoreaktywacji *in vivo*. Niezdolność mutantów phr^- do fotoreaktywacji jest wynikiem braku enzymu PR, a nie obecności inhibitora. Rupert (69) wykazał bowiem, że mieszanina ekstraktów z komórek phr^- i phr^+ w stosunku 1:1 daje reaktywację taką, jak dwukrotnie roz-

cieńczony wodą ekstrakt z phr^+ , a ekstrakt z samego phr^- nie daje fotoreaktywacji w ogóle.

Enzymatyczny charakter procesu fotoreaktywacji potwierdzono ostatnio (53) izolując i oczyszczając 5000 razy enzym PR. Enzym ten po oczyszczeniu ma barwę różową i wykazuje dwa maxima absorpcji przy 415 i 520 m μ .

Fotoreaktywacja pośrednia. Dzięki istnieniu mutantów phr^- wykazano (40), że poza fotoreaktywacją enzymatyczną istnieje reaktywacja pod wpływem światła widzialnego nie wymagająca enzymu. Proces ten, nazwany fotoreaktywacją pośrednią, zachodzi tylko w całych komórkach, nie zachodzi natomiast *in vitro* w ekstraktach i jak się wydaje jest on podobnie jak fotoprotekcja związany raczej z procesem reaktywacji ciemnej. Działanie światła w fotoreaktywacji pośredniej opóźnia podziały komórek (41), co sprzyja działaniu mechanizmu reaktywacji ciemnej.

Rodzaj uszkodzeń w DNA usuwanych drogą fotoreaktywacji. Pierwsze sugestie, że w procesie fotoreaktywacji usuwane są z naświetlonego DNA dimery tyminy, pochodzą z wspomnianych już doświadczeń, które wykazały, że dimery tyminy znikają z DNA-UV po działaniu światłem widzialnym w obecności wyciągu z komórek zawierającego enzym fotoreaktywujący, i że zanikowi dimerów towarzyszy wzrost aktywności biologicznej DNA (94, 102). Następnie (77) wykazano, że fotoreaktywacja enzymatyczna i fotorewersja naprawiają te same uszkodzenia w DNA-UV; preparat maksymalnie fotoreaktywowany w obecności enzymu, nie jest więcej reaktywowany przez promieniowanie o długości fali 239 m μ , a wiadomo, że przy tej długości fali następuje rozszczepienie dimerów (77). Świadczy to wyraźnie, że dimery są miejscem działania enzymu fotoreaktywującego.

Stosując metodę R u p e r t a kompetycji DNA-UV o enzym fotoreaktywujący do badań nad fotoreaktywacją syntetycznych polinukleotydów stwierdzono, że nie tylko dimery tyminy, ale także dimery cytozyny i uracylu są eliminowane w procesie fotoreaktywacji oraz, że dimery powstają w polinukleotydach, które mają sąsiadujące cząsteczki tyminy lub cytozyny (76). Zdolność do kompetycji mają bowiem tylko polimery dA-dT i dG-dC, nie mają jej natomiast polimery mieszane dAT-dAT ani dGC-dGC.

Enzym fotoreaktywujący może wprowadzić rozszczepiać dimery wszystkich pirymidyn, łatwiej i szybciej rozszczepia jednak dimery tyminy niż pozostałe z tym, że dimery mieszane $\overline{\text{TC}}$ i $\overline{\text{TU}}$ lepiej niż $\overline{\text{CC}}$ i $\overline{\text{UU}}$ (76). Ponadto wykazano, że podatność DNA-UV na fotoreaktywację zależy od zawartości w nim tyminy (74). Ustalono też, że w DNA z *E. coli* naświetlonych niedużymi dawkami UV, 50% powstałych dimerów stanowią dimery $\overline{\text{TT}}$, 40% dimery $\overline{\text{TC}}$ i 10% dimery $\overline{\text{CC}}$, a więc udział tyminy

w dimeryzacji (70%) jest znacznie większy niż cytozyny 30%. Przy dawkach wyższych udział tyminy w dimeryzacji wzrasta (82). O tym, że dimery tyminy odgrywają istotną rolę w procesie fotoreaktywacji świadczy także fakt, że podstawienie do DNA w miejsce tyminy jej analogu 5-bromouracylu znacznie obniża fotoreaktywację. Obniżenie to jest tym większe, im więcej tyminy zastąpi się 5-bromouracylem (30, 65, 87). 5-bromouracyl tworzy dimery innego typu niż dimery pirymidyn naturalnych (86).

Tak więc dzisiaj uważa się, że fotoreaktywacja enzymatyczna polega na rozszczepianiu dimerów pirymidyn, które są odpowiedzialne za inaktywację biologiczną z tym, że udział dimerów tyminy jest znacznie wyższy niż cytozyny. O tym, że fotoreaktywacja dotyczy wyłącznie rozszczepiania dimerów świadczyć może także fakt iż zmiany w sporach bakteryjnych lub w fagach naświetlonych UV w stanie suchym, a więc w warunkach, w których nie dochodzi do powstawania dimerów, nie ulegają fotoreaktywacji (13, 36).

Do niedawna o rozszczepianiu dimerów do monomerów w procesie fotoreaktywacji wnioskowano jedynie z faktu, że dimery tyminy znikają z DNA-UV po fotoreaktywacji i DNA odzyskiwał aktywność biologiczną. Ostatnie badania (76) dostarczyły pewnych dowodów, że dimery po rozszczepieniu powracają do cząsteczek wyjściowych. W fotoreaktywowanym DNA-UV znaleziono mianowicie uracyl, a ponieważ dimery cytozyny w podwyższonej temperaturze (a nawet w 37°) ulegają deaminacji przechodząc w dimery uracylu, obecność uracylu świadczyłaby o rozszczepianiu do monomerów. Poza szczególnym przypadkiem wspomnianego już faga SP2 *B. subtilis*, uracyl jak wiadomo, normalnie nie występuje w DNA.

Fotoreaktywacja DNA zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* nie prowadzi do całkowitej reaktywacji, mimo że stwierdzono całkowicie usuwanie dimerów z DNA (75), co wskazuje, że poza dimerami pirymidyn powstają inne fotoprodukty, nie podlegające fotoreaktywacji. S e t l o w (75) zwracając uwagę, że nie wykryto dotąd w materiale biologicznym obecności uwodnionej cytozyny, nie sądzi, aby ten związek grał rolę w procesie nieodwracalnej inaktywacji i sugeruje, że mogą powstawać pewne ilości dimerów cytozyny, które ze względu na sąsiedztwo przyległych nukleotydów są trudniej rozszczepiane przez enzym fotoreaktywujący. O powstawaniu w DNA fotoproduktów nie podlegających fotoreaktywacji, świadczyć może także sumowanie się efektów fotoreaktywacji i termoreaktywacji. Fagi T2 i T4 inaktywowane UV poddane najpierw termoreaktywacji, a następnie fotoreaktywacji wykazują dwa razy większe przeżycie niż po samej fotoreaktywacji lub samej termoreaktywacji (60a).

Fotoreaktywacja wirusów RNA. Fotoreaktywacja wirusów zawierających RNA (roślinnych, zwierzęcych i bakteryjnych) jest możliwa,

jednak mechanizm jej nie został jeszcze wyjaśniony. Są wątpliwości czy można fotoreaktywację RNA porównywać z fotoreaktywacją w DNA. W wyniku naświetlania uracylu promieniami UV powstają dwa różne fotoprodukty: dimery oraz uwodniony uracyl (84). Wykazano też obecność dimerów uracylu w RNA (73a). K l e c z k o w s k i (47) badając fotoreaktywację infekcyjnego RNA wirusa mozaiki tytoniowej inaktywowanego promieniowaniem UV o długości fali 285 m μ (optymalnej dla powstawania dimerów) nie uzyskał reaktywacji po naświetleniu promieniami o długości fali 239 m μ i stąd wnioskował, że dimery w RNA nie powstają, a przynajmniej nie są przyczyną efektu letalnego. S e t l o w (75) twierdzi, że stosowana przez Kleczkowskiego dawka inaktywująca jest około 10 razy za mała, aby można było uzyskać fotorewersję i uważa, że jego wyniki nie mogą być dowodem braku dimeryzacji. Argument Setlow potwierdza jednak wnioski Kleczkowskiego, że dimery nie biorą udziału w inaktywacji wirusa TMV, bowiem dawka zbyt mała według Setlow, aby powstały dimery, powodowała mimo to inaktywację wirusa. Świadczy to, że inaktywację wywołały inne fotoprodukty w RNA, których powstanie wymaga niższych dawek niż dimeryzacja. Pozostaje więc sprawą otwartą jaki typ fotoproduktów w wirusach zawierających RNA podlega fotoreaktywacji.

Enzym PR reaktywujący DNA nie bierze udziału w fotoreaktywacji RNA. Świadczy o tym zarówno fakt, że fagi RNA nie są reaktywowane w szczepie phr⁺ (98) jak i to, że enzym PR nie wiąże się z RNA-UV (68). R u p e r t i H a r m (70) przypuszczają, że fotoreaktywacja obserwowana u wirusów RNA może być wynikiem fotoreaktywacji pośredniej (40) albo też bierze tu udział zupełnie inny fotoenzym.

Warto tu może podkreślić, że fotoreaktywację niektórych wirusów RNA, uzyskać można tylko w tym przypadku jeśli naświetla się promieniami UV izolowany RNA infekcyjny lub kompleks wirus-bakteria natomiast fotoreaktywacji nie uzyskuje się po inaktywacji wirusa całego (61). Fakt ten sugerować może udział reaktywacji ciemnej wymagającej dwuniciowej formy replikacyjnej RNA, bądź też powstawanie podczas inaktywacji całego wirusa połączeń między białkiem i RNA, uniemożliwiających fotoreaktywację. Ostatnio (28a) wykazano powstawanie takich bardzo trwałych połączeń w wyniku naświetlenia UV wirusa mozaiki tytoniowej.

2. Reaktywacja ciemna

Od dawna obserwowano, że fagi i bakterie inaktywowane promieniami UV mogą ulegać reaktywacji w ciemności. I tak zauważono, że niektóre fagi są stosunkowo mało wrażliwe na promienie UV, natomiast ich wrażliwość na promienie X lub rozpad ³²P jest znaczna. Później okazało się, że uszkodzenia wywołane w tych fagach promieniami UV, są

naprawiane. Ponieważ naprawa fagów zachodziła wewnątrz komórki gospodarza nazwano ją HCR (*host cell reactivation*). Reaktywację tego typu obserwowano u fagów, których DNA było podobne w składzie do DNA gospodarza sądzono zatem, że polega ono na wymianie uszkodzonych segmentów DNA faga przez nieuszkodzone homologiczne segmenty DNA gospodarza na drodze rekombinacji. Wykazano też, że mniejsza wrażliwość na promienie UV faga T4 niż pokrewnego faga T2 wynika ze zdolności faga T4 do reaktywacji kontrolowanej przez gen fagowy nazwany u-genem; zjawisko to nazwano u-gen reaktywację. Ani HCR ani u-gen reaktywacja nie wymagały udziału światła. Natomiast u bakterii naświetlonych UV od dawna obserwowano większe przeżycie w uboższym niż w bogatym podłożu.

Wyjaśnienie mechanizmu reaktywacji ciemnej przyniosły dopiero badania lat ostatnich nad wrażliwymi mutantami szczepów *E. coli* B oraz *E. coli* K12. Przeżywalność mutantów wrażliwych na promienie UV (*E. coli* B/s oraz *E. coli* K12 hcr⁻) w odróżnieniu od opornych nie zależy od warunków środowiska, w których znajdują się one po inaktywacji UV. Mutanty wrażliwe nie są też zdolne do HCR. Jak się ostatecznie okazało są one pozbawione mechanizmu reaktywacji ciemnej.

Carrier i Setlow (81) przeprowadzili badania na szczepie *E. coli* B oraz jego mutancie opornym B/r i wrażliwym B/s. DNA bakterii było znakowane [³H]-tyminą. Stwierdzili oni, że naświetlenie UV w dawce 200 ergów całkowicie i trwale hamowało syntezę DNA w szczepie wrażliwym, natomiast w szczepie opornym zahamowanie było przejściowe i po pewnym czasie inkubacji w ciemności synteza DNA była podejmowana na nowo. W tym czasie u szczepu opornego pojawiała się [³H]-tymina we frakcji kwasorozpuszczalnej, czego nie stwierdzono u szczepów wrażliwych. Radioaktywność pojawiająca się we frakcji kwasorozpuszczalnej była związana z dimerami tyminy, których obecność wykazano chromatograficznie. Wskazywało to, że mechanizm reaktywacji ciemnej dotyczy przede wszystkim wycinania dimerów. Wniosek ten potwierdziły dalsze doświadczenia. Okazało się mianowicie, że szczep *E. coli* B/r (oporny), w którym nastąpiło usunięcie dimerów w procesie reaktywacji ciemnej, nie wykazuje już fotoreaktywacji, natomiast mutant B/s (wrażliwy), w którym dimery pozostały we frakcji nierozpuszczalnej w kwasie po inkubacji w ciemności, ulega jeszcze fotoreaktywacji. Dimery tyminy podczas reaktywacji ciemnej są wycinane w postaci oligonukleotydów. Świadczy o tym fakt, że aby uzyskać rozdział chromatograficzny dimerów należało frakcję kwasorozpuszczalną uprzednio zhydrolizować. Usuwanie dimerów w szczepie B/r zakończone jest przed wznowieniem syntezy DNA. Podobne wyniki uzyskali Boyce i Howard-Flanders (7) na szczepach *E. coli* K12 UVR⁺ i UVR⁻.

Boyce i Howard-Flanders, a także Setlow i Carrier

dyskutując możliwy mechanizm reaktywacji ciemnej, uważali wycinanie dimerów za jeden z początkowych etapów i sugerowali, że w następnych etapach tego procesu, w miejsce usuniętych nukleotydów wbudowywane są nowe. Pettijohn i Hanawalt (59) potwierdzili w całej pełni to przypuszczenie. Wykazali oni w *E. coli* 15T⁻ inkubowanym w obecności 5-bromouracylu po naświetleniu UV, że w początkowym okresie syntezy DNA, następuje przypadkowe wbudowywanie 5-bromouracylu w krótkie jednopasmowe odcinki w różnych miejscach łańcucha DNA. Wykazali, że w procesie reaktywacji ciemnej jako matryca dla syntezy fragmentów zastępczych wstawianych w miejsce wyciętych służy nieuszkodzony na tym odcinku komplementarny łańcuch DNA. Wskazuje na to również obserwacja (72), że fag ΦX 174, zawierający jednoniciowy DNA podlega reaktywacji ciemnej tylko wtedy, gdy jest inaktywowany w dwuniciowej formie replikacyjnej. Formę tę przyjmuje on po infekcji w komórce gospodarza. Reaktywację ciemną dwuniciowej formy DNA ΦX 174 uzyskano też *in vitro* w obecności ekstraktu *Micrococcus lysodeicticus* (63). Dopiero po takiej lokalnej niekonserwatywnej syntezie dającej naprawę uszkodzeń, następuje normalna semikonserwatywna replikacja DNA.

Badania *in vitro* nad reaktywacją ciemną DNA transformującego z *H. influenzae* przy użyciu wyciągu z komórek *M. lysodeicticus* rozpoczęto niedawno (21, 22). Ostatnio metodą kompetycji Ruperta wykazano (52), że wyciąg z *M. lysodeicticus* zawiera enzym degradujący specyficznie DNA-UV. Enzym ten hamowany kompetycyjnie przez inne DNA-UV bierze prawdopodobnie udział w procesie reaktywacji ciemnej.

Reaktywacja ciemna może przebiegać w warunkach zahamowania syntezy białka i RNA (chloramfenikolem i azauracylem) (78), natomiast hamują ją inhibitory procesów energetycznych (dwunitrofenol, jodoocetan). Specyficznymi inhibitorami reaktywacji ciemnej są kofeina i akryflawina (27, 73). Mechanizm ich działania nie jest znany. Ponieważ kofeina nie wpływa na fotoreaktywację, należy sądzić, że nie tworzy ona kompleksu z DNA-UV, a być może działa na enzymy biorące udział w reaktywacji ciemnej.

Wcześniejsze obserwacje, że chloramfenikol, a także warunki środowiska (na przykład ubogie podłoże) zwiększają przeżycie bakterii inaktywowanych UV znalazły dopiero teraz wyjaśnienie w świetle badań Hanawalta (33). Stwierdził on, że wrażliwość wobec promieni UV, szczepów opornych, zdolnych do reaktywacji ciemnej, zależy od aktualnego stanu syntezy DNA w komórkach. Mutanty wrażliwe nie wykazują takiej zależności. Hanawalt sądzi, że u szczepów opornych warunki pozwalające tylko na dokończenie rozpoczętego cyklu replikacji DNA, ale nie pozwalające na rozpoczęcie nowego cyklu (zahamowanie syntezy białka czy RNA) umożliwiają reperację ciemną. Sugeruje on, że rozpo-

częście syntezy DNA przed ukończeniem reperacji prowadzi do efektu letalnego. Jak już wspomniano sytuacja jest podobna w przypadku fotoreaktywacji szczepów wrażliwych (89).

Niespecyficzność procesu reaktywacji ciemnej. Proces reaktywacji ciemnej w przeciwieństwie do fotoreaktywacji enzymatycznej jest niespecyficzny.

Pewne obserwacje wskazują, że podczas reaktywacji ciemnej poza dimerami mogą być usuwane także inne fotoprodukty. Reaktywacja ciemna faga T1 usuwa 83% uszkodzeń letalnych, fotoreaktywacja — 80%, a oba te procesy łącznie eliminują 95% uszkodzeń (23). Biorąc pod uwagę, że podczas fotoreaktywacji usuwane są wszystkie dimery (75) wydaje się, że 15% uszkodzeń stanowią inne fotoprodukty, usuwane w procesie reaktywacji ciemnej. W DNA fagów T-parzystych, pod wpływem promieniowania o długości fali 302 mμ powstają fotoprodukty, które są usuwane podczas reaktywacji ciemnej (u-gen reaktywacja), a nie są eliminowane przez fotoreaktywację (10). Również niektóre, wywołane działaniem UV, zmiany w DNA, prowadzące do mutacji są naprawiane w ciemności, a nie są fotoreaktywowane.

Proces reaktywacji ciemnej może także usuwać uszkodzenia w DNA wywołane czynnikami chemicznymi. Wrażliwość bakterii wobec promieni UV jest skorelowana z ich wrażliwością na czynniki chemiczne działające na kwasy nukleinowe takie jak mitomycyna C (97), iperyt azotowy i siarkowy (103), HNO₂ i inne związki alkilujące. Skutki biologiczne zmian wywołanych tymi czynnikami w DNA są zbliżone do skutków promieni UV (mutageneza, tworzenie form długich, indukcja faga lizogennego, inaktywacja DNA transformującego, czy zahamowanie syntezy DNA). Warunki zwiększające przeżycie bakterii inaktywowanych UV, jak podwyższona temperatura czy ubogie podłoże wpływają tak samo na bakterie inaktywowane mitomycyną C, iperytem azotowym, azaseryną i innymi czynnikami radiomimetycznymi (104). Jak wiadomo podwyższona temperatura i ubogie podłoże stymulują reaktywację ciemną. Stosując [³H]-5-bromouracyl, podobnie jak w badaniach nad reaktywacją ciemną po UV, wykazano, że bakterie inaktywowane iperytem azotowym są reaktywowane przez usuwanie miejsc uszkodzonych z ich DNA i wstawianie nowych uzupełniających nukleotydów oraz, że bezpośrednio po inaktywacji iperytem następuje częściowa niekonserwatywna replikacja DNA, zupełnie analogicznie jak po UV (32).

Naprawa uszkodzeń wywołanych czynnikami chemicznymi poprzez mechanizm reaktywacji ciemnej wykazuje ogromną niespecyficzność tego procesu. Dotyczy on zmian powstałych nie tylko w pirymidynach ale i w purynach, gdyż iperyt azotowy i inne czynniki alkilujące powodują powstawanie wiązań poprzecznych w DNA, przez alkilację dwóch cząstek guaniny w pozycji N₇ (28). Wiązania te znikają z DNA podczas inku-

bacji bakterii traktowanych iperytem (48) czy mitomycyną (49, 91). Mahler zapowiada publikację wykazującą, że oczyszczony enzym z *Micrococcus lysodeicticus* degraduje specyficznie DNA-UV i DNA traktowany mitomycyną C, nie działa natomiast na DNA natywny. W wyciągach z komórek tego drobnoustroju wcześniej już (88) wykazano obecność nukleazy działającej specyficznie na DNA-UV oraz DNA uszkodzone przez czynniki alkilujące, nie wiązano jednak jeszcze jej działania z mechanizmem reaktywacji ciemnej.

Podobny okazał się również sposób naprawy uszkodzeń występujących po głodzie tyminowym (57). Wszystko to wskazuje na istnienie ogólnego mechanizmu, naprawiającego wszelkie uszkodzenia powstałe z DNA pod wpływem różnych czynników. Hanawalt i Haynes (32) uważają, że działanie takiego mechanizmu nie jest związane specyficznie ze zmianami powstałymi w zasadach, ale raczej ze zmianami struktury drugorzędowej DNA. Dzięki temu mechanizmowi według nich możliwe byłoby wykrywanie przypadkowych błędów w łączeniu się zasad w pary i zapobieganie ewentualnym mutacjom. Szczepy pozbawione takiego mechanizmu mogłyby wykazywać bardzo wysoką frekwencję mutacji. Autorzy ci zapowiadają dalsze badania w tym kierunku.

Wpływ podstawienia 5-bromouracylu do DNA na proces reaktywacji ciemnej. Od dawna obserwowano, że zarówno fagi (87) jak i bakterie (30) u których tymina w DNA została zastąpiona przez 5-bromouracyl lub 5-jodouracyl, są bardzo wrażliwe na działanie UV i nie są zdolne do fotoreaktywacji ani reaktywacji ciemnej. Ponieważ podstawienie 5-bromouracylu zwiększa wrażliwość na UV tylko w szczepach opornych, a we wrażliwych nie, wiązano to zjawisko z mechanizmem reaktywacji ciemnej. Ostatnio okazało się (3, 6), że bakterie, w których tymina została zastąpiona przez 5-bromouracyl, uwalniają fragmenty DNA do frakcji kwasorozpuszczalnej w czasie inkubacji po naświetleniu UV, ale nie są zdolne do wbudowywania fragmentów zastępczych. Przypuszcza się, że obecność 5-bromouracylu w DNA zakłóca regulację procesów degradacji i syntezy DNA w komórce i niekontrolowane wycinanie fotoproduktów z DNA przez enzymy systemu reperacji ciemnej prowadzi do degradacji znacznej części DNA i w konsekwencji do śmierci komórek.

Korelacje między reaktywacją ciemną a rekombinacją genetyczną. Pierwsze sugestie, że rekombinacja i reaktywacja ciemna mogą mieć wspólne etapy, pochodzą z badań nad mutantem *E. coli* K12 wrażliwym na UV i niezdolnym do rekombinacji genetycznej (11). Obie cechy okazały się regulowane przez wspólny gen, ponieważ rewersja mutacji rec^- do rec^+ dawała jednocześnie rewersję z UV^s do UV^r . O powiązaniu między wrażliwością na UV, a zdolnością do rekombinacji u *E. coli* K12 donosili również inni badacze (24, 38, 39). Korelacja taka wydaje się dość

powszechna, wykazano bowiem, że markery genetyczne w transformującym DNA *Hemophilus influenzae*, które są najmniej wydajnie reaktywowane w procesie reaktywacji ciemnej, są też z najniższą częstotliwością wbudowywane do genomu biorcy (56). Również w układzie transformującym, u *Bacillus subtilis* stwierdzono, że szczepy wrażliwe na UV i mitomycynę C mają zmniejszoną zdolność do transformacji, z tym że dotyczy to bardziej wbudowywania DNA niż jego wnikania do komórki (54).

W świetle tych wyników staje się bardziej zrozumiały od dawna obserwowany stymulujący efekt promieni UV, mitomycyny C oraz innych czynników alkilujących na częstotliwość rekombinacji fagów i bakterii. Czynniki, które pobudzają komórkę do wycinania pewnych segmentów chromosomu mogą zwiększyć szansę rekombinacji na drodze „breakage and reunion” (pęknięcie i ponowne połączenie się).

Reaktywacja ciemna a inne rodzaje reaktywacji spotykane u fagów i bakterii. Ponieważ reaktywację fagów i bakterii inaktywowanych promieniami UV obserwowano w różnych warunkach, w literaturze spotyka się różne nazwy tego zjawiska jak: UV-reaktywacja (reaktywacja faga, która zachodzi w komórkach naświetlonych uprzednio promieniami UV), u-gen i x-gen reaktywacja (kierowane przez geny wnoszone przez faga T4) czy też u bakterii reaktywacja termiczna, reaktywacja w podłożu płynnym, reaktywacja w zależności od podłoża, fotoprotekcja. Może to sugerować, że istnieje bardzo wiele mechanizmów obrony mikroorganizmów przed działaniem UV. Dzisiaj wydaje się, że wszystkie wspomniane wyżej rodzaje reaktywacji można sprowadzić do jednego ogólnego mechanizmu reaktywacji ciemnej. Opisywane warunki obniżają szybkość procesów metabolicznych w komórce lub hamują je, dzięki czemu skuteczniej działa mechanizm reaktywacji ciemnej. Przykładem podobieństwa mechanizmów reaktywacji ciemnej i reaktywacji spotykanych u fagów może być u-gen reaktywacja, która jak wykazano również dotyczy wycinania dimerów z DNA faga, z tym, że enzym wycinający jest regulowany przez genom faga (31, 79).

A zatem wydaje się, że istnieją w przyrodzie dwa zasadnicze mechanizmy obrony mikroorganizmów przed działaniem letalnym i mutagennym promieni UV: fotoreaktywacja enzymatyczna i reaktywacja ciemna.

IV. Mutagenne działanie promieni UV

Omawiane dotąd efekty promieniowania UV na organizmy żywe oraz mechanizmy obronne dotyczyły efektu letalnego. Wiadomo jednak, że promieniowanie UV wykazuje poza działaniem letalnym, także działanie mutagenne. Mechanizm mutagennego działania promieni UV jest jak dotąd mało wyjaśniony.

Zasadniczo wyklucza się bezpośredni udział dimerów pirymidyn w mutagenezie, ponieważ powodują one zahamowanie syntezy DNA,

co prowadzi do efektu letalnego. Wydaje się, że przynajmniej w niektórych przypadkach przyczyną działania mutagennego może być uwodniona cytozyna. Świadczyć o tym może omawiana na początku tego artykułu termiczna reaktywacja indukowanej UV mutacji faga *kappa Serratia marcescens*, uzyskana poza komórką gospodarza (44), chociaż jest to jak dotąd jedyna obserwacja tego rodzaju.

Do poznania przyczyn letalnych skutków promieni UV wiele wniosły badania nad mechanizmami reaktywacji. Natomiast badania nad odwracaniem efektu mutagennego promieni UV przez reaktywację nie przyczyniły się jak dotąd do bliższej identyfikacji fotoproduktów odpowiedzialnych za mutację.

Stwierdzono w przeważającej większości badanych mutacji, że są one niewrażliwe na fotoreaktywację enzymatyczną, specyficzną dla dimerów pirymidyn, podlegają natomiast mechanizmowi reaktywacji ciemnej. Wyniki te potwierdzają, że większość badanych mutacji nie jest powodowana przez dimery, ale ponieważ reaktywacja ciemna jest procesem bardzo niespecyficznym i może eliminować uszkodzenia o bardzo różnym charakterze, nie pozwalają na identyfikację fotoproduktu odpowiedzialnego za mutację.

Wyniki badań, w których stosowano inhibitory reaktywacji ciemnej wskazują, że proces ten może odwracać zmiany mutacyjne u bakterii wywołane działaniem UV. Kofeina i akryflawina dodane po naświetleniu UV znacznie podwyższają częstość występowania mutacji (99, 100). Akryflawina hamuje fotoreaktywację potencjalnych mutacji do prototrofii, nie hamuje natomiast fotoreaktywacji efektu letalnego (101). Świadczy to, że różne fotoprodukty są odpowiedzialne za te dwa efekty, a także wskazuje, że fotoreaktywacja mutacji jest właściwie stymulowaną przez światło reaktywacją ciemną, a nie fotoreaktywacją enzymatyczną. Wydaje się więc, że mutacje do prototrofii są wywoływane przez fotoprodukty eliminowane częściowo przez mechanizm reaktywacji ciemnej. Natomiast przyczyną mutacji w kierunku oporności wobec streptomycyny są prawdopodobnie dimery, ponieważ mutacja ta podlega fotoreaktywacji enzymatycznej (43).

Interesujące wydają się wyniki badań Drake (18) nad fotoreaktywacją UV-indukowanych mutacji faga T4r. Mutacje r faga T4 są dwójakiego typu: mutacja przez tranzycję, dająca zmianę pary zasad oraz mutacja tak zwana „sign” powstająca przez delecję lub addycję kilku par zasad (14—17, 37). Drake badał wpływ fotoreaktywacji enzymatycznej na UV-indukowane mutacje, używając faga T4rv, który nie posiada genu warunkującego reaktywację ciemną. Stwierdził on, że 60% mutacji przez tranzycję i 55% mutacji przez delecję lub addycję ulegało fotoreaktywacji, co pozwala przypuszczać, że były to zmiany wywołane przez dimeryzację.

W jaki sposób mogą powstawać mutacje indukowane przez promienie UV? Jak dotąd wiemy, zmiany fotochemiczne w DNA są wynikiem dimeryzacji tyminy i cytozyny oraz uwodnienia cytozyny. Uwodniona cytozyna w DNA-UV może być powodem mutacji typu tranzycji z dwóch racji: może na skutek uwodnienia zmieniać zdolność do łączenia się w pary (18) lub też może ulegać spontanicznej dezaminacji do uracylu (27, 42). W obu wypadkach zachodziłaby zmiana pary zasad GC w AT w następnym cyklu replikacji DNA. Omawiane wcześniej badania (55) zdają się przemawiać za taką możliwością.

Zdimeryzowana cytozyna natomiast, mogłaby dawać mutacje typu tranzycji, ponieważ w tej postaci także ulega dezaminacji (27) oraz mogłaby dawać, podobnie zresztą jak i zdimeryzowana tymina, mutacje przez delecję lub addycję jeśli by przyjąć, że w naturze zachodzi sytuacja podobna do obserwowanej w układzie *in vitro* przez Bolluma i Setlowa (5), którzy badali syntezę DNA na matrycy naświetlonej UV.

Z doświadczeń Drake wynika, że 60% mutacji typu tranzycji w fagu T4r, które dają się fotoreaktywować, jest powodowana przez zdimeryzowaną cytozynę, która uległa dezaminacji, ponieważ przynajmniej jak dotąd, nie udało się wykazać, że uwodniona cytozyna ulega fotoreaktywacji enzymatycznej. Pozostałe 40% mutacji typu tranzycji można by przypisać uwodnionej cytozynie. Natomiast mutacje typu delecji lub addycji w 55% powodowane byłyby przez dimery tyminy lub cytozyny, reszta zaś przez nieznanne fotoprodukty.

Wydaje się, że wykluczanie udziału dimerów w procesie mutacji indukowanej przez promienie UV nie jest słuszne. O udziale ich świadczą mogą zarówno wspomniane już doświadczenia nad UV-mutacją w kierunku oporności na streptomycynę (43), jak i wyniki Drake. Poza tym, jak dotąd, badania nad UV-indukowaną mutacją prowadzono na zbyt ograniczonej liczbie cech genetycznych, aby można było wyciągać bardziej ogólne wnioski. Wiadomo, że cechy genetyczne są warunkowane odpowiednią sekwencją zasad i być może, ona decyduje o tym jakie fotoprodukty mogą powstawać, a właściwie każdy fotoprodukt w DNA może stać się przyczyną mutacji.

LITERATURA

1. Alper T., Gillies N.E., *J. Gen. Microbiol.* **22**, 113 (1963).
2. Anderson E.H., *J. Bacteriol.* **61**, 389 (1950).
3. Aoki S., Boyce R.P., Howard-Flanders P., *Nature* **209**, 686 (1966).
4. Bollum F.J., w *Progress in Nucleic Acid Research*, tom I, wyd. J.N. Davidson, W.E. Cohn, Academic Press, New York 1963.
5. Bollum S.J., Setlow R.B., *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 599 (1963).
6. Boyce R.P., *Nature* **209**, 688 (1966).

7. Boyce R.P., Howard-Flanders P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 293 (1964).
8. Bresch C., *Z. Naturforsch.* **5b**, 420 (1950).
9. Buzzel A., *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 97 (1956).
10. Cavilla C.A., Johns H.E., *Virology* **24**, 349 (1964).
11. Clark A.J., Margulies A.D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 451 (1965).
12. Delihans N., *Virology* **13**, 242 (1961).
13. Donnellan J.E.Jr., Setlow R.B., *Science* **149**, 308 (1965).
14. Drake J.W., *J. Mol. Biol.* **6**, 268 (1963).
15. Drake J.W., *J. Cellular Comp. Physiol.* **64**, (supl. 1) 19 (1964).
16. Drake J.W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 506 (1966).
17. Drake J.W., *J. Bacteriol.* **91**, 1775 (1966).
18. Drake J.W., *J. Bacteriol.* **92**, 144 (1966).
19. Driksen M., Wiberg J.S., Koerner J.F., Buchanan J.M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 1425 (1960).
20. Dulbecco R., *Nature* **163**, 949 (1949).
21. Elder R.L., Beers R.F.Jr., *Federation Proc.* **23**, 373 (1964).
22. Elder R.L., Beers R.F.Jr., *J. Bacteriol.* **90**, 681 (1965).
23. Ellison S.A., Feiner R.R., Hill R.F., *Virology* **11**, 294 (1960).
24. Emmerson P.T., *Abstr. Biophys. Soc. 10th Annual Meeting* (1966), str. 71.
25. Feiner R.R., Hill R.F., *Nature* **200**, 291 (1963).
26. Flaks J.G., Lichtenstein L., Cohen S.S., *J. Biol. Chem.* **234**, 1597 (1959).
27. Freeman K.B., Hariharan P.V., Johns N.E., *J. Mol. Biol.* **13**, 833 (1965).
28. Geiduschek E.P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 950 (1961).
- 28a. Goddard J., Streeter D., Weber C., Gordon M.P., *Photochem. Photobiol.* **5**, 213 (1966).
29. Goodgal S.H., Rupert C.S., Herriott R.M., *The Chemical Basis of Heredity*, wyd. W.D. Mc Elroy B. Glass, John Hopkins Press, Baltimore, Maryland 1957, str. 341.
30. Greer S., *J. Gen. Microbiol.* **22**, 618 (1960).
31. Haber K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 502 (1966).
32. Hanawalt P.C., Haynes R.H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 462 (1965).
33. Hanawalt P.C., *Photochem. Photobiol.* **5**, 1 (1966).
34. Harm W., Hillebrandt B., *Z. Naturforsch.* **18b**, 294 (1963).
35. Haynes R.H., *Physical Processes in Radiation Biology*, wyd. Augenstein, Mason Rosenberg, Academic Press, New York 1964.
36. Hill R.F., Rossi H.H., *Science* **116**, 424 (1952).
37. Howard B.D., Tessman I., *J. Mol. Biol.* **9**, 372 (1964).
38. Howard-Flanders P., Clark A.J., Simson E., Theriot L., Boyce R.P., *Abstr. Biophys. Soc. 9th Annual Meeting* (1965), str. 163.
39. Howard-Flanders P., Theriot L., Stedeford J.B., *Abstr. Biophys. Soc. 10th Annual Meeting* (1966), str. 69.
40. Jagger J., Stafford R.S., *Biophys. J.* **5**, 75 (1965).
41. Jagger J., Wise W.C., Stafford R.S., *Photochem. Photobiol.* **3**, 11 (1964).
42. Johns H.E., Le Blanc J.C., Freeman K.B., *J. Mol. Biol.* **13**, 489 (1965).
43. Kaplan R.W., *Photochem. Photobiol.* **2**, 461 (1963).
44. Kaplan R.W., Winkler U., Wolff-Ellmänder H., *Nature* **186**, 330 (1960).
45. Kelner A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **35**, 73 (1949).
46. Kelner A., *J. Bacteriol.* **65**, 252 (1953).
47. Kleczkowski A., *Photochem. Photobiol.* **2**, 497 (1963).

48. Kohn K.W., Steigbigel N.H., Spears C.L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1154 (1965).
49. Mahler I., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **25**, 73 (1966).
50. Metzger K., *Photochem. Photobiol.* **2**, 435 (1963).
51. Metzger K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 101 (1964).
52. Moriguchi E., Suzuki K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 195 (1966).
53. Muhamed A., Abstr. Biophys. Soc. 9th Annual Meeting (1965), str. 112.
54. Okubo S., Romig W.R., *J. Mol. Biol.* **15**, 440 (1966).
55. Ono J., Wilson R.G., Grosman L., *J. Mol. Biol.* **11**, 600 (1965).
56. Patrick M.H., Rupert C.S., wyniki niepubl. cyt. przez Rupert, Harmb (69).
57. Pauling G., Hanawalt P.C., *Proc. Nat. Acad. Cci. U.S.* **54**, 1728 (1965).
58. Pearson M., Johns H.E., *J. Mol. Biol.* **19**, 303 (1966).
59. Pettijohn D., Hanawalt P. C., *J. Mol. Biol.* **9**, 395 (1964).
60. Pietrzykowska I., Shugar D., *Acta Biochim. Polon.* **11**, 179 (1964).
- 60a. Pietrzykowska I., Shugar D., (dane niepublikowane).
61. Pittman D., Abstr. 4th Internat. Photobiol. Congress, Oxford (1964).
62. Roberts R.B., Aldous E., *J. Bacteriol.* **57**, 363 (1949).
63. Rorsch A.C., Van der Kampf C., Adema J., *Biochim. Biophys. Acta* **80**, 346 (1964).
64. Rupert C.S., *J. Gen. Physiol.* **43**, 573 (1960).
65. Rupert C.S., *J. Cellular Comp. Physiol.* **58**, (supl. 1) 57 (1961).
66. Rupert C.S., *J. Gen. Physiol.* **45**, 703 (1962).
67. Rupert C.S., *J. Gen. Physiol.* **45**, 725 (1962).
68. Rupert C.S., *Photophysiology*, wyd. A.C. Giese, II, Academic Press 1964, str. 283.
69. Rupert C.S., *Photochem. Photobiol.* **4**, 27 (1965).
70. Rupert C.S., Harm W., *Adv. Radiation Biology* **2**, 1 (1966).
71. Sauerbier W., *Virology* **15**, 465 (1961).
72. Sauerbier W., *Z. Vererbungslehre* **95**, 145 (1964).
73. Sauerbier W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 340 (1964).
- 73a. Schuster R., *Nature* **202**, 614 (1964).
74. Setlow J.K., *Photochem. Photobiol.* **2**, 393 (1964).
75. Setlow J.K., w *Curent Topics in Radiation Research II*, wyd. M. Ebert A. Howard, North-Hilland Publishing Comp., Amsterdam 1966, str. 195.
76. Setlow J.K., Boling M.E., Bollum F.J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1430 (1965).
77. Setlow J.K., Setlow R.B., *Nature* **197**, 560 (1963).
78. Setlow R.B., *J. Cellular Comp. Physiol.* **64** (supl. 1) 51 (1964).
79. Setlow R.B., Abstr. Biophys. Soc. 10th Annual Meeting (1966), str. 68.
80. Setlow R.B., Carrier W.L., *Photochem. Photobiol.* **2**, 49 (1963).
81. Setlow R.B., Carrier W.L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 226 (1964).
82. Setlow R.B., Carrier W.L., Bollum F.J., Abstr. Biophys. Soc. 9th Annual Meeting (1965), str. 111.
83. Setlow R.B., Carrier W.L., Bollum F.J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 111 (1965).
84. Shugar D., Mc Laren A.D., *Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids*, Pergamon Press, Oxford 1964.
85. Shugar D., *Introductory Lecture IVth International Photobiol. Congr. Oxford* (1964).
86. Shugar D., *Israel J. Med. Sci.* **1**, 1347 (1965).
87. Stahl F.W., Crasemann J.M., Okun L., Fox E., Laied C., *Virology* **13**, 98 (1961).
88. Stauss B.S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 1670 (1962).

89. Swenson P.A., Setlow R.B., *J. Mol. Biol.* **15**, 201 (1966).
90. Terawaki A., Greenberg J., *Biochim. Biophys. Acta* **95**, 170 (1964).
91. Terawaki A., Greenberg J., *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 540 (1966).
92. Tramer Z., Wierzchowski K.L., Shugar D., (w druku).
93. Vidaver G.A., Kozloff L.M., *J. Biol. Chem.* **225**, 335 (1957).
94. Wacker A., *J. Chim. Phys.* **58**, 1041 (1961).
95. Wacker A., Dellweg H., Jacherts D., *J. Mol. Biol.* **4**, 410 (1962).
96. Wierzchowski L.K., Shugar D., *Photochem. Photobiol.* **1**, 21 (1962).
97. Winkler U., *Z. Naturforsch.* **17b**, 670 (1962).
98. Winkler U., *Photochem. Photobiol.* **3**, 37 (1964).
99. Witkin E.M., Proc. 10th Intern. Congress Genet. Montreal 1958, vol 1, 280, Univ. of Toronto Press (1959).
100. Witkin E.M., *J. Cellular Comp. Physiol.* **58** (supl. 1), 135 (1961).
101. Witkin E.M., *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.* **50**, 425 (1963).
102. Wulff D.L., Rupert C.S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 237 (1962).
103. Zampieri A., Greenberg J., *J. Bacteriol.* **87**, 1094 (1964).
104. Zampieri A., Greenberg J., *J. Bacteriol.* **89**, 931 (1965).

SERIA PWN

WSPÓŁCZESNA BIBLIOTEKA NAUKOWA
OMEGA

w 1967 r.

Państwowe Wydawnictwo Naukowe, spełniając życzenia Czytelników serii OMEGA, wprowadza od 1967 roku dalsze udogodnienia w sprzedaży, a mianowicie:

- pojedyncze tomiki będą dostępne w wolnej sprzedaży,
- można zamawiać komplet lub wybór tomików,
- zamówione tomiki będą — na życzenie — wysyłane pocztą do domu.

Książki serii OMEGA dają encyklopedyczny przegląd wiedzy współczesnej w zakresie różnych dyscyplin oraz informują o aktualnych problemach nauki.

Od roku 1963 w serii OMEGA ukazało się 68 tomików.

W roku 1967 ukaże się 20 tomików pojedynczych, w cenie zł 10,— za tomik i 4 tomiki podwójne, w cenie zł 20,— za tomik.

Prospekty, informujące szczegółowo o tematyce serii OMEGA w roku 1967, znajdują się w księgarniach „Domu Książki”.

JANUSZ SŁAWIŃSKI*

Chemiluminescencja w biologii

Chemiluminescence in biology

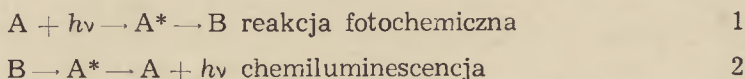
The mechanism of the liquid phase chemiluminescence, characteristic of spontaneous and induced luminescence *in vivo* and *in vitro* are reviewed. Some applications of chemiluminescence are discussed.

Przez długi czas chemiluminescencja uważana była za rzadkie, chociaż efektowne zjawisko. Dopiero zastosowanie czułych metod pozwoliło stwierdzić, że świecenia występują w licznych reakcjach chemicznych oraz we wszystkich żywych komórkach. Chemiluminescencja nabiera dziś coraz większego znaczenia w różnych gałęziach nauki, między innymi również w biochemii i biologii.

I. Ogólna charakterystyka chemiluminescencji

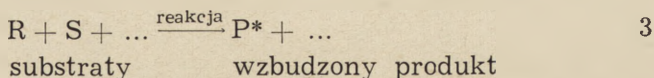
1. Mechanizm chemiluminescencji

Chemiluminescencja (ChL) jest to promieniowanie elektromagnetyczne towarzyszące reakcjom chemicznym, powstające kosztem energii egzoergicznym procesów elementarnych. Formalnie może być traktowana jako odwrócenie reakcji fotochemicznej:



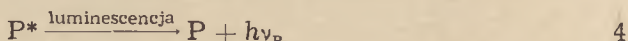
Promieniowanie zawarte może być w nadfioletowym, widzialnym i podczerwonym zakresie widma i może powstawać zarówno w fazie gazowej, ciekłej jak i na granicy faz. Proces ChL dzieli się na dwa stadia:

Stadium wzbudzenia — tworzenie kosztem energii reakcji bogatych w energię cząsteczek (produktu P) w stanie wzbudzonym P*,



* Dr, adiunkt Katedry Chemii Ogólnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Szczecinie.

Stadium luminescencji — przejście wzbudzonej cząsteczki P^* w podstawowy stan P z emisją fotonu:



Stadium to nie zależy od kinetyki i mechanizmu reakcji, podlega natomiast podobnie jak foto-, radio czy elektro-wzbudzenie wpływowi procesów fizycznych (migracja energii wzbudzenia, zderzenie „drugiego rodzaju”, konwersja wewnętrzna itp.).

Jeżeli każde stadium procesu scharakteryzuje się odpowiednią wydajnością kwantową, to można podać wyrażenie zawierające doświadczalnie mierzone wielkości:

$$I = \eta_P^{wz^b} \eta_P^w = \eta_{ChL} w \quad 5$$

gdzie I — natężenie chemiluminescencji, to jest liczba kwantów wypromieniowanych z jednostki objętości w jednostce czasu, $\eta_P^{wz^b}$ — wydajność wzbudzenia, to jest stosunek liczby cząsteczek wzbudzonych do ogólnej liczby tworzących się cząsteczek produktu P , η_P — wydajność kwantowa promieniowania, to jest stosunek liczby cząsteczek wzbudzonych, które oddają energię w formie promieniowania do ogólnej liczby wzbudzonych cząsteczek P , w — szybkość reakcji to jest liczba cząsteczek produktu tworzących się w jednostce czasu i objętości, η_{ChL} — ogólna wydajność kwantowa ChL, czyli stosunek liczby emitowanych fotonów do liczby cząsteczek, które przereagowały. Jak wynika ze wzoru

$$\eta_{ChL} = \frac{I}{w} = \eta_P^{wz^b} \eta_P = \frac{I_\lambda \lambda}{n N c h} \quad 6$$

gdzie I — natężenie ChL o długości fali λ w ergach na s , n — liczba moli przereagowanych w jednostce czasu (s), N , h , c — odpowiednio stała Avogadry, stała Plancka i szybkość światła. Wydajność ChL η_{ChL} określa skuteczność przekształcania energii chemicznej w promieniowanie. Wydajność wzbudzenia $\eta_P^{wz^b}$ zależy od energetyki reakcji, w szczególności od energii aktywacji B . O wydajności kwantowej promieniowania decydują dwa czynniki: czynnik określający prawdopodobieństwo dezaktywacji promienistej to jest prawdopodobieństwo przejścia wzbudzonej cząsteczki P^* do stanu podstawowego P połączone z wypromieniowaniem kwantu $h\nu$ (φ_P) oraz czynnik związany ze spektroskopowymi regułami przejść ze stanu P^* do P (czynnik x). Zależność (6) można więc przedstawić następująco:

$$\eta_{ChL} = x \varphi_P e^{-\frac{B}{kT}} \quad 6a$$

gdzie k — stała Boltzmanna. Ze wzoru (6) wynika, że im większy jest wkład energii cieplnej (energia aktywacji B) w energię wypromienio-

wanego kwantu, tym mniejsze prawdopodobieństwo jego emisji, to jest mniejsza wydajność η_{ChL} . W tabelicy 1 zestawione są przykładowo wartości η_{ChL} dla kilku układów.

Tabela 1

Wydajności kwantowe chemiluminescencji η_{ChL} niektórych reakcji

Układ	Zakres spektralny lub λ_{max} nm	η_{ChL}	Literatura
1. D(-)lucyferyna + lucyferaza + O ₂ + Mg ²⁺ u chrząszcza <i>Photinus pyralis</i>	562	0,88 ± 0,25	(79)
2. lucyferyna + lucyferaza + O ₂ zę skorupiaków <i>Cypridina</i>	460	0,28	(cyt. za 100)
3. bioluminescencja bakterii <i>Achromobacter fischeri</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i>	495–480	0,05	(cyt. za 100)
4. płomienie pod zmniejszonym ciśnieniem	200–2000	0,35	(50)
5. hydrazyd kwasu 5-amino, o-ftalowego (luminol) + O ₂ + KOH w (CH ₃) ₂ SO	485	0,05	(112)
6. dwuazotan N,N'-dwumetylo-9,9'-dwaakrydylu (lucygerina) + Na ₂ CO ₃ + hipoksantyna + oksydaza ksantynowa	485	0,016	(100)
7. Na ₂ SO ₃ + O ₂ + Fe ³⁺ , Cu ²⁺	480	10 ⁻⁹	(93)
8. utlenianie tlenem węglowodorów (etylobenzen, dekan, cykloheksan)	400–500	10 ⁻⁶ –10 ⁻¹¹	(103)
9. pirogalol + NaOH + O ₂	235	10 ⁻¹⁵	(5)

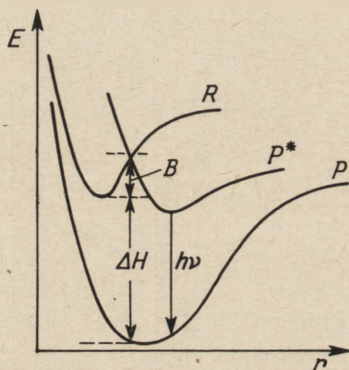
Na rysunku 1 podany jest uproszczony schemat procesu ChL. Stadium wzbudzenia odpowiada przejście z krzywej potencjalnej $E=f(r)$ R na krzywą P*, a stadium luminescencji — z krzywej P* na krzywą P. Jak widać, energia emitowanych kwantów może być sumą ciepła reakcji (zmiany entalpii ΔH) i energii aktywacji B:

$$h\nu \leq \Delta H + B \quad 7$$

Zależność ta pozwala wyjaśnić, dlaczego w niektórych reakcjach energia emitowanych kwantów jest wyższa od entalpii elementarnych procesów. Przykładem może być utlenianie pirogalolu połączone z emisją promieniowania o długości fal 400–600 i 220–240 nm wyzwalamącej energię 50 kcal/mol. Proces zmagazynowania energii aktywacji i na-

stępnie przekształcenia w energię świetlną jest, jak wynika z równania (6a) i rysunku 1 mało prawdopodobny i dlatego wydajność ChL bardzo niska (patrz tabela 1).

Pełne wyjaśnienie mechanizmu ChL wymaga poznania: 1) elementarnych reakcji, w których tworzą się cząsteczki P^* oraz wydajności procesu wzbudzenia η_p^{wb} , 2) struktury i stanów energetycznych cząsteczek wzbudzonych (emiterów) oraz sposobu i wydajności η_p z jaką zachodzi proces przekształcania energii chemicznej w energię promienistą.



Rys. 1. Schematyczne krzywe potencjalne chemiluminescencji (71).

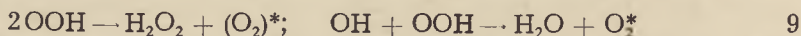
R — reagent, P^* — produkt reakcji w stanie wzbudzonym, P — produkt reakcji w stanie podstawowym, B — wysokość bariery energetycznej reakcji

Energia potrzebna do spowodowania emisji promieniowania o określonej długości fali wynosi:

$$E = N h \alpha \frac{c}{\lambda} = \frac{28,8}{\lambda} \quad 8$$

gdzie α — współczynnik zamiany ergów na kalorie, przy czym E wyrażone jest w kcal/mol, a λ w nm (10^{-9} m). Wytworzenie cząsteczki wzbudzonej P^* wymaga spełnienia trzech warunków: 1) niezbędna porcja energii, to jest entalpia reakcji ΔH + energia aktywacji musi być wyzwolona w jednym z elementarnych aktów reakcji, 2) rozkład energii na poszczególne produkty tej reakcji musi być taki, aby przynajmniej jeden z nich uzyskał porcję energii wystarczającą do wzbudzenia na odpowiednio wysoki poziom energetyczny, 3) energia musi być wyzwolona w czasie krótszym od czasu potrzebnego na rozmycie „klatki rozpuszczalnika” (10^{-12} s) lub podczas pojedynczej oscylacji cząsteczki (10^{-13} s). Warunki te spełniają następujące rodzaje reakcji:

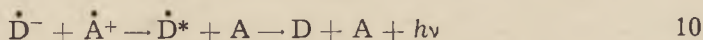
1) rekombinacja rodników, przeważnie nadtlenkowych RO_x ($x \geq 1$) gdzie R oznacza rodnik związku organicznego lub wodór np. (89—93):



(ΔH_0 wynosi -58 do -77 kcal/mol) lub według schematu 1:

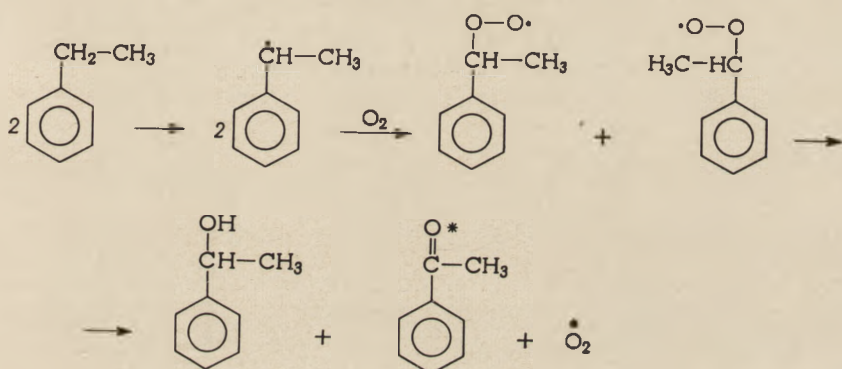
Teoria ta zapoczątkowana jeszcze w 1939 r. (5, 15, 110) jest obecnie nadal rozwijana (87—94, 103—109).

2) Przenoszenie elektronu od donatora (D) na akceptor (A) na przykład z anionowych na kationowe rodniki organiczne wytwarzane podczas elektrolizy związków aromatycznych (38):



Energia aktywacji reakcji 10 B = O i zgodnie z równaniem 6a wydajność η_{ChL} jest wyjątkowo duża.

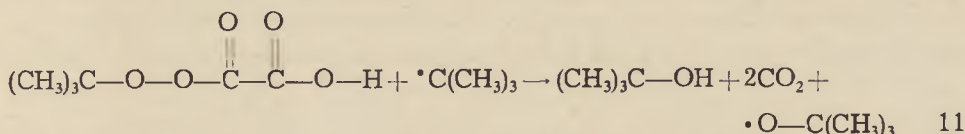
Według autorów tej teorii (17) proces przenoszenia elektronu jest szybszy od rozmywania „klatki rozpuszczalnika” i często następuje z najwyższego poziomu wiążącego rodnika, dzięki czemu jest duże prawdopodobieństwo wytworzenia cząsteczki elektronowo wzbudzonej. Przykładem może być indukowana światłem chemiluminescencja chlorofilu *a* (116) i koenzymów flawinowych (19, 102) (patrz schemat 2).



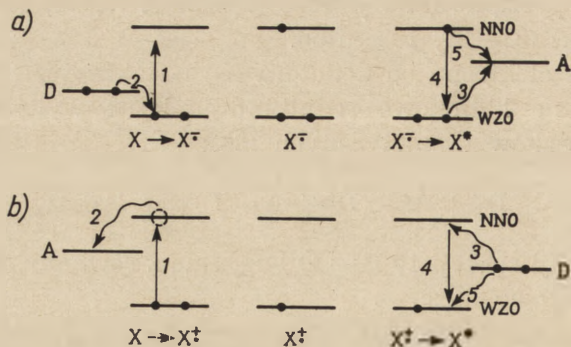
Schemat 1. Tworzenie wzbudzonych cząsteczek w reakcji dysmutacji dwóch rodników nadtlenowych w procesie utleniania etylobenzenu (103).

W układach biologicznych prawdopodobieństwo wytworzenia cząsteczek elektronowo wzbudzonych jest szczególnie duże, gdy akceptorami są tlen lub nadtlenki, odznaczające się wysokim powinowactwem elektronowym.

3) równoczesne rozerwanie co najmniej dwóch wiązań w jednej cząsteczce z wytworzeniem stabilnych produktów (reakcja 11 i schemat 3).



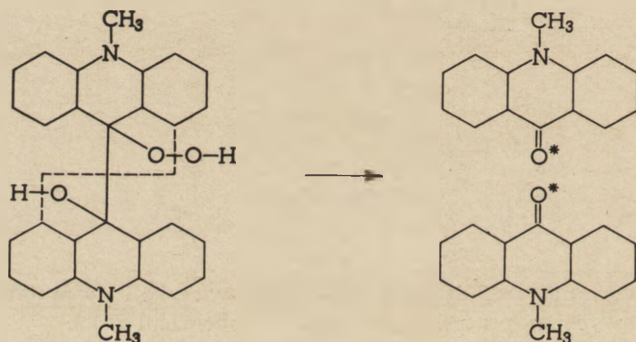
Hipoteza ta powstała w latach 1964—1965 (58, 59, 70).



Schemat 2. Hipotetyczny mechanizm tworzenia cząsteczki wzbudzonej w procesie fotochemiluminescencji chlorofilu (116).

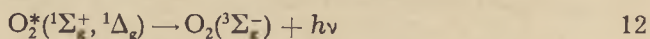
a — świecenie „donorowe” w reakcji fotoredukowanej formy (X^{\ddagger}) z akceptorem elektronu (A), 1 — absorpcja kwantu światła, 2 — fotoredukcja, 3 — przeniesienie elektronu na akceptor A połączone z wytworzeniem wzbudzonego stanu X^* , 4 — wypromieniowanie kwantu (fotochemiluminescencja), 5 — przejście bezpromienne

b — świecenie „akceptorowe” w reakcji fotoutlenionej formy (X^{\ddagger}) z donatorem elektronu, (D), 1, 4, 5 — jak na rysunku 2a, 2 — fotoutlenianie X, 3 — przeniesienie elektronu od donatora D połączone z wytworzeniem wzbudzonego stanu X^* , NNO — niższa niezajęta orbita, WZO — wyższa zajęta orbita elektronowa



Schemat 3. Tworzenie wzbudzonej cząsteczki N-metyloakrydonu w reakcji równoczesnego rozerwania trzech wiązań w cząsteczce hydronadtlenku lucygeniny (58, 59, 70).

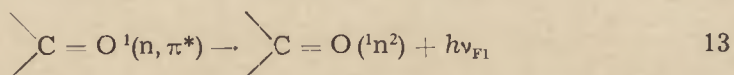
Jako emitery ChL w fazie ciekłej zidentyfikowano dotychczas elektronowo wzbudzony tlen cząsteczkowy oraz związki karbonylowe. Wykazano (4, 16, 41—43, 64, 77, 78, 89, 90), że ChL ze wzbudzonego tlenu w zakresie 400—1200 nm jest spowodowana przejściami z metastabilnych poziomów singletowych $^1\Sigma_g^+$, $^1\Delta_g$ na podstawowy stan tripletowy cząsteczki tlenu — która jak wiadomo, jest dwurodnikiem.



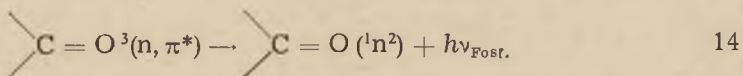
Ponieważ przejścia te są silnie wzbronione zakazami zmiany multipletości momentu pędu i symetrii, przeto wydajność kwantowa promie-

niowania η_p jest mała. Świecenie tlenu obserwuje się w wielu reakcjach związków organicznych i nieorganicznych na przykład zubożenia (9, 90, 91), rozpadu nadtlenu — H_2O_2 (11, 13, 54, 87) reakcji tlenu cząsteczkowego (87—93), utleniania H_2O_2 jonami ClO^- (41—43, 77) i innych reakcji utleniania (12, 14, 22, 23, 49, 50, 54, 106, 112, 113).

Chemiluminescencja większości związków organicznych (12, 54, 103—109, 112, 113) związana jest z przejściami z pierwszego wzbudzonego stanu singletowego do stanu podstawowego singletowego w grupie karbonylowej, to jest z fluorescencją ketonów i aldehydów:

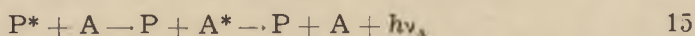


Znacznie rzadziej, gdy ChL gaszona jest tlenem, przyjmuje się istnienie w grupie karbonylowej przejść odpowiadających fosforescencji — z pierwszego wzbudzonego stanu tripletowego do stanu podstawowego:



Równocześnie dezaktywacji promienistej ulegają wzbudzone cząsteczki tlenu (patrz schemat 1 i reakcja 12) (54, 108). Związki organiczne wykazują ChL prawie wyłącznie w obecności tlenu, gdyż w tym przypadku tworzą się związki karbonylowe, przekształcające efektywnie energię wzbudzenia chemicznego w promieniowanie (103, 104).

Spośród procesów jakim podlega wzbudzona cząsteczka P^* w drugim stadium ChL na szczególną uwagę zasługuje proces przekazywania energii na inne, silnie fluoryzujące cząsteczki (A) (10, 43, 107):



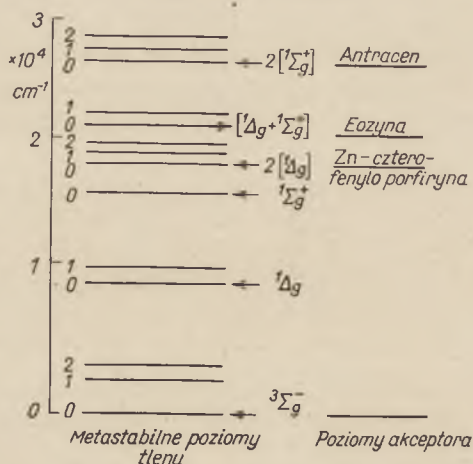
Proces ten nazywa się ChL aktywowaną. Widmo ChL jest w tym przypadku identyczne z widmem fluorescencji aktywatora A, podobnie czas życia w stanie wzbudzonym oraz wydajność promieniowania η_A są charakterystyczne dla cząsteczki aktywatora. Na rysunku 2 podane są poziomy elektronowe i oscylacyjne O_2 i $(O_2)_2$ oraz poziomy elektronowe akceptorów (aktywatorów). Przykładowo: w wyniku reakcji chemicznej tworzy się wzbudzony kompleks $(O^*_2)_2$ o energii około $18\,000\text{ cm}^{-1}$; energia wzbudzenia może migrować z zerowego poziomu oscylacyjnego stanu $2({}^1\Delta_g)$ kompleksu na singletowy poziom Zn -czterofenyloporfiryny o tej samej w przybliżeniu energii; dezaktywacja promienista singletowego poziomu akceptora jest ChL aktywowaną.

W układach biologicznych rolę aktywatorów spełniają między innymi porfiryny (43, 51), adrenalina, ergosteryna (121) i prawdopodobnie enzymy reakcji świecących, zwane lucyferazami (33, 111, 122).

Do pomiarów natężenia ChL stosuje się obecnie aparaturę fotoelek-

tryczną, w której rolę czułego detektora promieniowania spełnia fotopowielacz elektronowy (28, 51, 86, 91, 93, 109).

Bardzo słabe promieniowania o natężeniu 10–100 fotonów/s cm² mierzy się fotopowielaczem chłodzonym ciekłym powietrzem lub stałym



Rys. 2. Niższe poziomy elektronowe i oscylacyjne cząsteczki O₂ i (O₂)₂ oraz niektórych aktywatorów chemiluminescencji (43).

Liczby oznaczają kolejne poziomy oscylacyjne, a poziome strzałki przejścia czysto elektronowe

CO₂ albo też fotopowielaczem mało szumiącym, w układzie licznika elektronowego. Skład spektralny słabych świeceń mierzy się za pomocą filtrów optycznych o możliwie dużej powierzchni i przepuszczalności (20, 26, 89, 94).

2. Chemiluminescencja układów biologicznych

Świecenie żywych organizmów na przykład świetlików, skorupiaków, bakterii i grzybów, określone mianem bioluminescencji oddawna zwracało uwagę i zostało najlepiej poznane. Skonstruowanie w latach dwudziestych XX-go wieku detektorów typu liczników Geigera-Müllera, umożliwiło odkrycie słabego promieniowania ultrafioletowego, zwanego mitogenetycznym. W ostatnim dziesięćciu lat, dzięki zastosowaniu fotopowielaczy w układzie z licznikami elektronowymi odkryto bardzo słabe świecenie w zakresie widzialnym zwane także biochemiluminescencją, które okazało się właściwe wszystkim żywym komórkom. Wymienione wyżej „promieniowania biologiczne” są w istocie chemiluminescencją zachodzącą spontanicznie *in vivo*.

Bioluminescencja — jest to stosunkowo silna ChL w zakresie 400–800 nm towarzysząca utlenianiu tlenem cząsteczkowym ciepło-

trwałych substratów, zwanych od czasów Dubois (1885) lucyferyną w obecności enzymów objętych wspólną nazwą lucyferazy. Liczba świecących gatunków jest niewielka, jednak świecenie występuje wśród

Tablica 2

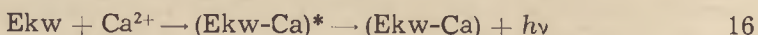
Skład i własności świecących układów niektórych organizmów
(33, 34, 60, 120)

Grupa	Organizm	Związki reagujące	λ_{\max} nm
I	meduza (<i>Aeginura</i>), radiolaria, żebroplawy	białko + Ca^{2+}	471
II	wąsonogi (<i>Balanoglossus biminiensis</i>)	$\text{LH}_2 + \text{E} + \text{H}_2\text{O}_2$	niebieski zakres
	ryby (<i>Apogon</i> , <i>Photoblepharon</i>)	$\text{LH}_2 + \text{E} + \text{O}_2$	460
	pierwotniaki (<i>Gonyaulax polyhedra</i> , <i>Noctiluca miliaris</i>)		470
III	wieloszczety (<i>Odontosyllis enopla</i>)		510
	skorupiaki (<i>Cypridina hilgendorfi</i>)		460
IV	grzyby (<i>Omphali flavida</i>)	$\text{LH}_2 + \text{E} + \text{NADH}_2 + \text{O}_2$	530
	(<i>Colliba</i> , <i>Armillaria</i>)	$\text{LH}_2 + \text{E} + \text{NADPH}_2 + \text{O}_2$	
V	pierścienice morskie (<i>Renilla reniformis</i>)	$\text{LH}_2 + \text{E} + \text{AMP} + \text{O}_2$	niebieski zakres
	owady (<i>Photinus pyralis</i> , <i>Phyrophorus noctilucus</i>)	$\text{LH}_2 + \text{E} + \text{ATP} + \text{Mg}^{2+} + \text{O}_2$	562
	bakterie (<i>Achromobacter fischeri</i>)	$\text{FMNH}_2 + \text{E} + \text{R}-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \diagup \\ \text{H} \end{array} + \text{O}_2$	495
VI	mięczaki (<i>Pholas dyctylus</i>)	$\text{NADH}_2 + \text{FMNH}_2 + \text{E} + \text{O}_2$	480
	ssaki (badania wstępne)	lipid, kwasy tłuszczowe + O_2 + aktywatory	niebieski zielony czerwony zakres
VIII	„robak kolejowy” (<i>Phrixothrix</i>), larwa nasiennicy jabłkówki (<i>Rhagoletis pomonella</i>)	$\text{LH}_2 + \text{porfiryny?} + \text{O}_2$	czerwony zakres

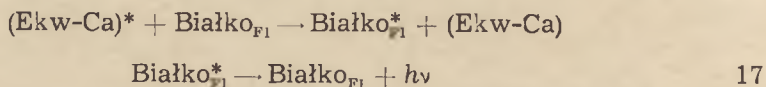
bardzo różnych gatunków, najczęściej wśród organizmów morskich, rzadziej roślin (33). W tablicy 2 zestawione są grupy organizmów i ich świecące układy.

Najprostszy i najciekawszy układ posiada meduza (*Aeginura*). Mechanizm jej bioluminescencji jest prawdopodobnie następujący (120): Przeniesienie elektronu z białka ekwaryny (donator) na jony wapnia (akceptor) powoduje wytworzenie wzbudzonego kompleksu o energii

61 kcal/mol. *In vitro* kompleks ten przechodząc do stanu podstawowego emituje światło niebiesko-fioletowe o długości fali 470 nm:



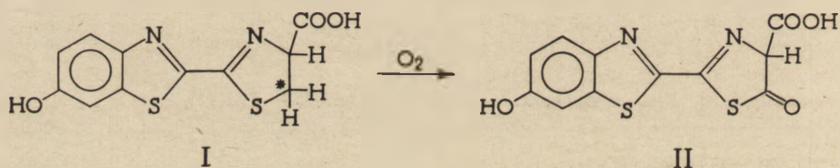
Natomiast *in vivo* następuje przeniesienie energii ze wzbudzonego kompleksu na zielono fluoryzujące białko i wypromieniowanie energii 53 kcal/mol w formie kwantu zielonego światła o długości fali 543 nm:



Jest to więc proces wzbudzenia w wyniku przeniesienia elektronu (reakcja 10) i równocześnie ChL aktywowana (reakcja 15). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że w reakcjach tych nie bierze udziału tlen.

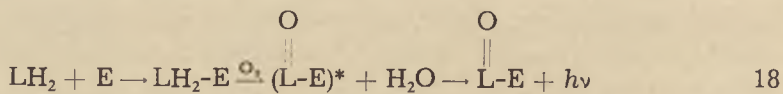
Stosunkowo najlepiej poznany jest mechanizm bioluminescencji niektórych chrząszczy (*Photinus pyralis*, *Pyrophorus nocticulus*, *Photuris pennsylvanica*), bakterii (*Achromobacter fischerii*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*) oraz skorupniaków (*Ostracod cypridina*). Reakcje związane ze świeceniem *Photinus pyralis* (21, 33, 60—63, 80) podano w schemacie 4.

Strukturę lucyferyny (I) tego chrząszcza ustalili Seliger i Mc Elroy (80); drogą utleniania przy węglu zaznaczonym gwiazdką powstaje grupa karbonylowa oksylucyferyny (II). Enzym E nie tylko zwiększa szybkość reakcji utleniania lucyferyny, ale prawdopodobnie działa też jako aktywator ChL, zwiększając wydajność η_{ChL} .



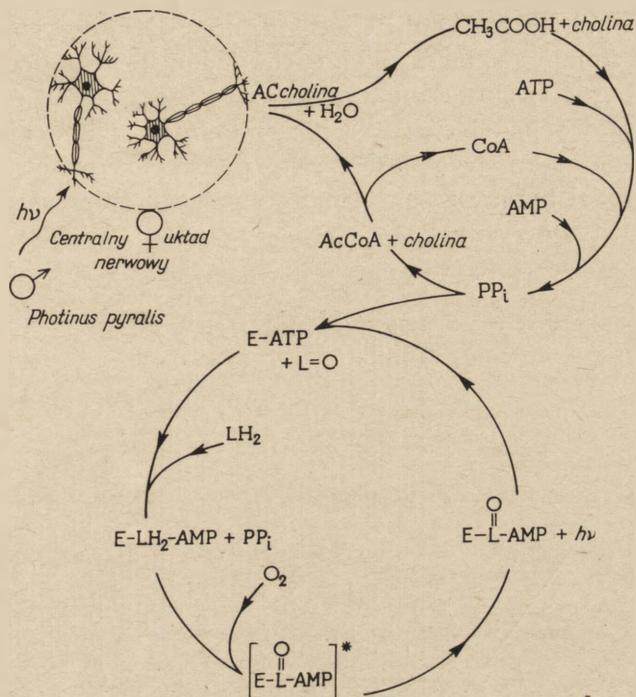
Lucyferyna bakterii to prawdopodobnie FMNH_2 , który utlenia się bezpośrednio tlenem cząsteczkowym z pominięciem części łańcucha oddechowego (schemat 5) (27, 33, 39, 40, 111):

Świecenie małżoraczka (*Cypridina hilgendorfi*) obserwuje się, gdy wydziela on z gruczołów do wody morskiej substancję zawierającą lucyferynę (LH_2) i lucyferazę (E):

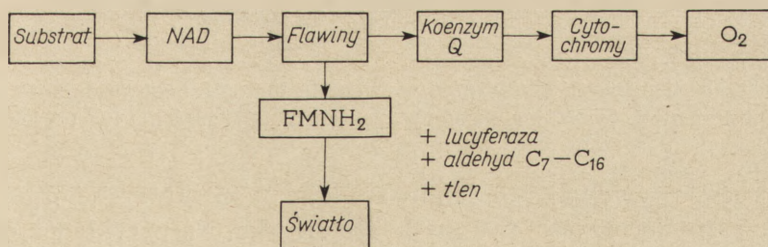


Lucyferyną jest prawdopodobnie policykliczny związek ze skoniugowanymi wiązaniami i grupą $\text{C}=\text{O}$ w łańcuchu bocznym (18, 33, 35, 36, 56).

Jaką rolę biologiczną spełnia bioluminescencja? Mc Elroy i Seliger (60) są zdania, że wykształciła się ona w procesie ewolucji jako działanie ochronne przed tlenem. Pojawienie się tlenu w atmosferze przeżywały tylko te organizmy, które wykształciły zdolność szybkiej



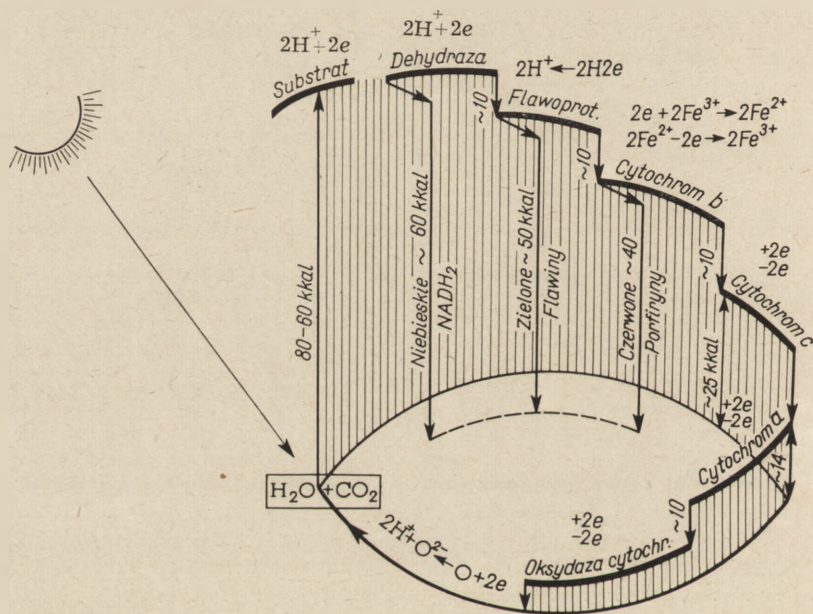
Schemat 4. Schemat reakcji warunkujących świecenie chrząszcza *Photinus pyralis* (63, 79, 80).



Schemat 5. Schemat reakcji związanych z bioluminescencją bakterii (36, 37, 39).

jego redukcji do wody, co powodowało wydzielenie energii połączone z wytworzeniem cząsteczek wzbudzonych, emitujących światło. Hipoteza ta nie tłumaczy jednak świecenia niektórych organizmów wyłącznie w nocy lub świecenie meduzy w nieobecności tlenu. Według poglądu badaczy radzieckich (28, 116, 120, 122) bioluminescencja jest jednym ze

sposobów regulacji energetyki organizmu, a mianowicie pozbyciem się nadmiaru energii wydzielanej w procesie utleniania biosubstratu. Tak na przykład u meduzy różnica energii $E = (E_{kw-Ca})^* - B_{p1}^* \approx 8$ kcal może być wykorzystana do poruszania, syntezy itp. Pozostała energia — około 53 kcal — jest zbyt duża do jednorazowego zużycia i wydziela się w formie zielonej fluorescencji. U organizmów późniejszych ewolucyjnie pojawiły się kolejne składniki łańcucha oddechowego, co umożliwiło stopniowe i bardziej skuteczne wykorzystanie energii utlenień, a więc zmniejszyło prawdopodobieństwo ChL w fioletowej i niebieskiej części widma. Zmniejszenie natężenia ChL oraz przesunięcie maksimum w kierunku długich fal byłoby zatem oznaką wyższego stopnia rozwoju. Rozważania te ilustruje rysunek 3.



Rys. 3. Schemat transportu elektronów w procesie biologicznego utleniania i w bioluminescencji (wg Chance, cyt. za (122)). Objasnienie w tekście.

W procesie ewolucji bioluminescencja u niektórych organizmów wtórnie sprzyjała przystosowaniu do środowiska. Na przykład u chrząszczy świecenie wabi osobniki płci przeciwnej, świecenie głębokowodnych zwierząt oslepia wroga lub zwabia zdobycz itp. Organy świecące tych stworzeń osiągają niekiedy wysoki stopień specjalizacji i rozwoju morfologicznego (rysunek 4).

Budowa narządów świecących ryb i głębokowodnych mięczaków nasuwa przypuszczenie, że promieniowanie typu ChL nie jest obojętne dla organizmu (65, 122). Jak widać na rysunku 4 za „reflektorem” znajduje się warstwa komórek wypełnionych pigmentem absorbującym

promieniowanie. Wysłunięto hipotezę (3, 25), że przyczyną rakotwórczych własności związków aromatycznych o skondensowanych pierścieniach jest widzialna ChL, towarzysząca ich hydroksylacji i utlenianiu *in vivo*. Promieniowanie to absorbowane silnie przez składniki komórkowe mogłoby zmieniać gęstość elektronów w cząsteczkach enzymów i prowadzić do niekontrolowanego, nadmiernego rozwoju tkanki.

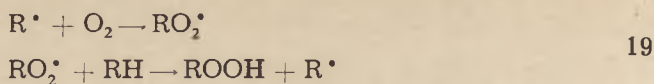


Rys. 4. Organ świecenia głębokowodnego mięczaka (65, 122).

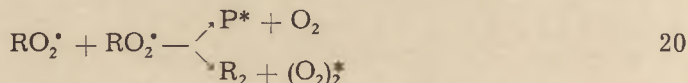
A — reflektor, B — organ świecący, 1 — „soczewka”, 2 — komórki świecące, tak zwane fotocyty, 3 — reflektor (warstwa komórek odbijających światło), 4 — warstwa komórek ochronnych, absorbujących światło, wypełniona pigmentem (schematycznie)

Energia kwantów bioluminescencji być może bodźcem, wyzwalającym biologiczne wzbudzenie. U rozgwiazdy morskiej *Ophiopsila* przy podrażnieniu jednego z pięciu świecących odnóży, zaczynają świecić wszystkie. Jeżeli jednak przeciąć nerw na wzbudzonym odnóży, to świecenie rozchodzi się tylko do miejsca przecięcia, co wskazuje na związek wzbudzenia nerwowego z bioluminescencją (120).

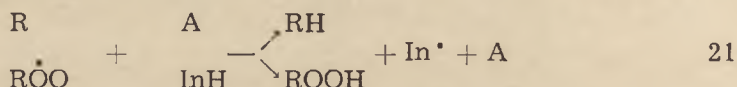
Biochemiluminescencja lipidów. W latach trzydziestych próbowano metodą fotograficzną zarejestrować promieniowanie „nekrotyczne” emitowane podczas porażającego działania pewnych związków na żywe komórki. Zastosowanie chłodzonych fotopowielaczy pozwoliło w roku 1951 zarejestrować ChL chloroplastów (94, 95), a następnie bardzo słabe promienicowanie emitowane przez korzenie roślin w niebiesko-zielonej części widma (20). Następnie wykazano (1, 2, 69, 98, 99, 114, 117, 118), że takie słabe świecenie jest właściwe wszystkim żywym komórkom. Źródłem jego są lipidy w szczególności te, które zawarte są w mitochondriach i lizosomach. Mechanizm ChL lipidów jest zbliżony do dokładnie zbadanego (47, 103) mechanizmu ChL węglowodorów. Podczas samoutleniania lipidów w powietrzu inicjowana jest reakcja łańcuchowa:



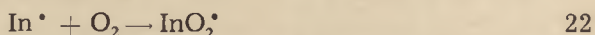
Rekombinacja rodników RO_2 daje cząsteczki wzbudzone — tlen i związki karbonylowe emitujące promieniowanie (patrz reakcje 12—14)



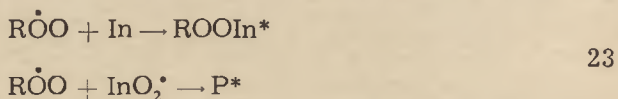
W obecności związków silnie fluoryzujących jak ergosteryna, lecytyna, adrenalina, pojawia się ChL aktywowana (reakcja 15). Reagując z rodnikami lub nadtlennkami cząsteczki aktywatorów mogą tracić zdolność do luminescencji, toteż obecność antyutleniaczy InH, którymi są tioalkohole, antybiotyki, galusan propylu chroni aktywatory i zapewnia większe natężenie i wydajność świecenia (121, 122):



Tworzące się rodniki $In \cdot$ wiążą znaczną część O_2 , zapobiegając utlenianiu lipidów:



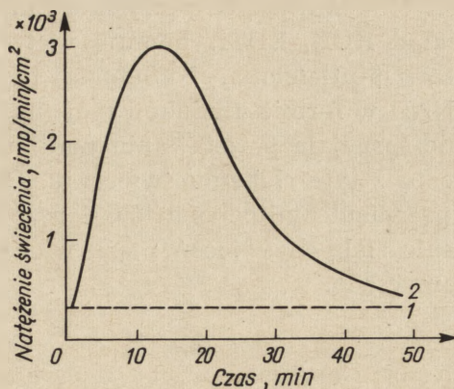
Równocześnie jednak rodniki antyutleniacza mogą reagować z rodnikami nadtlennkowymi:



Ponieważ energia wydzielana w reakcjach (23) jest mniejsza niż przy rekombinacji dwóch rodników ROO, przeto maksimum widma ChL przesuwają się w część długofalową. Obecność w strukturach lipoproteidowych zarówno aktywatorów jak i antyutleniaczy zapewnia nieprzerwane utlenianie lipidów w normalnych komórkach z małą szybkością, stałą w danej temperaturze. Wszelkie zmiany stężenia antyutleniaczy powodują przyspieszenie utleniania lipidów, przy czym niszczy się ich wiązanie z białkiem, a procesom tym towarzyszą zmiany natężenia świecenia. BioChL może więc charakteryzować zachowanie się lipoproteidowych kompleksów i informować o ich stanie (rysunek 5).

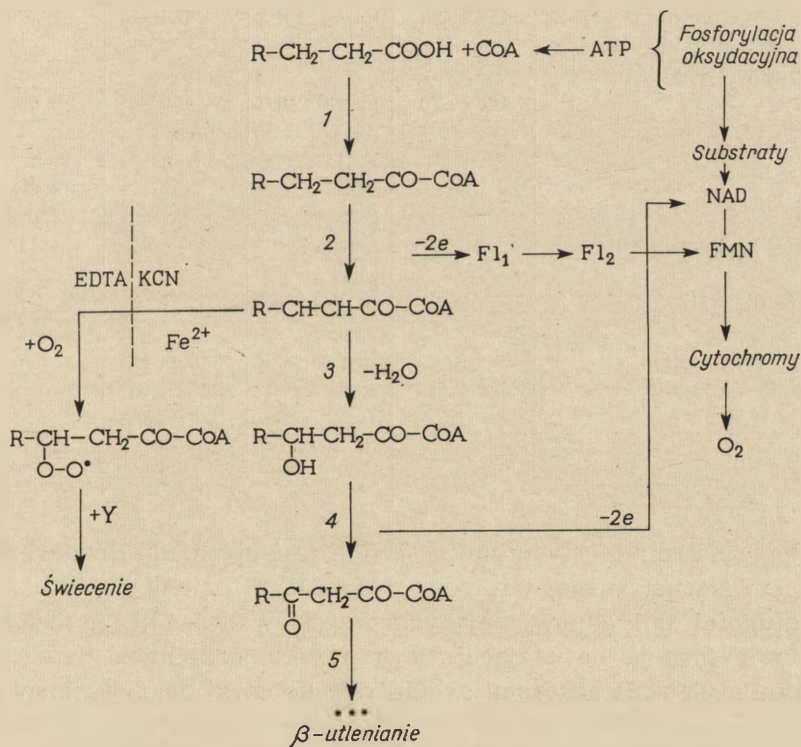
Słabe świecenie homogenatów tkanek roślinnych i zwierzęcych oraz zawiesin komórek i mitochondriów związane jest z wytwarzaniem w mitochondriach nadtlennków kwasów tłuszczowych. Wykazano (45, 46, 94, 116, 119) zależność pomiędzy świeceniem, wytwarzaniem nadtlennków i oksydacyjną fosforylacją w mitochondriach (schemat 6).

Bezpośrednie reagowanie aktywnych kwasów tłuszczowych z tlenem cząstkowym katalizowane przez jony Fe^{2+} warunkuje tworzenie się



Rys. 5. Zwiększenie natężenia chemiluminescencji spowodowane dodaniem do utlenionego tłuszczu, zawierającego nadtlenki niewielkiej ilości nieutlenionych lipidów tkanki zwierzęcej (121, 122).

1 — świecenie tłuszczu utlenionego, 2 — świecenie tłuszczu po rozpuszczeniu w nim lipidów



Schemat 6. Hipotetyczny schemat reakcji tworzenia nadtlenków lipidów i ich związek z łańcuchem oddechowym i fosforylacją oksydacyjną (116).

cząsteczek wzbudzonych, emitujących promieniowanie. Czynniki wiążące jony Fe^{2+} na przykład KCN, EDTA hamują wytwarzanie nadtlenków na korzyść procesów β -utleniania. Natomiast czynniki utrzymujące w mitochondriach NAD w formie zredukowanej (np. kwas askorbinowy) hamując β -utlenianie sprzyjają powstawaniu nadtlenków kwasów tłuszczowych i związanemu z tym słabemu świeceniu. Obecność nadtlenków lipidów powoduje pęcznienie mitochondriów i rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej. Badanie słabych świeceń może więc dostarczyć cennych informacji o tych procesach.

Tablica 3

Położenie głównych pasm chemiluminescencji i absorpcji niektórych związków

Układ świecący	Maksimum emisji nm	Związek absorbujący		
		Nazwa	Maksimum absorpcji nm	Molowy współczynnik absorpcji
Bakterie (<i>Achromobacter fischeri</i>)	495–480	katalaza	400–409	$1,45 \times 10^5$
Utlenianie indolu	485		500–506	—
Pirogalol + peroksydaza + H_2O_2	480–490	kapsantyna	484	$1,05 \times 10^5$
Ryby, pierwotniaki, utlenianie lipidów i węglowodorów tlenem	460–470	ryboflawina FAD FMN	450 445	$2,6 \times 10^7$ $2,77 \times 10^7$
Owady (<i>Photinus pyralis</i>)	562	β -karoten hemoglobina	452 540–580	$1,42 \times 10^6$ $9,1 \times 10^3$
Ryboflawina + H_2O_2	565	hematoporfiryna	550	—
Grzyby (<i>Armillaria</i>)	530	katalaza	536–544	—
Utlenianie tyrozyny	470 i 550	cytochrom c likopen	410–430 i 521–550 478	— $1,85 \times 10^5$

Biologiczna rola biochemiluminescencji jest nieznaną. Różnica między działaniem zewnętrznego, wzorcowego źródła promieniowania o natężeniu i długości fali odpowiadających rejestrowanej ChL, a działaniem chemiluminescencji, powstającej wewnątrz komórki może być znaczna, zwłaszcza gdy pasma absorpcji składników komórki pokrywają się z pasmami ChL i promieniowanie jest *in situ* silnie absorbowane. W tablicy 3 zestawiono przykładowo maksima emisji i absorpcji niektórych enzymów i barwników o dużych współczynnikach absorpcji.

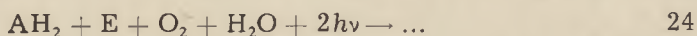
Szczególnie skuteczne mogłoby być działanie ChL powstającej w po-

blizu centrów aktywnych enzymów. Na ten temat nie ma jednak żadnych danych.

ChL o długości fali 400—800 nm odpowiada energii 72—36 kcal/mol, co wystarcza do przekroczenia bariery energetycznej większości reakcji (20—30 kcal/mol). Energia promieniowania widzialnego równoważna 1,5—3,1 eV może spowodować przeniesienie elektronu do strefy przewodnictwa w fotoprzewodnikach, którymi są prawdopodobnie niektóre białka i chlorofil. Obecność w tkankowych lipidach aktywatorów fluoryzujących w zielonej, czerwonej i podczerwonej części widma stwarza możliwość nieenzymatycznego otrzymywania porcji energii, porównywalnych z energią $\sim P$, to jest 8—10 kcal/mol. Nie jest wykluczone, że procesy takie mogłyby mieć pewne znaczenie w niektórych tkankach w związku z utlenianiem lipidów (121).

Promieniowanie mitogenetyczne. W 1923 r. odkryto słabe promieniowanie, wysyłane przez dzielące się komórki (31). Wkrótce okazało się, że promieniowanie takie można uzyskać również z innych źródeł, także niebiologicznych (5, 6, 44, 45, 81). Najważniejszą cechą promieniowania mitogenetycznego jest stymulowanie podziałów komórkowych. Długość jego fali wynosi 190—330 nm, to znaczy 150—85 kcal/mol, a natężenie 10^3 — 10^5 kwantów/cm². Jest to więc typowa mikroultrachemiluminescencja (49).

Ponieważ procesy utlenień biologicznych wyzwalają porcje energii nie przekraczające 8—12 kcal/mol, nasuwa się pytanie jakie reakcje są źródłem promieniowania o tak wysokiej energii? Według Gurwicza (32) cząsteczki wzbudzone o energii 85—150 kcal powstają w reakcjach enzymatycznego utleniania substratów (AH₂) z udziałem światła, wody i tlenu:



Wykazano też (32, 46), że w takim układzie tworzą się wolne rodniki i atomy, których rekombinacja wyzwala energię 160—87 kcal (tablica 4). Ostatnio zaś stwierdzono (46), że kultury drożdży wysyłają promieniowanie mitogenetyczne już podczas wstępnych procesów około 1 godz. przed okresem morfologicznego podziału. Każda komórka emituje wtedy 1—5 kwantów o energii około 100 kcal/mol. Inhibitory reakcji rodnikowych hamują zarówno podziały jak i wysyłanie promieniowania.

Promieniowanie mitogenetyczne działa we wstępnych fazach mitozy, zmniejszając około 3 razy czas potrzebny do dokonania podziału. Zwiększenie natężenia do 10^8 fotonów/cm²s powoduje zanik efektu mitogenetycznego. Są dane (31, 32, 45, 46), że istnieje krytyczna masa lub objętość naświetlanego obiektu, dla której obserwuje się jeszcze efekt mitogenetyczny, co tłumaczy się powstawaniem wtórnego, indukowanego promieniowania UV, przekazywanego łańcuchowo od komórki do komórki. Spontaniczna ChL *in vivo* może być także związana z innymi

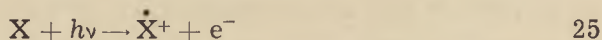
układami niż omówione wyżej. W ChL tkanek roślinnych uczestniczy prawdopodobnie utlenianie związków fenolowych (82, 83). Przemawia za tym między innymi podobieństwo warunków niezbędnych do wystąpienia obu procesów *in vivo*. *In vitro* utlenianiu wielu związków fenolowych tlenem cząsteczkowym lub H_2O_2 w obecności różnych katalizatorów towarzyszy ChL w zakresie 400—600 nm. W reakcji rozkładu H_2O_2 katalazą, emitowane jest słabe świecenie związane prawdopodobnie nie z aktywnymi centrami enzymu lecz z utlenianiem innych jego grup (52). Chemiluminescencja występuje również podczas działania H_2O_2 na białka, peroksydazę (64, 94, 116), glicynę i cysteinę (116), ryboflawinę (96) i wiele innych związków. Badano też kinetykę i mechanizm słabych świeceń w zakresie widzialnym, towarzyszących reakcjom enzymatycznym z udziałem peroksydazy oraz askorbinazy (30, 55).

Tablica 4

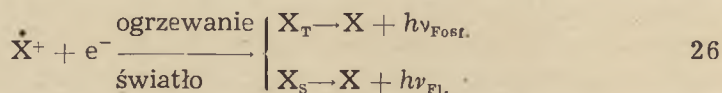
Charakterystyka układów emitujących promieniowanie mitogenetyczne (5, 32, 81)

Układ	Reakcja, w której tworzą się cząsteczki wzbudzone	Energia rekombinacji kcal/mol	nm ^{max}	Emiter
Zymaza drożdży + glukoza	2 OH	110	254	$-\text{OH}$
	$\text{C} = \text{O} + \text{O}$	160	175	$\text{C}=\text{O}$
Erepsyna + glicyloglicyna	$\text{NH} + \text{H}$	87	322	NH
Peroksydaza chrzanu + pirogalol + H_2O_2	?	127	230	?

Prócz chemiluminescencji spontanicznej i wspomnianej już fotochemiluminescencji zaobserwowano też ChL indukowaną ogrzewaniem (termochemiluminescencja). Długotrwała luminescencja roztworów aromatycznych aminokwasów i białek zamrożonych do temperatury 77 °K występuje po ich naświetleniu, które powoduje fotojonizację cząsteczki (116):



Wytworzone rodniki kationów i solwatowane elektrony zostają uwięzione w matrycy. Ogrzanie lub naświetlenie matrycy umożliwia rekombinację elektronów z rodnikami, w wyniku której odtwarza się wzbudzona cząsteczka X w stanie singletowym lub tripletowym:



dza cząsteczki chlorofilu. Pierwszym stadium ChL jest więc proces oksydacyjny i wypromieniowanie nie wiąże się w tym przypadku ze zjawiskami półprzewodnikowymi. Doświadczenia te wskazują nadto, że istnieje możliwość przekazywania aparatowi fotosyntetyzującemu energii pewnych procesów chemicznych.

2. Biopolimery

Napromieniowanie białek, kwasów nukleinowych, polisacharydów, promieniami γ , X, UV powoduje dwa zasadnicze efekty: 1) przerywanie wiązań w łańcuchach, prowadzące do zmniejszenia ciężaru cząsteczkowego, 2) „zszywanie”, czyli usieciowanie poprzeczne, a także działa pośrednio wywołując między innymi wtórne reakcje rozrywania wiązań nadtlenkowych. Powoduje to degradację makrocząsteczek i zmiany struktury, wywołujące utratę naturalnych właściwości biologicznych. Wodne roztwory biopolimerów wykazują po napromieniowaniu długotrwałą luminescencję. Wykazano (24, 74, 75), że ta długotrwała luminescencja jest ChL, której kinetyka i mechanizm mogą być różne w zależności od warunków napromieniowania i składu roztworów. ChL powstaje w reakcjach rozpadu nadtlenków i wtedy krzywe kinetyczne $I=f(t)$ zaniku promieniowania spełniają równanie reakcji I-go rzędu $I=I_0e^{-kt}$. Natomiast w wyniku rekombinacji fragmentów makromolekuły — krzywe kinetyczne wygasają według reakcji II-go rzędu i dają się sprawdzić do prostych w układzie współrzędnych $1/\sqrt{I}=f(t)$.

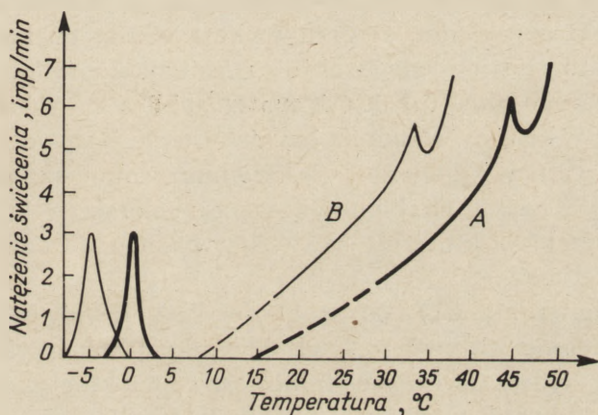
Promieniowanie γ lub X powoduje łańcuchowe reakcje utleniania lipidów i antyutleniaczy. Dlatego też badanie słabej ChL napromienianych komórek może dostarczyć informacji o strukturze i stanie tych związków w organizmach żywych (68, 98).

3. Zastosowanie ChL do celów diagnostycznych i analitycznych

Interesujący wydaje się związek słabej, spontanicznej ChL w zakresie widzialnym z procesami zrakowacenia. Są dane, że komórki rakowe promieniają słabiej niż normalne (98), a wyciągi z nowotworów na przykład sarkomy szczura osłabiają promieniowanie utleniających się lipidów w większym stopniu niż wyciągi z innych komórek, co wiąże się ze zwiększoną zawartością antyutleniaczy w lipidach złośliwych narośli. Rozwojowi nowotworu u szczurów towarzyszy wzrost ilości antyutleniaczy w krwi i jej zdolności gaszenia chemiluminescencji. Badanie słabego promieniowania pozwoliło ustalić, że głównym źródłem antyutleniaczy pojawiających się we krwi jest wątroba, oraz że podczas szybkiego rozwoju nowotworu znacznie maleje zdolność lipidów wątroby do osłabiania ChL, zachodziłoby więc jak gdyby „przetacza-

nie” antyutleniaczy w rosnącą wyrosł. Również promieniowanie mitogenetyczne gaszone jest inhibitorami, szczególnie silnie działa bliżej nieznany peptyd zawarty w krwi organizmów dotkniętych rakiem, wiążący wolne rodniki (32).

Słaba ChL widzialna może informować o stanie lipoproteidowych kompleksów. Badając w związku z tym korzenie i kielki roślin trawiastych (1, 2, 89) ustalono, że w przedziałach biologicznego optimum natężenie promieniowania zwiększa się przy podwyższeniu temperatury i dla każdej nowej temperatury ustala się nowy stan stacjonarny. Poczynając od bardzo wyraźnie zaznaczonej krytycznej temperatury, narusza się stacjonarność i natężenie promieniowania zaczyna gwałtownie wzrastać. To zjawisko pozwala szybko i łatwo ocenić, czy badany gatunek lub odmiana jest ciepło, czy zimnolubna (rysunek 6). Podobną prawidłowość obserwuje się podczas obniżania się temperatury, a niskotemperaturowy punkt krytyczny manifestujący się jako krótkotrwały „błysk”, wyznacza najniższą temperaturę, przy której roślina może jesz-



Rys. 6. Natężenie świecenia korzeni pszenicy w funkcji temperatury (1, 98).

A — południowa pszenica azersko-azerbejdżańska, B — północna pszenica okręgu moskiewskiego.

cze istnieć. W ten sposób — mierząc dwa temperaturowe punkty krytyczne słabej ChL — można szybko określić granice klimatyczne, w których roślina może istnieć. Zalety takiej metody dla uprawy i selekcji roślin są oczywiste.

Błysk promieniowania w widzialnej części widma towarzyszy nie tylko porażeniu temperaturowemu. Szybki, 10-krotny wzrost świecenia obserwuje się również, kiedy komórki giną pod wpływem czynników chemicznych. Reakcję tę dają również mięśnie wyższych i niższych organizmów, larwy owadów i inne (98). Stwarza to możliwość opracowania nowych, szybkich metod oceny aktywności pestycydów.

Poczyniono też próby wykorzystania promieniowania mitogenetycznego do analizy procesów w żywych tkankach. Według Gurwicza

(32) naruszenie lub zniszczenie molekularnej struktury protoplazmy powoduje częściowe wyzwolenie energii w postaci promieniowania UV, zwanego nekrotycznym. Widma emisji tego promieniowania związane są z funkcjonalnym stanem układu. Tak na przykład podczas ogólnej narkozy zwierząt lub po usunięciu niektórych węzłów mózgowo-rdzeniowych, występują ostre, chociaż odwracalne zmiany w widmie promieniowania emitowanego przez mięśnie serca.

Porażenie organizmów energią promienistą powoduje między innymi rozpad lipidów komórki i zwiększone ich utlenianie. W związku z tym stwierdzono, że po naświetleniu organizmu promieniami rentgena zwiększa się natężenie słabego promieniowania w zakresie widzialnym. Krzywa tego procesu wskazuje, że natężenie świecenia przy śmiertelnych dawkach nieprzerwanie wzrasta w czasie. Pozwala to uchwycić w komórkach moment naruszenia stacjonarności i autoregulacji (68, 98).

Na zakończenie wspomnimy o wykorzystaniu bioluminescencji jako metody badania. Natężenie i skład widmowy mogą informować o sprawności energetyki organizmu, stopniu wykorzystania energii biosubstratu lub porażeniu oddzielnych struktur i funkcji komórki. Na przykład jeżeli do świecącego układu bakterii (patrz. tablica 2 i schemat 5) wprowadzić następnym kolejnym składnikiem łańcucha oddechowego — cytochrom c, to natężenie ChL w widzialnej części widma zmniejsza się. Natomiast cytochrom c nie działa na bioluminescencję morskich brattek (*Balanoglossus biminienensis*), które nie zawierają w łańcuchu oddechowym poprzedniego składnika -FMNH₂ (120).

Zależność natężenia ChL od szybkości reakcji (równanie 5) wykorzystano do badania wpływu różnych czynników, na przykład temperatury, ciśnienia hydrostatycznego, inhibitorów, na kinetykę procesów *in vivo* świecących bakterii (40, 111).

Zastosowanie ChL do celów analitycznych obszernie omówione w innej publikacji (84) zilustrują dobrze pewne przykłady. Warunkiem pojawienia się ChL jest — poza nielicznymi wyjątkami — obecność tlenu lub nadtlenu. Z tego względu ChL silnie świecących związków jak luminolu, lucygeniny wykorzystano do wykrywania śladowych ilości nadtlenu w układach biologicznych (76), rodników OOH (30), określania dawek zaabsorbowanego promieniowania X i γ podczas radiolizy roztworów (57). Jednym z najczulszych indykatorów O₂ są świecące bakterie, dzięki którym można wykryć 10⁻¹⁰ części objętości telenu. Ich świecenie szybko gaśnie po wyczerpaniu tlenu, a intensywność oddychania jest odwrotnie proporcjonalna do czasu gaśnięcia (111).

Metody ChL znajdują zastosowanie do oznaczania stężenia antyutleniaaczy (48). Jedną z takich metod (67, 68, 98) pozwala mierzyć sumaryczną ilość i aktywność przeciwutleniaaczy w układach biologicznych

z czułością przewyższającą 10^2 — 10^3 razy czułość odpowiednich metod chemicznych.

Wspomnieć też należy o metodzie ilościowego oznaczania ATP w stężeniu 0,1 γ /ml za pomocą bioluminescencji ekstraktów z *Photinus pyralis* (97). ChL towarzysząca utlenianiu związków fenolowych została wykorzystana do szybkiego oznaczania aktywności peroksydazy (66) małych stężeń kwasu galusowego, pirogalolu (86), aldehydu mrówkowego (85). Metody te pozwalają w ciągu kilkunastu minut oznaczać wymienione związki w stężeniach rzędu 10^{-4} mg/ml z błędem nie przekraczającym 4%.

Można oczekiwać, że intensywne badania chemiluminescencji w układach biologicznych rozwiną ten dział biofizyki i stworzą nowe możliwości badania metabolizmu i bioenergetyki żywych organizmów.

LITERATURA

1. Agawierdiew A.S., Doskocz M.E., Tarusow B.N., *Biofizika* **10**, 832 (1965).
2. Agawierdiew A.S., Tarusow B.N., *Biofizika* **10**, 351 (1965).
3. Anderson W., *Nature* **160**, 892 (1947).
4. Arnold J.S., Browne R.J., Ogryzlo E.A., *Photochem. Photobiol.* **4**, 963 (1965).
5. Audubert R., *Trans. Faraday Soc.* **35**, 197 (1939).
6. Audubert R., Van Doormal X., *Comp. Rend.* **196**, 1883 (1933).
7. Bellamy W.D., *Photochem. Photobiol.* **3**, 259 (1964).
8. Bellamy W.D., Tweet A.G., *Nature* **197**, 482 (1963).
9. Behrens H., Totter J.R., Philbrook G.E., *Nature* **199**, 595 (1963).
10. Bersis D.S., *Z. Phys. Chem.* **26**, 359 (1960).
11. Bowen E.J., *Pure App. Chem.* **9**, 473 (1964).
12. Bowen E.J., *Nature* **201**, 180 (1964).
13. Bowen E.J., Lloyd R.A., *Proc. Chem. Soc. (London)* 305 (1963).
14. Braun A., Dorabialska A., Reimschüssel W., *Rocz. Chem.* **40**, 247 (1966).
15. Bremer T., *Boll. Soc. Chim. Belges* **62**, 569 (1953).
16. Browne J.R., Ogryzlo E.A., *Proc. Chem. Soc. (London)*, 117 (1964).
17. Chandross E.A., Sonntag F.I., *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 3179 (1964).
18. Chase A.M., Lorenz P.B., *J. Cellular. Comp. Physiol.* **25**, 53 (1945).
19. Cilento G., *Photochem. Photobiol.* **4**, 1243 (1965).
20. Colli L., Facchini V., *Nuovo Cimento* **11**, 255 (1954).
21. De Luca M., Seliger H.H., Mc Elroy W.D., VI Intern. Congr. Biochem. N.Y. 1964, sect. x-17, abstr. X-17-20.
22. Dorabialska A., Kroch J., Adolf I., *Zesz. Naukowe Politechniki Łódzkiej, Chemia* **3**, 3 (1955).
Łódzkiej, Chemia **7**, 69 (1958).
23. Dorabialska A., Kołodziejczak K., *Zesz. Naukowe Politechniki Łódzkiej, Chemia* **7**, 69 (1958), **8**, 3 (1960).
24. Emanuel N.M., Krugliakowa K.E., Wiczutinski A.A., *Izw. Akad. Nauk SSSR, (Chim)* **6**, 1143 (1963).
25. Figge F.H., *Cancer Res.* **6**, 489 (1946).

26. Fisz A.M., Sałonskij N.M., Czumakowa R.I., *Trudy Mosk. Obszczestwa Ispytat. Prirody, ot-o Biol.* **21**, 177 (1962).
27. Gawroński E., *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska, sectio C, Lublin* **14**, 407 (1959).
28. Gitielzon I.I., Czumakowa R.I., Fisz A.M., *Biofizika* **10**, 100 (1965).
29. Goedheer J.C., Vegt G.R., *Nature* **193**, 875 (1965).
30. Grabiec S., Bogdański K., *Bull. de l'Acad. Polon. des Sciences* **3**, (1967) w druku.
31. Gurwicz A.G., Gurwicz L.D., *Mitogeneticzeskoje Izluczenije*, Leningrad 1934.
32. Gurwicz A.A., *Biofizika* **10**, 619 (1965).
33. Harvey E.N., *Bioluminescence*, Academic Press, New York 1952.
34. Harvey E.N., *J. Cellular. Comp. Physiol.* **26**, 185 (1945).
35. Harvey E.N., Tsuji F.J., *J. Cellular. Comp. Physiol.* **46**, 341 (1955).
36. Hastings J.W., *J. Cellular Comp. Physiol.* **40**, 1 (1952).
37. Hastings J.W., Riley W.H., Massa J., *J. Biol. Chem.* **240**, 1473 (1965).
38. Herkules M., *Science* **145**, 808 (1964).
39. Johnson F.H., *Advances in Enzymology* **7**, 215 (1947).
40. Johnson F.H., Eyring H., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **49**, 376 (1948).
41. Khan A.U., Kasha M., *J. Chem. Phys.* **39**, 2105 (1963).
42. Khan A.U., Kasha M., *Nature* **204**, 241 (1964).
43. Khan A.U., Kasha M., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 1574 (1966).
44. Konarski J., *Acta Biol. Exp.* **7**, 317 (1932).
45. Koniew S.W., Łyskowa T.I., *Biofizika* **10**, 1000 (1965).
46. Koniew S.W., Łyskowa T.I., Nisenbaum G.D., *Biofizika* **11**, 361 (1966).
47. Karpuchin O.N., Szlapinot W.J., Michajłow J.D., *Ž. Fiz. Chimii* **38**, 156 (1964).
48. Karpuchin O.N., Szlapintoch W.J., Rusina I.P., Zołotowa N.W., *Ž. Anal. Chimii* **18**, 1021 (1963).
49. Kroh J., *Mikroultrachemiluminescencja*, Łódź 1953.
50. Kroh J., *Chemiluminescencja w fazie ciekłej*, Łódź 1960.
51. Lee J., Seliger H.H., *Photochem. Photobiol.* **4**, 1015 (1965).
52. Lichtensztein G.I., Purmal A.P., *Biofizika* **11**, 245 (1966).
53. Litwin F.F., Władimirow J.A., Krasnowski A.A., *Usp. fiz. Nauk* **71**, 140 (1960).
54. Lloyd R.A., *Trans. Faraday Soc.* **61**, 2173, 2182 (1965).
55. Maruchin J., Grabiec S., *First Bulgarian Congress of Biochemistry and Biophysics* str. 112 (1966).
56. Mason H.S., *Arch. Biochem. Biophys.* **35**, 472, (1952).
57. Maneord M.V., Anderson W., Evans H.D., Rosen D., *Radiation Res.* **3**, 379 (1955).
58. Mc Capra F., Richardson D.G., *Tetrahedron Letters* **43**, 3167 (1964).
59. Mc Capra F., Richardson D.G., Chang Y.C., *Photochem. Photobiol.* **4**, 1111 (1965).
60. Mc Elroy W.D., Selinger H.H., w *Horizonty Biochimji*, red. Ł.A. Tumerman, Moskwa 1964, str. 74.
61. Mc Elroy W.D., Strehler B.L., *Arch. Biochem.* **22**, 420 (1949).
62. Mc Elroy W.D., Strehler B.L., *J. Biol. Chem.* **191**, 547 (1951).
63. Mc Elroy W.D., Selinger H.H., *Federation Proc.* **21**, 1006 (1962).
64. Mc Keown E., Waters W.A., *Nature* **203**, 1063 (1964).
65. Nicol J.A., *Advances in Compar. Physiol. Biochem.* Academic Press, N.Y., London 1962, tom I, str. 217.
66. Nilson R., *Acta Chem. Scand.* **18**, 389 (1964).

67. Petruszewicz J.M., Iwanow I.I., *Biofizika* **10**, 689 (1965).
68. Petruszewicz I.M., Konoplannikow A.G., *Biofizika* **10**, 524 (1965).
69. Popow G.A., Tarusow B.N., *Biofizika* **8**, 317 (1963).
70. Rauhut H.M., Sheehan D., Clarke R.A., Semsel A.M., *Photochem. Photobiol.* **4**, 1097 (1965).
71. Reid C., *Excited States in Chemistry a. Biology*, London 1947.
72. Rubin A.B., Focht A.S., Wenediktow P.S., *Biofizika* **11**, 299 (1966).
73. Rylska T., *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, Lublin* **3**, 13 (1948), **5**, 10 (1951).
74. Sapieżynski I.I., Siłajew J.W., Doncowa E.T., *Biofizika* **10**, 429 (1965).
75. Sapieżynski I.I., Siłajew J.W., Emanuel N.M., *Doklady Akad. Nauk SSSR* **15**, 1378 (1964).
76. Schales O., *Ber.* **72**, 167 (1939).
77. Seliger H.H., *Anal. Biochem.* **1**, 60 (1960).
78. Seliger H.H., *J. Chem. Phys.* **40**, 3133 (1964).
79. Seliger H.H., Mc Elroy W.D., *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 136 (1960).
80. Seliger H.H., Mc Elroy W.D., *Science* **138**, 683 (1962).
81. Siebert W.W., *Biochem. Z.* **202**, 121 (1928).
82. Sławińska D., *Rozprawa Doktorska, Uniwersytet Łódzki* 1965.
83. Sławińska D., Sławiński J., *Zesz. Naukowe Wyższej Szkoły Rolniczej w Szczecinie.* **15**, 142 (1964).
84. Sławińska D., Sławiński J., *Chem. Analyst.* **11**, 13 (1966).
85. Sławińska D., Gołębiowska D., Sławiński J., *Chem. Analyst.* **11**, 1117 (1966).
86. Sławińska D., Sławiński J., *Chem. Analyst.* **10**, 77 (1965).
87. Stauff J., *Photochem. Photobiol.* **4**, 1199 (1965).
88. Stauff J., Huster H.J., Lohmann F., Schmidkunz H., *Z. Physik. Chem. (Frankfurt)* **40**, 64 (1964).
89. Stauff J., Lohmann F., *Z. Physik. Chem. (Frankfurt)* **40**, 123 (1964).
90. Stauff J., Rummler G., *Z. Physik. Chem. (Frankfurt)* **34**, 67 (1962).
91. Stauff J., Schmidkunz H., *Z. Physik. Chem. (Frankfurt)* **33**, 173 (1962).
92. Stauff J., Schmidkunz H., *Z. Physik. Chem. (Frankfurt)* **35**, 295 (1962).
93. Stauff J., Schmidkunz H., *Z. Physik. Chem. (Frankfurt)* **36**, 61 (1963).
94. Strehler B.L., *Arch. Biochem. Biophys.* **34**, 239 (1951).
95. Strehler B.L., Arnold W.J., *J. Gen. Physiol.* **34**, 809 (1951).
96. Strehler B.L., Shoup C.S., *Arch. Biochem. Biophys.* **47**, 8 (1953).
97. Strehler B.L., Totter J.R., w *Methods of Biochemical Analysis*, tom I, Interscience Publ., New York 1959, str. 345.
98. Tarusow B.N., *Priroda* **2**, 11 (1966).
99. Tarusow B.N., Poliwoda A.I., Żurawlew A.I., *Biofizika* **6**, 490 (1961).
100. Totter J.R., *Photochem. Photobiol.* **3**, 231 (1964).
101. Tsunoda Yoshikazu, *Chem. Abstr.* **45**, 10061 (1951).
102. Vorhaben J.E., Stelle R.H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 187 (1965).
103. Wasiljew R.F., *Optika i spektroskopia* **18**, 236, 415 (1965), **20**, 365 (1966).
104. Wasiljew R.F., *Doklady Akad. Nauk SSSR* **144**, 143 (1962).
105. Wasiljew R.F., Wiczutinski A.A., *Nature* **194**, 1276 (1962).
106. Wasiljew R.F., Rusina I.F., *Doklady Akad. Nauk SSSR* **156**, 1402 (1964).
107. Wasiljew R.F., Wiczutinski A.A., Czerkasow A.S., *Doklady Akad. Nauk SSSR* **149**, 124 (1963).
108. Wasiljew R.F., Rusina I.F., *Izv. Akad. Nauk SSSR (chim.)* **9**, 1728 (1964).
109. Wasiljew R.F., Żuczkowa T.N., Pietuchow S.P., *Optiko-mechanicz. promysł.* **3**, 2 (1963).

110. Weiss J., *Trans. Faraday Soc.* **35**, 219 (1939).
111. Werkman C.H., Wilson P.W., *Bacterial Physiology*, tłum. z ros. Moskwa 1954.
112. White E.H., Bursley M.M., *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 941 (1964).
113. White E.H., Harding M.J.C., *Photochem. Photobiol.* **4**, 1129 (1965).
114. Wiesołowski W.A., Siekamowa E.N., Tarusow B.N., *Biofizika* **8**, 155 (1963).
115. Williams J.R., Steele R.H., *Biochemistry* **4**, 814 (1965).
116. Władimirow J.A., Swierchśabyje swiezczenija pri biochimizeskich reakcjach, Moskwa 1966.
117. Władimirow J.A., Litwin F.F., *Biofizika* **4**, 601 (1959).
118. Władimirow J.A., Litwin F.F., Tań Mańci, *Biofizika* **7**, 675 (1962).
119. Władimirow J.A., Lwowa O.F., *Biofizika* **9**, 506 (1964).
120. Żurawlew A.I., *Ż. Obszcz. Biot.* **26**, 129 (1965).
121. Żurawlew A.I., Filipow J.N., Simonow B.B., *Biofizika* **10**, 246 (1965).
122. Żurawlew A.I., Trostnikow W.N., *Swiezczenie żywych tkaniej*, Moskwa 1966.

ALICJA ZURZYCKA*

Lumisynteza

Lumisynthesis

The influence of light on the morphogenesis of fungi and the connections of morphogenesis with metabolic phenomena are reviewed.

Działanie światła na różnorodne procesy u grzybów jest od dawna znane i intensywnie badane. W latach ostatnich wyniki tych prac ujęto w kilku obszernych omówieniach (2, 32, 36, 45, 56, 64). Dotychczas badania koncentrowały się na wyznaczeniu widm działania dla reakcji w celu wykrycia fotoreceptora, czy fotoreceptorów zjawisk fotobiologicznych i ustalenia procesów metabolicznych, powstających lub zmieniających się pod wpływem światła. W tablicy 1 zestawiono szereg bardziej interesujących danych o widmach działania dla różnych efektów świetlnych u grzybów. W zasadzie czynne jest promieniowanie krótkofalowe, poczynając od dalekiego ultrafioletu aż po 500 nm. Tylko w jednym przypadku stwierdzono działanie światła w zakresie 600—800 nm. Szereg zupełnie odmiennych pod względem fizjologicznym procesów ma tak zbliżone widma, że trudno na razie rozstrzygnąć, czy ich fotoreceptory są identyczne, czy też nie. Nie ustalono również ostatecznie biochemicznego charakteru fotoreceptorów podstawowych procesów świetlnych takich jak fototropizm, czy świetlna reakcja wzrostowa. Zwolennicy teorii ryboflawinowej (36, 45) przedstawiają równie ważne argumenty przemawiające za udziałem tej substancji (lub jej pochodnych) w procesach fotobiologicznych jak i zwolennicy teorii karotenoidowej (34, 64), którzy taką rolę przypisują karotenoidom. Dotychczas nie udało się też wyjaśnić jakie procesy biochemiczne warunkują ujawnienie się danego efektu fotobiologicznego (63).

Dość dobrze poznano natomiast wpływ światła na pewne procesy rozwojowe u grzybów. W organizmie grzyba istnieją dwie tendencje rozwojowe — wzrost wegetatywny i rozmnażanie (zarówno generatywne jak i bezpłciowe); procesy te mają przypuszczalnie różny podkład bio-

* Doc. dr, Zakład Fizjologii Roślin PAN, Kraków

Wykaz używanych skrótów: OC — zarodnie normalne, RS — zarodnie przetrwalne (u *Blastocladiella emersonii*); nm = mμ

chemiczny, a w określonych warunkach hodowlanych występują w pewnej równowadze. Możliwe i bardzo często stwierdzone jest przesunięcie tej równowagi, przy czym jednym z podstawowych czynników działających jest światło. Wykrycie drugiego czynnika — dwutlenku węgla — i ustalenie obrazu biochemicznego przemian rozwojowych u grzybów jest

Tablica 1
Niektóre widma działania reakcji fotobiologicznych u grzybów

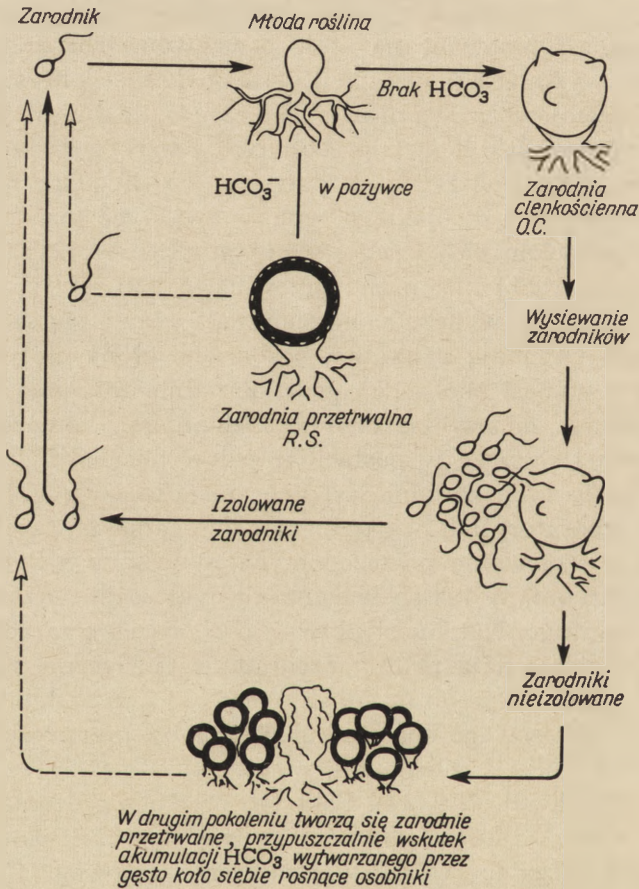
Organizm	Proces fotobiologiczny	Maksima widm działania nm	Hipotetyczny fotoreceptor	Literatura
<i>Neurospora crassa</i>	synteza karotenoidów	449, 480	karotenoidy	(66)
<i>Pilobolus kleinii</i>	fototropizm	448, 480	karotenoidy	(5)
	tworzenie trofocyst	405, 440, 480	ryboflawina	(59)
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	światlna reakcja	280, 385, 445, 485	ryboflawina	(37)
	wzrostowa	280, 370, 445, 470	lub karotenoidy	(35), (31)
	fototropizm	385, 455, 485		
<i>Aspergillus giganteus</i>	fotomorfoza (powstawanie konidioformów olbrzymich)	300-380, 450, 480	karotenoidy	(41)
<i>Coprinus lagopus</i>	zahamowanie etiolacji	447-480	ryboflawina	(62)
<i>Collybia velutipes</i>	formowanie kapeluszy	390-470	?	(1)
<i>Sphaerobolus sp.</i>	wytwarzanie owocników	440-455, 485	?	(45)
<i>Ascochyta pisi</i>	zarodnikowanie	238, 313	P ₃₂₀ (?)	(46, 47)
<i>Alternaria solani</i>	hamowanie zarodnikowania	375-425, 450, pow. 600	ryboflawina	(53)
<i>Sordaria</i>	wystrzeliwanie zarodni	430-495	?	(44)

zasługą szkoły C a n t i n o, opracowującej to zagadnienie od roku 1951 do chwili obecnej. Dokładniejsze przedstawienie dotychczas uzyskanych danych będzie przedmiotem tego artykułu.

Obiektem badanym, u którego dobrze poznano związki pomiędzy zmianami morfologicznymi między innymi wywołanymi także przez

światło jest *Blastocladiella emersonii*. Grzyb ten należy do glonowców (*Phycomycetes*), a ekologicznie zaliczany jest do tak zwanych pleśni wodnych (39) z uwagi na to, że rozwija się w zasadzie w środowisku wodnym. *Blastocladiella emersonii* jest małym (0,5 mm) organizmem o prostej budowie, krótkim cyklu życiowym i daje się łatwo hodować na różnego typu pożywkach (3). Rozmnaża się przez zarodniki opatrzone wityką, tak zwane zoospory, o bardzo szczególnej budowie morfologicznej, której omówienie przekracza ramy tego artykułu (17, 20, 28, 48). Po pewnym okresie swobodnego ruchu zoospory wciągają witykę i wytwarzają plechę grzyba. Jest to początkowo jedna komórka z licznymi jądrami, zróżnicowana na część podstawową rhizoidalną i buławkową część wystającą ponad podłoże. Pod koniec okresu rozwojowego plazma przemieszcza się prawie całkowicie do buławkowego rozszerzenia i odcina się błoną poprzeczną od reszty organizmu. Nowopowstała komórka stanowi zawiązek przyszłej zarodni. Grzyb ma zdolność wykształcania zarodni dwojakiego typu — zwykłych (oznaczanych przez C a n t i n o symbolem OC) i przetrwalnych (RS). W początkowych stadiach rozwoju zarodni nie można przewidzieć jaki jej typ się rozwinie, natomiast całkowicie wykształcone sporangia różnią się szeregiem cech. Zarodnie typu OC mają delikatne, bezbarwne błony chitynowe, a czas ich powstania wynosi około 13,5 godz. Zarodnie RS mają grubościennne błony chitynowe, zabarwione ciemno melaninami, komórki zaś zawierają γ -karoten i tłuszcze w postaci kropeł w obrębie cytoplazmy; czas różnicowania się tych zarodni jest znacznie dłuższy (około 80 godzin). W hodowli laboratoryjnej warunkiem otrzymania cienkościennych zarodni OC jest izolowanie poszczególnych pływek, wydobywających się z pękającej zarodni. W takich warunkach cykl roślin OC można powtarzać dowolnie długo. Natomiast pływki, pochodzące z zarodni OC i kiełkujące blisko siebie dają rośliny produkujące wyłącznie zarodnie przetrwalne (RS). W ten sposób (rysunek 1) rozwój grzyba kończy się przejściem w stan okresowego spoczynku, wywołany przypuszczalnie nagromadzeniem się jakiejś substancji w otoczeniu gęsto rozmieszczonych osobników w hodowli (7, 9, 11). Fakt ten oraz stwierdzenie, że u rodzaju pokrewnego — *Blastocladia* (40) można wywołać powstawanie zarodni RS umieszczając rośliny w atmosferze gazowego CO₂, naprowadziły C a n t i n o i jego współpracowników, na przypuszczenie, że różnicowanie się zarodni *Blastocladiella* jest związane z przekroczeniem pewnego określonego stężenia gazowego CO₂ lub dwuwęglanu w środowisku. Próby zwiększania stężenia dwuwęglanu (11), oczywiście przy eliminowaniu ujemnego wpływu pH, wykazały, że podwyższenie stężenia dwuwęglanu do 10⁻²M powoduje wytwarzanie się wyłącznie zarodni typu przetrwalnego. Powstaje teraz pytanie, w których miejscach przemian metabolicznych ingerują jony dwuwęglanowe. *Blastocladiella emersonii* jest organizmem, zdobywającym energię dzięki fermentacji

glukozy do kwasu mlekowego (26), z możliwością tworzenia kwasu α -glicerofosforowego. Fakt istnienia bardzo aktywnego układu dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu sugeruje istnienie jeszcze innej drogi przemian glukozy, być może cyklu pentozowego, lecz droga ta jest jeszcze mało poznana (13). Pobieranie tlenu przez roślinę jest słabe, aczkolwiek wyraźne ($Q_{O_2} = 9,0 \mu l O_2$) mg suchej masy/godz. (4, 26). Dokładniejsze analizy aktywności enzymatycznej wykazały u *Blastocladiella* obecność enzymów cyklu Krebsa (8, 11, 24) oraz oksydazy cytochromowej (8, 24).



Rys. 1. Schemat powstawania zarodni cienkościennych i przetrwalnych pod wpływem jonów dwuwęglanowych (objaśnienia w tekście). (wg 11)

Próbie wyjaśnienia działania dwuwęglanu na rozwój zarodni RS u *Blastocladiella emersonii* oparto na faktach następujących:

1. Pod wpływem jonów dwuwęglanowych stwierdza się zahamowanie aktywności oksydazy kwasu α -ketoglutazarowego i silny wzrost aktywności dehydrogenazy kwasu izocytrynowego. Usunięcie jonów dwuwę-

głanowych powoduje nagły wzrost aktywności oksydazy i spadek aktywności drugiego enzymu (11, 52).

2. W omawianych warunkach poziom ketokwasów wzrasta (9, 11).

3. Dodatek dwuwęglanu powoduje powstanie zarodni przetrwalnych na pożywkach bogatych w azot, nie skutkuje natomiast w pożywkach ubogich w ten pierwiastek, gdyż przypuszczalnie w tym ostatnim wypadku, cały kwas α -ketoglutazarowy zostaje natychmiast zużytkowywany w procesach transaminacji. Natomiast dodanie do takiej pożywki kwasu α -ketoglutazarowego (lub cytrynowego) wywołuje powstawanie zarodni RS (6).

4. Nawet na pożywkach ubogich w azot, a więc nie sprzyjających powstawaniu zarodni RS, można wywołać ich różnicowanie się przez zastosowanie odpowiednich inhibitorów. Najsilniej działają arseniny i semikarbazyd, a więc związki blokujące przemiany kwasu α -ketoglutazarowego (6, 8).

5. U mutantu *Blastocladiella emersonii* nie udaje się nigdy uzyskać zarodni przetrwalnych. Okazało się, że mutant ten nie ma oksydazy kwasu α -ketoglutazarowego i akonitazy. Obie dekarboksylacje oksydacyjne nie przebiegają u tego organizmu, wskutek czego nie ma on możliwości regulowania poziomu ketokwasów (9, 11, 21, 24).

6. Biotyna — stymulator procesów dekarboksylacji — znosi morfogenetyczne działanie dwuwęglanów.

7. *Blastocladiella* ma zdolność syntezy izocytrynazy, przekształcającej kwas izocytrynowy na kwasy glioksalowy i bursztynowy (55).

8. Wreszcie w czasie działania dwuwęglanów zniką oksydaza cytochromowa, a pojawia się oksydaza polifenolowa.

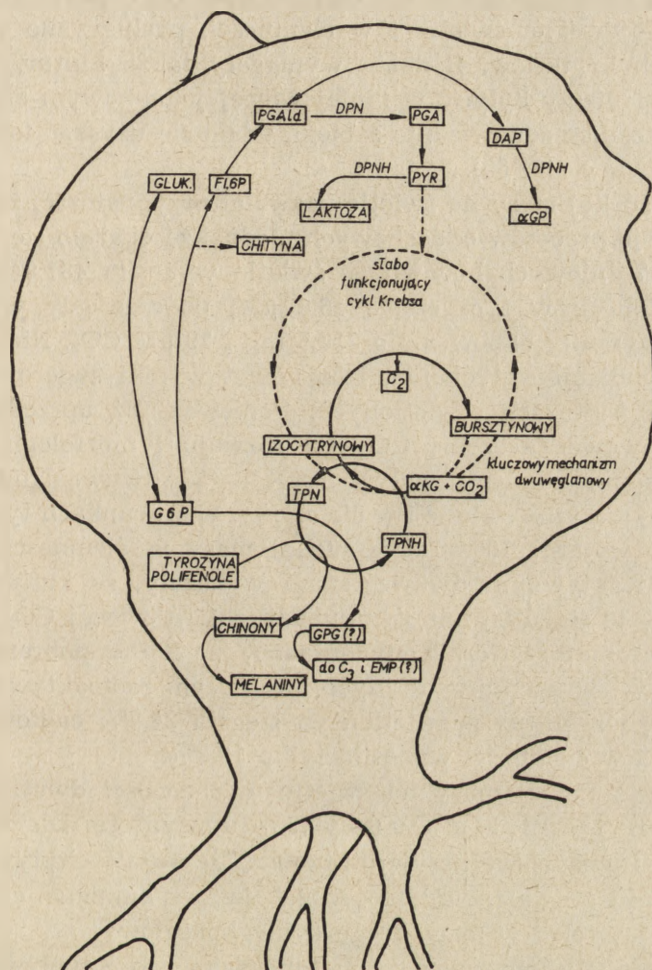
Na podstawie tych faktów mógł C a n t i n o postawić hipotezę, że pod wpływem nadmiaru jonów dwuwęglanowych zmienia się charakter cyklu kwasów trójkarboksylowych. Jony dwuwęglanowe hamują oksydacyjną dekarboksylację kwasu α -ketoglutazarowego, którego poziom wzrasta 10-krotnie (z 0,1 do 1,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ suchej masy). Następnie rozpoczyna się redukcyjna karboksylacja kwasu α -ketoglutazarowego i nagromadzenie się kwasu izocytrynowego (w procesie tym podstawowe znaczenie ma dehydrogenaza kwasu izocytrynowego współdziałająca z NADP). Kwas izocytrynowy jest częściowo usuwany z obiegu wskutek działalności izocytrynazy, przekształcającej go na kwasy bursztynowy i glioksalowy. W ten sposób cykl Krebsa ulega odwróceniu i skróceniu. Mimo, iż cykl ten jest u *Blastocladiella* mało operatywny, zmiany wywołane pod wpływem jonów dwuwęglanowych są źródłem bardzo interesujących syntez biochemicznych, które prowadzą do pojawienia się pewnych charakterystycznych cech morfologicznych. W rozwoju ontogenetycznym można wyeliminować zmiany wywołane obecnością dwutlenku węgla, przenosząc organizm na pożywkę bezwęglanową. Odwró-

cenie przemian biochemicznych jest jednakże możliwe tylko do pewnego określonego krytycznego punktu czasowego (przez około 3/5 czasu hodowli potrzebnej do otrzymania zarodni RS). Później zmiany metaboliczne wywołane obecnością dwuwęglanu są już nieodwracalne (24).

Nagromadzanie się kwasu α -ketoglutazarowego stymuluje powstawanie oksydazy polifenolowej, która pośredniczy w przeniesieniu wodoru do NADP. Redukcja NADP może wpływać na aktywność dehydrogenazy kwasu izocytrynowego. Ponieważ równocześnie z puli aminokwasów ubywa tyrozyny (27), przypuszczać należy, że tyrozyna utlenia się poprzez chinony do melanin. Jednakże zahamowanie oksydazy polifenolowej fenyloetiomocznikiem hamuje wprawdzie powstawanie melanin, ale nie wpływa na różnicowanie się zarodni RS. Pozwala to przypuszczać, że utlenianie tyrozyny nie jest źródłem wodoru, dla redukcyjnej karboksylacji kwasu α -ketoglutazarowego. Źródłem tym jest przypuszczalnie dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu, której aktywność w czasie powstawania zarodni przetrwalnych również wzrasta. Enzym ten prawdopodobnie bierze udział w rozkładzie specyficznego zapasowego węglowodanu zarodni przetrwalnych. W czasie różnicowania się RS pobierana z pożywki glukoza nie przekształca się w kwas mlekowy, lecz jest odkładana w postaci specyficznego węglowodanu, zbliżonego właściwościami do glikogenu (15). Rozkład tego węglowodanu i wykorzystanie do celów fermentacyjnych odbywa się dopiero w wykształconej już zarodni przetrwalnej, równoległe do syntezy melanin i chityny.

Zdolność do syntezy chityny mają zarówno rośliny wytwarzające zarodnie cienkościenne jak i zarodnie przetrwalne. Synteza tego związku przebiega w dwu etapach (49, 50). Jeden układ enzymatyczny pośredniczy w powstawaniu 6-fosfo-glukozyaminy i kwasu glutaminowego z fruktozy-6-fosforanu. Drugi układ, znacznie mniej aktywny, zlokalizowany prawdopodobnie w błonie komórkowej przeprowadza acetylowanie glukozyaminy przy współdziałaniu koenzymu A (27). Chitynaza występuje u obu typów roślin; jej aktywność jest jednak pięciokrotnie wyższa w zarodniach OC. Przypuszczalnie grubość błony komórkowej jest wypadkową działania obu układów enzymatycznych — syntetazy glukozyaminy i chitynazy. Powiązanie syntezy chityny z mechanizmem dwuwęglanowym wykazano, podnosząc stężenie dwuwęglanu powyżej poziomu optymalnego dla wytwarzania się zarodni przetrwalnych. W tych warunkach synteza chityny uległa dalszemu uaktywnieniu i w rezultacie powstające rośliny miały zarodnie przetrwalne o nienormalnie grubych błonach (51). Zarówno synteza melanin jak i chityny powinny znaleźć swe odbicie w gospodarce azotowej *Blastocladiella emersonii*. Dokładniejsza analiza wykazała, że chociaż ilość azotu w roślinach OC i RS jest mniej więcej na tym samym poziomie, to w roślinach RS gwałtownie zmniejsza się pula aminokwasowa (przede wszystkim ubywa tyrozyny)

i zanikają trzy frakcje białkowe występujące w roślinach cienkościenych, a pojawia się nowa frakcja, której nie ma w roślinach OC (16). Mechanizm powiązania syntezy γ -karotenu i tłuszczu ze zmianami w cyklu kwasów trójkarboksylowych nie został jeszcze wyjaśniony



Rys. 2. Schemat metabolizmu oddechowego i procesów z nim związanych u *Blastocladiella emersonii* w obecności dwutlenku węgla, opracowany wg Cantino (13)

Gluc — glukoza F1,5. P — fosforan 1,5-fruktozy; PGAld — aldehid fosfoglicynolowy; PGA — kwas pirogronowy; Pyr — kwas pirogronowy; LAC — kwas mlekowy; DAP — fosfodwuhydroksyaceton; α -GP — kwas α -fosfoglicerynowy; G6P — fosforan 6-glukozy; GPG — kwas 6-fosfoglikonowy; EMP — glikoliza

(19, 25). Powiązania pomiędzy cyklem Krebsa, działaniem dwuwęglanu i syntezami dodatkowymi przedstawiono schematycznie na rysunku 2.

Już pierwsze badania nad powstawaniem zarodni przetrwalnych wykazały, że rośliny produkujące zarodnie cienkościenne (szczepu dzikiego

i mutanta) rosną lepiej w świetle, niż w ciemności (19). Przez określenie „lepszy wzrost” rozumie się zarówno większy przyrost suchej masy (około 50%) (19), jak i przedłużenie czasu rozwoju osobniczego do 17,5 godz. (19), a także zwiększenie objętości organizmu ($1,5 \times 10^3 \mu^3$ w ciemności, $8 \times 10^3 \mu^3$ w świetle) (20). W dalszych badaniach określając różnice rozwojowe na świetle i w ciemności, posługiwano się jednym z powyższych kryteriów. Badania wymagały także kultur, w których wszystkie organizmy byłyby w mniej więcej jednakowym stadium rozwojowym. Stosując odpowiednie zabiegi, udało się uzyskać takie kultury zsynchronizowane (42, 55).

Przyrost suchej masy na świetle pozwalał przypuszczać, że powoduje ono stymulację procesów oddechowych. Jednakże okazało się, że średnia sucha masa 7-dniowych hodowli ze światła wynosiła 481,9 mg, a ilość CO_2 wydzielonego w tym czasie 16,8 μM , podczas gdy w ciemności wartości te wynosiły odpowiednio 316,5 mg i 29 μM CO_2 . Nie tylko więc nie było stymulacji oddychania, lecz nawet wyniki sugerowały pobieranie CO_2 w kulturach oświetlonych. Ponieważ już uprzednio stwierdzono podstawowe znaczenie CO_2 dla rozwoju i morfologii *Blastocladia emersonii*, zbadano wpływ $6,6 \times 10^{-4}\text{M}$ dwuwęglanu sodu na wzrost suchej masy na świetle i w ciemności. W warunkach tych przyrost suchej masy wynosił 100—150% suchej masy w ciemności. Doświadczenia z radioaktywnym dwuwęglanem wykazały, że kultury naświetlane wiązały w ciągu 90 minut inkubacji o 13% więcej CO_2 niż w ciemności, a chromatograficznie stwierdzono, że 80% pobranego węgla znajduje się w kwasach organicznych, przy czym radioaktywność kwasu bursztynowego z kultur naświetlonych sięgała 24,2% całkowitej radioaktywności, a w ciemności wynosiła tylko 13,3%.

Pomnażanie suchej masy na świetle w obecności dwutlenku węgla nazwali Cantino i McCurdy (55) lumisyntezą. Dla wyjaśnienia mechanizmu lumisyntezy przyjęto hipotezę, że światło wpływa na działanie dwutlenku węgla zmieniającego, jak już wspomniano, cykl kwasów trójkarboksylowych i wzmagającego cykl gliksalowy.

O powiązaniu wzmożonego cyklu gliksalowego z wpływem światła wnioskowano na podstawie następujących faktów:

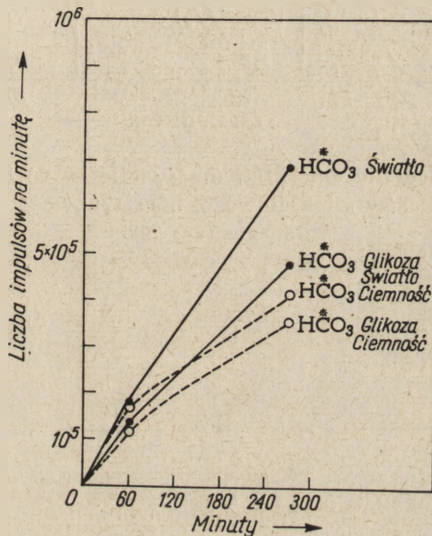
1. Obecność glukozy w pożywce utrzymując normalny kierunek przemian cyklu Krebsa winna przeciwdziałać procesowi lumisyntezy. Istotnie wykazano (rysunek 3), że obecność glikozy w pożywce obniża, szczególnie na świetle, wiązanie dwuwęglanu (19).

2. Na świetle spada ilość radioaktywnego kwasu α -ketoglutarynowego (19).

3. Oświetlenie powoduje szybki wzrost stężenia kwasu bursztynowego, przy czym wzrost ten jest tego samego rzędu wielkości co wzrost wiązania znakowanego dwuwęglanu (19).

4. W komórkach *Blastocladia emersonii* oprócz izocytrynazy występuje transaminaza glicyno-alaninowa; po przekształceniu kwasu izocytrynowego na kwasy bursztynowy i glioksalowy, ten ostatni może więc być usuwany z obiegu drogą transaminacji (lub przez przekształcenie na kwas szczawiowy (55)).

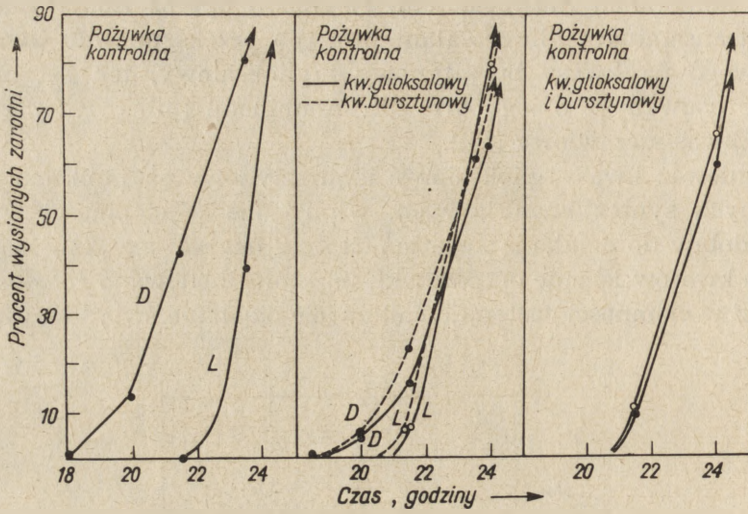
5. Ponieważ kwasy glioksalowy i bursztynowy są punktem wyjścia wzmoczonych syntez komórkowych, winny one w ciemności wywierać efekt podobny do działania światła. Istotnie okazało się (22), że dodanie obu tych kwasów łącznie do pożywki, na której hodowano *Blastocladia emersonii* w ciemności zastępuje całkowicie działanie światła (rysunek 4).



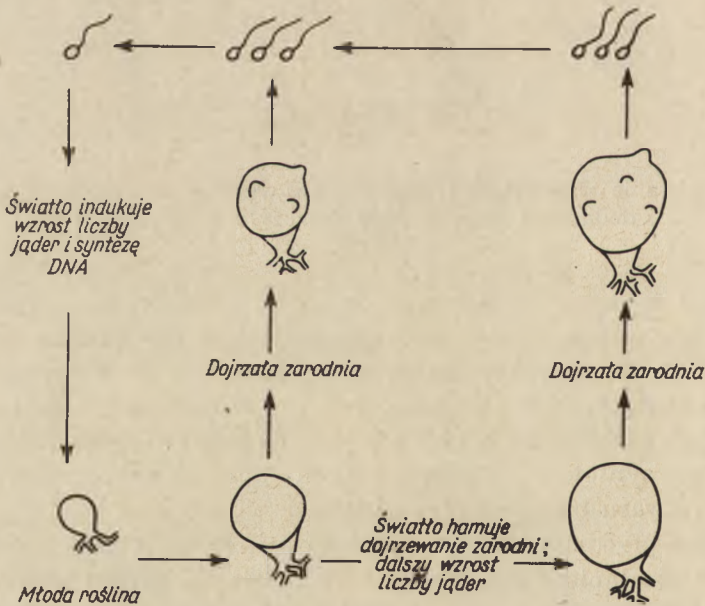
Rys. 3. Pobieranie znakowanego węgla z dwuwęglanu na świetle i w ciemności z dodatkiem glukozy i bez glukozy w pożywce (wg 19)

Opisany wyżej cykl wymaga istnienia dodatkowego mechanizmu, regulującego poziom kwasu α -ketoglutarynowego. Mechanizm ten nie jest znany. C a n t i n o przypuszcza, że źródłem kwasu α -ketoglutarynowego jest kwas bursztynowy. Być może jest to mechanizm analogiczny do postulowanego przez B u c h a n a n a (4a) dla bakterii fotosyntetyzujących, w którym syntetaza α -ketoglutarynu katalizuje powstawanie tego związku z kwasu bursztynowego i CO₂.

Schemat przedstawiony na rysunku 5 ilustruje efekty morfologiczne wywołane działaniem światła. Światło działa na bardzo młode grzybnie (1-7 — jądrowe) przyspieszając podziały jądrowe i syntezę DNA (12, 15, 65). W komórkach dojrzałych światło hamuje rozpad protoplastu na zoospory, natomiast stymuluje dalszy podział jąder, syntezę DNA i inne syntezы komórkowe (30). Zatem jednym z podstawowych efektów lumi-

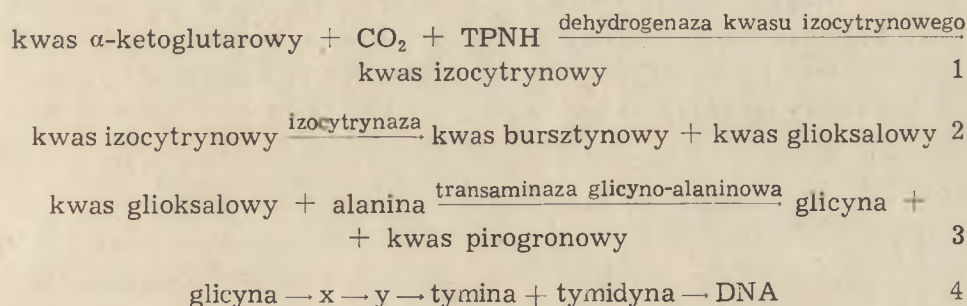


Rys. 4. Wzrost *Blastocladia emersonii* (na świetle — L) i w ciemności (D) z dodatkiem do pożywki kwasów glioksalowego, bursztynowego, lub obu tych związków łącznie (wg 22)



Rys. 5. Wpływ światła na morfologię grzybnii *Blastocladia emersonii* (30). Czas generacji, to jest przejście pełnego cyklu rozwojowego trwa na świetle o 1—4 godz. dłużej

syntezy jest wzrost ilości DNA w komórce. Dla wyjaśnienia tej syntezy Cantino i Turian (30) proponują następujący tok reakcji:



Autorzy zgromadzili szereg danych przemawiających za takim właśnie schematem, a mianowicie:

1. Aktywność transaminazy glicyno-alaninowej utrzymuje się na stałym poziomie przez cały czas rozwoju rośliny OC, synteza izocytrynazy natomiast następuje w późniejszym okresie rozwojowym (30, 55).

2. W pierwszym okresie zatem, pobieranie glicyny ze środowiska zewnętrznego w ciemności jest znacznie większe ($10,7 \times 10^{-6} \mu\text{M}$) niż na świetle ($1,3 \times 10^{-6}$), ponieważ światło stymuluje cykl dostarczający organizmowi glicyny. W roślinach starszych zwiększanie się syntezy na świetle wymaga dodatkowych ilości glicyny w środowisku (wzrost pobierania do $67 \times 10^{-6} \mu\text{M}$), natomiast aktywna synteza izocytrynazy i mniejsze zapotrzebowanie na glicynę w ciemności powodują zaspakajanie potrzeb komórki ze źródeł wewnętrznych i pobieranie glicyny ze środowiska spada do $5 \times 10^{-6} \mu\text{M}$ (30).

3. Podanie znakowanej glicyny powoduje wzrost radioaktywności DNA; praktycznie cały węgiel radioaktywny znajduje się w tyminie i cytozynie (30).

4. Działanie światła na pomnażanie liczby jąder w pierwszym okresie rozwojowym grzyba, można całkowicie zastąpić dodaniem do pożywki tyminy (lub tymidyny) (65).

Poza wzmoczeniem syntezy DNA światło powoduje zwiększenie ilości innych składników komórki; mechanizmem tych syntez nie zajmowano się jednak bliżej. W tabelicy 2 zestawiono dane liczbowe dotyczące syntezy, których natężenie wzrasta pod wpływem światła.

Orientacyjne badania nad wpływem natężenia światła wykazały, że pomiędzy 0—100 św.stop. (1 św.stop. = 10,8 luksa) lumisynteza jest wprost proporcjonalna do natężenia światła, a czynny zakres promieniowania mieści się w granicach 400—500 nm (rysunek 6). Wpływ czasu ekspozycji jest liniowy, a najlepsze efekty daje światło ciągłe (22).

Światło może działać w różny sposób na proces lumisyntezy. Najbardziej prawdopodobne były dwie możliwości: światło reguluje wytwarzanie związków redukujących biorących udział w reduktywnej

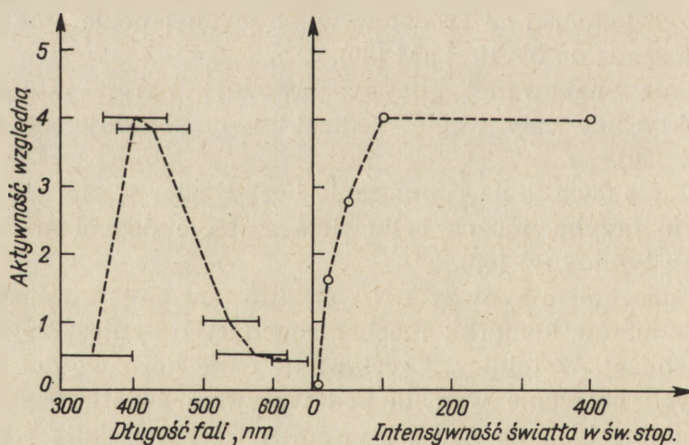
karboksylacji kwasu α -ketoglutowego lub światło przyspiesza przekształcanie kwasu izocytrynowego czy glioksalowego. Podczas badań nad wyodrębnieniem izocytryny wyeliminowano tę drugą możliwość (55). Przy badaniach nad rolą światła w procesach redukcyjnych wykorzystano fakt, że NADP redukuje żelazocyjanek do żelazocyjanku; reakcja ta nie zależy od światła i można ją łatwo śledzić spektrofotometrycznie.

Tablica 2

Wpływ światła na metabolizm *Blastocladiella emersonii* (wg 14)

	Przyrost w % w naświetlanych komórkach	
	młodych	w pełni wykształconych
Sucha masa	8	51
Kwasy nukleinowe	wzrost	28
DNA	wzrost	35
Białka	21	37
Węglowodany	13	74

Jeżeli do mieszaniny żelazocyjanku i NADPH dodać wyciąg z komórek *Blastocladiella*, wówczas w ciemności redukcja żelazocyjanku przebiega z normalnym natężeniem, natomiast na świetle ulega szybkiemu zahamowaniu. Jeżeli w układzie NADPH-żelazocyjanek znajduje się kwas α -ketoglutowy, wówczas w miarę redukcji kwasu nie tylko nie nastę-

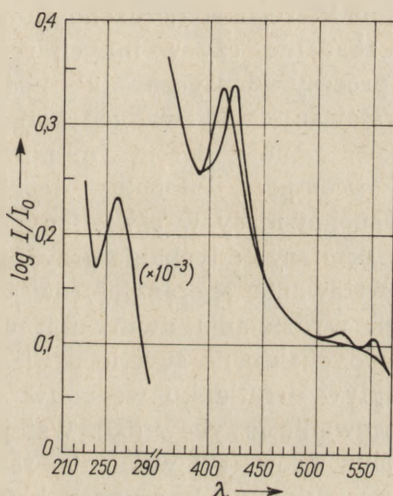


Rys. 6. Orientacyjne widmo czynne lumisyntezy (na lewo) i wpływ natężenia światła na ten proces (na prawo) (wg 22)

puje na świetle redukcja żelazocyjanku, ale już zredukowany żelazocyjanek ulega ponownie utlenieniu (22). Doświadczenia te wskazywałyby, że światło steruje zapasem NADPH w komórce sprzyjając redukcji kwasu α -ketoglutowego, a blokując inne reakcje redukcyjne. Ponieważ

redukcja kwasu α -ketoglutarynowego zachodzi również w układzie dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu uzyskano raz jeszcze dowód, że w komórce istnieją conajmniej dwa źródła wodoru dla reduktywnej karboksylacji, oba podległe działaniu światła.

Lumisynteza musi być oczywiście związana z jakimś absorbującym światło układem barwników w komórce. *Blastocladiella emersonii* jest grzybem, nie ma zatem układu chlorofilowego, a komórki przeprowadzające lumisyntezę nie mają również i karotenoidów. W roku 1965 Cantino uzyskał pierwsze dane na temat hipotetycznego fotoreceptora, stwierdzając, że w komórkach grzybni hodowanych na świetle występuje wolny cytochrom. We frakcji „cytochromowej” z takich komórek na chromatogramie znajduje się cytochrom, DNA, białko i minimalne ilości dehydrogenazy kwasu mlekowego. W tej samej frakcji,



Rys. 7. Widmo absorpcji wolnego cytochromu wyekstrahowanego z roślin *Blastocladiella emersonii*, hodowanych na świetle (wg 14)

pochodzącej z roślin hodowanych w ciemności stwierdził on obecność identycznych ilości białka i DNA, nie znalazł natomiast cytochromu ani dehydrogenazy. Na rysunku 7 przedstawiono widmo absorpcji cytochromu wyizolowanego z *Blastocladiella emersonii*.

Z uwagi na małą czystość preparatów cytochromu *Blastocladiella* nie można było zidentyfikować tego barwnika ze znanymi już cytochromami grupy b; dalsze badania winny wykazać, czy stwierdzona różnica w sposobie występowania cytochromu w komórkach *Blastocladiella* ma istotne znaczenie dla procesu lumisyntezy (14).

Badania Cantino, aczkolwiek jeszcze nie zakończone, stanowią piękny przykład powiązania zmian morfologicznych i rozwojowych z procesami biochemicznymi odbywającymi się w komórce. Doprowadziły one także do stwierdzenia, że jednym z podstawowych czynników

rozwojowych tego grzyba jest dwutlenek węgla. W niskich stężeniach jest on wykorzystywany do reduktywnej karboksylacji kwasu α -keto-glutarowego, przy czym światło zwiększa natężenie tego procesu i prowadzi do wzmożenia wielu syntez komórkowych. O ile optimum lumisyntezy przypada na stężenie 10^{-4} M dwuwęglanu, to stężenia wyższe (10^{-2}) zmieniają zupełnie syntezę inicjowaną przez reduktywną karboksylację i prowadzą do procesów biochemicznych dających w rezultacie powstawanie zarodni przetrwalnych.

Blastocladiella emersonii w układzie filogenetycznym pleśni wodnych jest jednym ze skrajnych heterotrofów; mimo to jednak zdolna jest do lumisyntezy, stanowiącej pewien nawrót do autotroficznego sposobu odżywiania się. Możliwość istnienia takiego nawrotu postulowali już wcześniej Lynch i Calvin (54). W chwili obecnej *Blastocladiella* jest jedynym organizmem, u którego stwierdzono lumisyntezę, dlatego też interesującym byłoby zbadanie, czy w innych roślinach heterotroficznym nie występują procesy identyczne lub podobne. Jak wiadomo, światło wywołuje powstawanie tak zwanych konidioforów lub sporangioforów olbrzymich, połączone z ogromnym powiększaniem się objętości tych organów (*Phycomyces*, *Pilobolus*, *Aspergillus giganteus* (41, 67)), a także przyrost suchej masy w oświetlonych hodowlach *Penicillium isariaeforme* (66). Pomiarzy oddychania grzybni *Phycomyces blakesleanus* w trakcie powstawania sporangioforów olbrzymich wykazały bardzo znaczny spadek wydzielania dwutlenku węgla, a więc proces podobny do zmian w oddychaniu na świetle u *Blastocladiella*. W latach ostatnich wykazano wpływ dwutlenku węgla (w sposób niestety mało sprecyzowany) na owocowanie grzybów (58). Wstępne badania nad gospodarką fosforanową śluzowców (57) wskazują również na możliwość występowania lumisyntezy w innych grupach heterotrofów.

Na podstawie tych nielicznych danych można przypuścić, że poszukiwania procesów zbliżonych do lumisyntezy *Blastocladiella* u innych organizmów, których rozwój zależy od światła, mogą dać wyniki pozytywne. Badania takie nie tylko mogłyby ugruntować naszą znajomość procesów biochemicznych decydujących o drogach rozwoju ontogenetycznego grzybów, ale rzuciłyby być może nowe światło na zagadnienia filogenezy w obrębie tej grupy.

LITERATURA

1. Aschan-Aberg K., *Physiol. Plantarum* **13**, 276 (1960).
2. Banbury G. H., *Handbuch Pflanzenphys.*, tom XVII/1, red. W. Ruhland, Springer, Berlin 1959.
3. Barner H. D., Cantino E. C., *Am. J. Botany* **39**, 746 (1952).
4. Brown D. H., Cantino E. C., *Am. J. Botany* **42**, 337 (1955).
- 4a. Buchanan, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **54**, 1212 (1965).

5. Bunning E., *Planta* **26**, 719 (1937).
6. Cantino E. C., *Anton Leeuwenhoek J. Microbiol.* **17**, 325 (1951).
7. Cantino E. C., *Am. Natur.* **36**, 399 (1951).
8. Cantino E. C., *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **15**, 159 (1953).
9. Cantino E. C., *VIII Con Int. Bot.* 98—100, (1954).
10. Cantino E. C., *Quart. Rev. Biol.* **30**, 138 (1955).
11. Cantino E. C., *Mycologia* **48**, 225 (1956).
12. Cantino E. C., *Phytochemistry* **1**, 107 (1961).
13. Cantino E. C., *Handbuch Pflanzenphys.*, tom XV, red. W. Ruhland, Springer Berlin 1965.
14. Cantino E. C., *Arch. Mikrobiol.* **51**, 42 (1965).
15. Cantino E. C., Goldstein A., *Arch. Mikrobiol.* **39**, 43 (1961).
16. Cantino E. C., Goldstein A., *Am. J. Botany* **49**, 642 (1962).
17. Cantino E. C., Horenstein E. A., *Am. Natur.* **88**, 141 (1954).
18. Cantino E. C., Horenstein E. A., *Physiol. Plantarum* **8**, 189 (1955).
19. Cantino E. C., Horenstein E. A., *Mycologia* **48**, 777 (1956).
20. Cantino E. C., Horenstein E. A., *Mycologia* **48**, 443 (1956).
21. Cantino E. C., Horenstein E. A., *Mycologia* **49**, 892 (1957).
22. Cantino E. C., Horenstein E. A., *Physiol. Plantarum* **12**, 251 (1959).
23. Cantino E. C., Hyatt M. T., *Anton Leeuwenhoek, J. Microbiol.* **19**, 25 (1953).
24. Cantino E. C., Hyatt M. T., *J. Bacteriol.* **66**, 712 (1953).
25. Cantino E. C., Hyatt M. T., *Am. J. Botany* **40**, 688 (1953).
26. Cantino E. C., Lovett J. S., *Physiol. Plantarum* **13**, 450 (1960).
27. Cantino E. C., Lovett J. S., Horenstein E. A., *Am. J. Botany* **44**, 498 (1957).
28. Cantino E. C., Lovett J. S., Leak L. V., Lythgoe J., *J. Gen. Microbiol.* **31**, 393 (1963).
29. Cantino E. C., Turian G. T., *Annual Rev. Microbiol.* **13**, 97 (1959).
30. Cantino E. C., Turian G. T., *Arch. Mikrobiol.* **38**, 272 (1961).
31. Carlile M. J., *Nature* **180**, 202 (1957).
32. Carlile M. J., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **16**, 175 (1965).
33. Couch J. N., Whiffen A. J., *Am. J. Botany* **29**, 582 (1942).
34. Curry G. M., Thimann K. V., *Progress in Photobiology*, red. B. Ch. Christensen, B. Buchmann 1960, str. 127.
35. Curry G. M., Gruen H. E., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **45**, 497 (1959).
36. Delbrück M., *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **75**, 411 (1962).
37. Delbrück M., Shropshire W., *Plant Physiol.* **35**, 194 (1960).
38. Domnas A., Cantino E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **97**, 300 (1965).
39. Emerson R., *Aspects of synthesis and order in growth*, E. Rudnick, Princeton 1954, str. 171.
40. Emerson R., Cantino E. C., *Am. J. Botany* **35**, 157 (1948).
41. Gardner E. B., *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **17**, 476 (1955).
42. Goldstein A., Cantino E. C., *J. Gen. Microbiol.* **28**, 689 (1962).
43. Harder R., Sörgel G., *Nachr. Gesell. Wiss. Göttingen* **3**, 119 (1938).
44. Ingold C. T., *Ann. Botany N. S.* **22**, 129 (1958).
45. Ingold C. T., *Biological Receptor Mechanisms. Symp. Soc. Exp. Biol. Cambridge* **16**, 154 (1962).
46. Leach Ch. M., *Can. J. Botany* **40**, 1577 (1962).
47. Leach Ch. M., *Can. J. Botany* **43**, 185 (1965).
48. Lovett J. S., *J. Bacteriol.* **85**, 1235 (1963).
49. Lovett J. S., Cantino E. C., *Am. J. Botany* **47**, 499 (1960).
50. Lovett J. S., Cantino E. C., *Am. J. Botany* **47**, 550 (1960).

51. Lovett J. S., Cantino E. C., *Mycologia* **52**, 338 (1960).
52. Lovett J. S., Cantino E. C., *J. Gen. Microbiol.* **24**, 87 (1961).
53. Lukens R. J., *Am. J. Botany* **50**, 720 (1963).
54. Lynch V. H., Calvin X., *J. Bacteriol.* **63**, 526 (1952).
55. Mc Curdy H. D. Jr., Cantino E. C., *Plant Physiol.* **35**, 463 (1960).
56. Mohr H., *Handbuch Pflanzenphys.* tom XVI, W. Ruhland, Springer, Berlin 1961, str. 438.
57. Mukherjee K. L., Zabka G. G., Nair P., *Can. J. Botany* **43**, 483 (1965).
58. Niederpruem D. J., *J. Bacteriol.* **85**, 1300 (1963).
59. Page R. M., *Mycologia* **48**, 206 (1956).
60. Piskorz B., *Acta Soc. Bot. Pol.* (w druku)
61. Rudolph H. J., *Biol. Zbl.* **77**, 385 (1958).
62. Schneiderhohn G., *Arch. Mikrobiol.* **21**, 230 (1954).
63. Shropshire W. Jr. Gettens R. H., *Plant Physiol.* **41**, 203 (1966).
64. Thimann K. V., Curry G. M., *Comparative Biochemistry*, tom I, Academic Press 1960, str. 243.
65. Turian G., Cantino E. C., *J. Gen. Microbiol.* **21**, 721 (1959).
66. Zalokar M., *Arch. Biochem. Biophys.* **56**, 318 (1955).
67. Zurzycka A., *Acta Soc. Bot. Pol.* **32**, 715 (1963).

JAN ZURZYCKI*

Wpływ światła na strukturę aparatu fotosyntetycznego

The Influence of Light on the Structure of Photosynthetic Apparatus

The influence of light on the synthesis of pigments and development of the ultrastructure of chloroplasts is reviewed. The adaptation phenomena of plants to the light factor are discussed. The destructive effects of intense light on the photosynthetic apparatus is presented.

Podstawowe znaczenie światła dla życia roślin wiąże się ze zjawiskiem fotosyntezy. Rola światła nie ogranicza się jednak wyłącznie do dostarczenia energii potrzebnej do procesu fotosyntezy; światło wywiera również różnorodny i wielokierunkowy wpływ na rozwój i ostateczne wykształcenie aparatu fotosyntetycznego, jego strukturę, zestaw ilościowy i jakościowy barwników fotosyntetycznych itp. Uzależnienie struktury aparatu fotosyntetycznego od warunków świetlnych środowiska zaliczane bywa do zjawisk adaptacyjnych, które pozwalają na najbardziej efektywne w danych warunkach wykorzystanie energii świetlnej do fotosyntezy.

I. Wpływ światła na rozwój aparatu fotosyntetycznego

1. Rola światła w syntezie chlorofilów

Zagadnienie syntezy chlorofilów zostało ostatnio przedstawione przez Więckowskiego (149). W tym artykule omówione zostaną tylko te aspekty biosyntezy chlorofilów, które związane są z rolą światła i zagadnieniami strukturalnymi. U roślin wyższych światło odgrywa zasadniczą rolę w ostatnich etapach syntezy chlorofilu. Poza nielicznymi wypadkami wytwarzanie chlorofilu w ciemności jest zupełnie wstrzymane. Rośliny wyrosłe w ciemności mają blade, żółto-zielonkawe zabarwienie, związane z występowaniem w nich protochlorofilu i karotenoidów. Oświetlenie takich roślin wyzwala cykl procesów, które prowadzą

* Prof., dr, Katedra Fizjologii Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Wykaz używanych skrótów: DCMU — 3-(3,4-dwuchlorofenyl)-1,1-dwumetylo-
mocznik, CCP — *m*-chloro-karboonylocyjanek fenylohydrazonu.

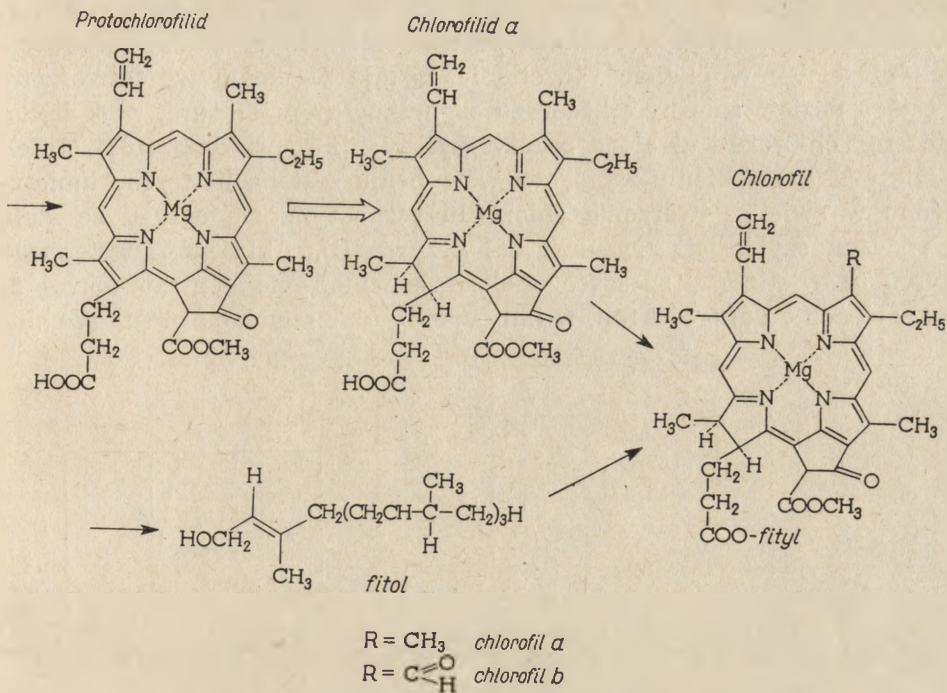
do szybkiej syntezy chlorofilów, co po kilku godzinach jest już dostrzegalne jako wyraźne zazielenienie.

Protochlorofil, którego struktura została wyjaśniona dzięki badaniom Fischera i Oesterreichera (28), różni się od chlorofilu *a* tylko brakiem dwu atomów wodoru w pozycji 7 i 8, w miejsce których występuje podwójne wiązanie (rysunek 1) i wykazuje zbliżone do chlorofilu własności absorpcyjne (rysunek 2) (maksimum w czerwieni *in vivo* dla protochlorofilu przy 650 nm*, dla chlorofilu *a* — przy 677 nm) (61, 113). Oświetlenie tkanki liścia wyrosłego w ciemności i zawierającego protochlorofil powoduje w czasie rzędu kilku minut niemal całkowity zanik protochlorofilu, w miejsce którego pojawia się w równoważnych ilościach chlorofil *a* (61, 136). Przemiana ta zachodzi również w temperaturach poniżej 0°, ale jej kinetyka wskazuje, że nie jest to prosta reakcja fotochemiczna pierwszego rzędu (120, 136). Widmo działania światła w przemianie protochlorofilu w chlorofil (rysunek 2) wykazuje pełną zgodność z absorpcją światła przez protochlorofil. Zgodność ta jest szczególnie dobrze widoczna u roślin posiadających tylko śladowe ilości karotenoidów (mutant *albino*), natomiast w innych obiektach aktywność promieniowania krótkofalowego jest obniżona w stosunku do światła czerwonego z uwagi na maskujące działanie tych barwników (61). Minimalne natężenie światła konieczne do wywołania reakcji jest bardzo niskie (121), przy czym istnieje prosta zależność między czasem oświetlenia światłem o małych natężeniach, a szybkością tworzenia chlorofilu (60, 62).

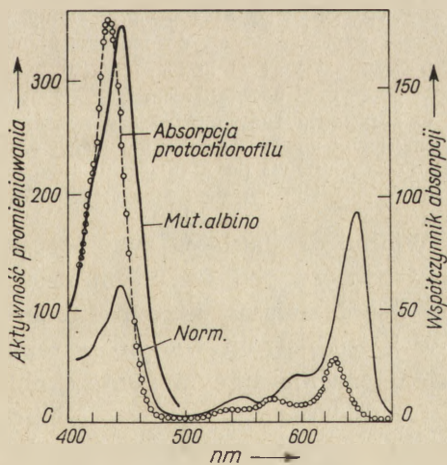
Większość protochlorofilu występuje w liściach w formie pozbawionej grupy fitolowej (protochlorofilid). Pod wpływem światła związek ten przekształca się najpierw w chlorofilid *a*, a dopiero w późniejszym okresie następuje dołączenie reszty fitolowej, dające pełny chlorofil *a*. Ta ostatnia przemiana może odbywać się w ciemności (138, 153). Ostatnio coraz więcej danych wskazuje, że chlorofil *b* powstaje przez przekształcenie chlorofilu *a*, przy czym i ta przemiana może zachodzić w ciemności (115, 116). W myśl tych poglądów schemat ostatnich etapów biosyntezy chlorofilów można przedstawić jak na rysunku 1.

Liście wyrosłe w ciemności zawierają ograniczoną ilość protochlorofilu. Umieszczenie takich obiektów w świetle powoduje w krótkim czasie przekształcenie prawie całej zawartości protochlorofilu w chlorofil (rysunek 3a) (okres 1), po czym następuje okres zahamowania dalszej syntezy chlorofilów trwający normalnie od 2 do 4 godzin (okres 2), a wreszcie (okres 3) obserwuje się nową trwałą fazę intensywnej syntezy (rysunek 3a, krzywa I) prowadzącą do widocznego zazielenienia liścia (73, 137, 152). Nieco inaczej przedstawia się przebieg syntezy chlorofilu w liściach poddanych działaniu krótkiego na przykład 5 minutowego im-

* nm (nanometr) = 10^{-9} m = m μ

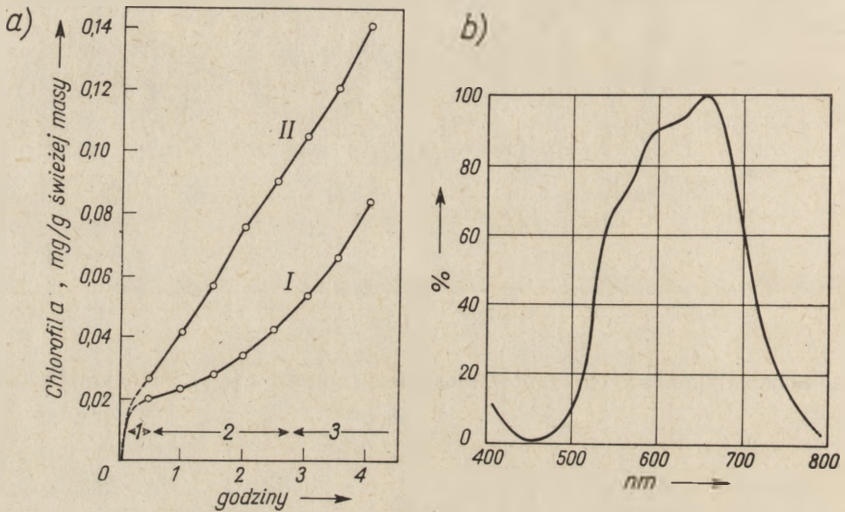


Rys. 1. Schemat końcowych etapów biosyntezy chlorofilów w zielonym liściu (116)



Rys. 2. Absorpcja protochlorofilu w roztworze metanowym (linia przerywana) i widma działania światła w przemianie protochlorofilu w chlorofil (linia ciągła) u normalnych siewek kukurydzy i u mutacji *albino*. Oba widma wyrównane w zakresie długofalowym (61)

pulsu świetlnego, a następnie przetrzymywanych przez szereg godzin w ciemności. W tych warunkach protochlorofil, który zanikł całkowicie lub częściowo w okresie oświetlenia zostaje w ciemności odtworzony i osiąga poziom zależny od szeregu czynników (temperatura, wiek liścia, stężenie chlorofilu *a*) ale z reguły wyższy niż poprzednio (162). Jeżeli liście poddane takiemu zabiegowi wstępnemu zostaną następnie umieszczone w świetle, tworzenie chlorofilu rozpoczyna się odrazu ze stałą i znaczną szybkością (rysunek 3a, krzywa II). Aktywność wstępnego impulsu świetlnego, znoszącego okres zahamowania syntezy (okres 2) jest zależna od długości fali, w inny sposób niż przemiana prosta w chlo-



Rys. 3a. Przebieg syntezy chlorofilu w siewkach pszenicy wyhodowanych w ciemności i przeniesionych do stałego światła.

I — okres wstępny: ciągła ciemność, II — okres wstępny: ciemność przerywana krótkim naświetlaniem

b. Widmo czynne w skróceniu fazy opóźnienia syntezy chlorofilu (faza 2).

5 godz. przed naświetlaniem siewki poddano 2 min. impulsowi światła o różnej długości fali. Aktywność światła określono na podstawie ilości chlorofilu utworzonego po 2 godz. naświetlania światłem 4000 luksów. Za 100% na skali przyjęto efekt maksymalny (136, 137)

rofil (rysunek 3b). Widmo działania w tym procesie jak i charakterystyczna odwracalność procesu pod wpływem naświetlenia daleką czerwień wskazują, że współdziała tu system fitochromowy (73, 94, 140). Należy wnosić, że w liściu potraktowanym wstępnie krótkim bodźcem świetlnym, czynnikiem ograniczającym syntezę chlorofilu przy ponownym naświetleniu staje się nie reakcja fotochemicznej przemiany protochlorofilu w chlorofil, ale synteza protochlorofilu związana w nieznanym bliżej sposób z aktywnością systemu fitochromowego.

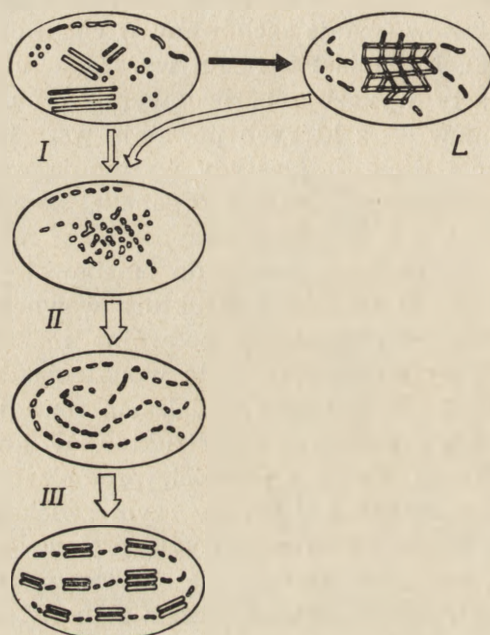
W liściach rozwijających się normalnie na świetle nie można wykazać obecności protochlorofilu, prawdopodobnie z uwagi na jego szybką przemianę w chlorofil w tych warunkach. Karotenoidy wytwarzane

w liściach w ciemności występują głównie w formie ksantofilu. Wytwarzanie karotenów wydaje się być również zależne od światła, a warunki ich powstawania *in vivo* są analogiczne jak dla chlorofilu *a* (11).

2. Wpływ światła na rozwój chloroplastów

U roślin niższych (glony) nowe chloroplasty powstają przez podział plastydów macierzystych, przy czym ich struktura nie ulega zasadniczym zmianom w trakcie rozwoju organizmu. Już w grupie mszaków obserwuje się znaczne zmniejszenie liczby chloroplastów i uproszczenie ich budowy w komórkach inicjalnych, jednakże zasadniczy schemat struktury chloroplastów zostaje zachowany w ciągu całego cyklu rozwojowego rośliny (56). Natomiast u roślin wyższych (nago- i okrytozalążkowych) chloroplasty wykazują bardzo wyraźną metamorfozę. W komórkach merystemów — z których powstają wszystkie tkanki dojrzałej rośliny, a więc i liście — plastydy występują wyłącznie w postaci tak zwanych proplastydów. Drobne organelle komórkowe, jakimi są proplastydy, wielkością i kształtem przypominają mitochondria, a różnią się od tych ostatnich zdolnością do amebowatej zmiany kształtu, częstą obecnością skrobi oraz inną strukturą wewnętrzną. Protoplastydy są odgraniczone od cytoplazmy podwójną membraną, której wewnętrzna warstwa wytwarza rurkowate wpuklenia do wnętrza plastydu (rysunek 4). Rurki te stanowią w dalszym rozwoju ważny materiał wyjściowy do budowy powstających struktur. W komórkach, których dalszy rozwój odbywa się w ciemności, protoplastydy przekształcają się w leukoplasty (rysunek 4, L), przy czym zwiększają swe wymiary i wykształcają tak zwane centrum plastydu (*prolamellar body*) (81). Centrum to, widoczne nawet w mikroskopie optycznym (132, 133) może posiadać różną ultrastrukturę, zwykle jednak stanowi ono regularne skupienie rurek przypominające siatkę krystaliczną i nazywane od odkrywców kryształem Heitza-Leyona (46, 64, 70, 71, 92). Przekształcenie leukoplastu w chloroplast wymaga światła. Nawet w warunkach naturalnych, gdy młode liście są zaciemnione przez osłaniające je okrywy, rozwój chloroplastu przechodzi przez stadium leukoplastu. Natomiast w komórkach silnie oświetlonych protoplastydy przekształcają się bezpośrednio w chloroplasty (81). Przekształcenie proplastydu w chloroplast odbywa się w kilku etapach. Najpierw rurki rozpadają się na pęcherzyki (rysunek 4, I), następnie pęcherzyki te układają się regularnie tworząc warstwy mniej więcej równoległe do powierzchni plastydu (rysunek 4, II). Wreszcie następuje fuzja pęcherzyków w dyski będące początkiem tylakoidów gran. Dyski te mogą się dzielić i skupiać w agregaty dające początek granom chloroplastu (rysunek 4, III) (25, 141, 145). Każdy z wymienionych etapów wymaga światła. Etap I może przebiegać w czasie zdumiewająco krótkim jak na przemianę strukturalną.

Stwierdzono na przykład, że w ciągu dwóch minut oświetlenia może nastąpić zupełny rozpad rurek na pęcherzyki (25). Do wywołania całkowitego rozpadu rurek wystarczają niskie energie promieniowania (poniżej 10^4 erg/cm²). Widmo działania światła w tej reakcji wykazuje maksimum przy 660 i 450 nm i odpowiada absorpcji światła przez protochlorofil (25). Wykazano zgodność czasową w etapie I i transformacji protochlorofilu w chlorofil *a* (względnie protochlorofilidu w chlorofilid *a*) (141). Należy zatem wnosić, że przemianie zlokalizowanego w rurkach protoplastydu protochlorofilu w chlorofil towarzyszy równoczesny rozpad rurek na pęcherzyki. Ścisły związek między strukturą rurkową,



Rys. 4. Schemat przemian strukturalnych podczas rozwoju proplastydu w chloroplast (141). (Objaśnienia w tekście)

a protochlorofilem wynika z jeszcze jednej obserwacji. Plastydy krótko naświetlone i umieszczone w ciemności odtwarzają nowe ilości protochlorofilu. Jak wykazały badania ich ultrastruktury zjawisku temu towarzyszy powstawanie nowych rurek (25).

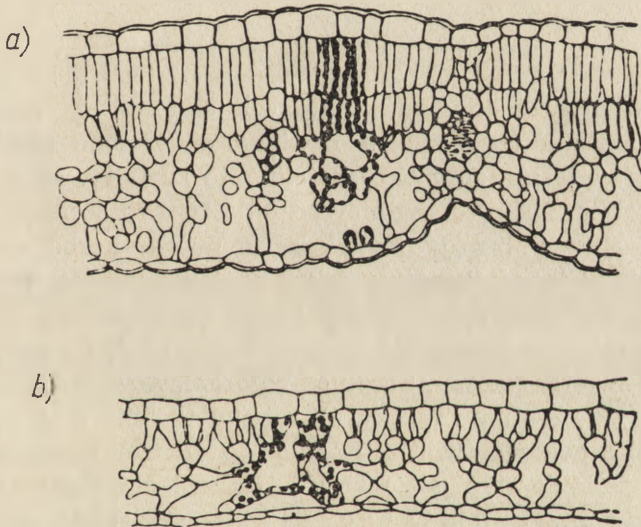
Etap II przebiega niezależnie od temperatury (w granicach 3—23°C) i wymaga silniejszego naświetlania niż etap I (25). Szybkość reakcji jest odwrotnie proporcjonalna do natężenia oświetlenia w zakresie od 750 do 75 000 lx. Widmo działania światła w tej przemianie wykazuje wyraźne maximum przy 450 nm, a znacznie słabszą aktywność przy 402, 660 i 550 nm, przy czym rodzaj barwnika absorbującego światło jest nieznan (47). Etap III polegający na fuzji pęcherzyków w dyski i sku-

pianiu się dysków w grana jest zależny od temperatury i wymaga również światła o większych natężeniach. Przemiana ta jest skorelowana w czasie z fazą silnej syntezy chlorofilu (rysunek 3, okres 3) (46, 141). Dotychczas nie ma danych o widmie działania w tym procesie.

II. Zależność wykształconego aparatu fotosyntetycznego od warunków świetlnych środowiska

1. Struktura anatomiczna liścia

Wiele gatunków roślin wykazuje ściśle związanie z określonymi środowiskami. Istnieją na przykład gatunki rosnące wyłącznie w warunkach cienistych oraz takie, które występują w miejscach silnie naświetlonych (gatunki umbro- i heliofilne). Liście obu wymienionych grup roślin różnią się w sposób istotny swą budową anatomiczną. U roślin



Rys. 5. Przekrój liści leszczyny (*Coryllus avellana*). a — liść rozwinięty w pełnym świetle, b — w świetle o natężeniu wynoszącym 1/50 natężenia światła dziennego. W części komórek czarno zaznaczone chloroplasty (49)

światłolubnych liście są grube, a ich tkanka mięksizu palisadowego rozwinięta, często kilkuwarstwowa, natomiast u cieniolumbnych liście są cienkie, a mięksizu palisadowy zredukowany, o strukturze luźnej, z licznymi przestworami międzykomórkowymi (65, 66, 68). Powyższe różnice anatomiczne traktowane bywają jako wyraz powstałego w rozwoju filogenetycznym przystosowania, w wyniku którego rozwinęła się i utrwaliła genetycznie struktura pozwalająca na najkorzystniejsze

w danych warunkach siedliska funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego (10, 96). Adaptacja filogenetyczna określająca pewien typ rozwojowy struktury liścia pozostawia jednak często dość szeroki zakres dla zmienności indywidualnej. W obrębie tej zmienności powstać może adaptacja ontogenetyczna wyrażająca się korelacją między strukturą anatomiczną danego osobnika lub nawet jego części, a aktualnymi warunkami świetlnymi, w których przebiegał rozwój liści (122,123). Doskonałymi przykładami takiej adaptacji są zmiany anatomiczne liścia obserwowane w populacji określonego gatunku rośliny rosnącej u wylotu jaskini i w różnej jej głębokości, a więc w coraz to słabszym oświetleniu (124, 155) lub też liście tego samego drzewa, które rozwinęły się w warunkach pełnego światła lub w głębokim cieniu (49, 85, 123). Jakkolwiek powyższe obserwacje natury ekologicznej nie dowodzą, że jedynie światło jest w tych wypadkach czynnikiem kształtującym, to jednak nowsze badania doświadczalne (10, 34) wykazują, że czynnikiem światłemu należy przypisać główną rolę w kształtowaniu charakteru anatomicznego liścia.

2. Wielkość i struktura chloroplastu

W przeciwieństwie do glonów, których chloroplasty odznaczają się ogromną różnorodnością kształtu i wielkości, zielone plastydy roślin wyższych posiadają z reguły bardzo jednolite kształty. Mają one postać płaskiej elipsoidy (dysku) o średnicy od 3 do 10 μ (przeciętnie około 5 μ). Warunki świetlne wpływają jednak zarówno na liczbę chloroplastów wytworzonych w jednej komórce jak i na ich wielkość. W komórkach rozwijających się w silnym świetle liczba chloroplastów jest większa (32), a ich wymiary mniejsze (52) w porównaniu z tkankami, które rozwinęły się w świetle słabym. Średnice chloroplastów w liściach z cienia są przeciętnie dwukrotnie (Tablica 1), a powierzchnie 3—6 razy większe niż w liściach z pełnego światła. Różnice te utrzymują się nawet wówczas, gdy oświetlenie staje się wybitnie słabe i ogranicza silnie wzrost rośliny. Tak na przykład Starzeczki (124) stwierdził, że u paprotki *Asplenium trichomanes* rosnącej w pełnym świetle średnica chloroplastów wynosi przeciętnie 5,9 μ , natomiast u okazów rozwijających się w głębi jaskini, gdzie dociera średnio 1% światła — średnica ta wzrasta do 7,3 μ .

Wpływ światła dotyczy nie tylko wielkości chloroplastu, ale i jego struktury wewnętrznej. W chloroplastach z liści silnie oświetlanych liczba gran jest większa, a równocześnie ich wymiary mniejsze (2, 26, 31, 45) (Tablica 2). Jak sugeruje Abel (2) struktura granowa może ulegać przemianom nawet w wyrośniętym chloroplastie przy zmianie warunków świetlnych. Na przykład w komórkach liści *Antirrhinum majus*, które rozwinęły się w pełnym świetle, grana mają średnicę 0,30 μ , a po

przeniesieniu do słabego światła (850 luksów) średnica ich wzrasta do $0,50 \mu$ przy równoczesnym zmniejszeniu się średniej liczby gran w chloroplastach z 68,3 do 44,5. Powrót do poprzednich warunków świetlnych powoduje ponowny wzrost liczby gran do 70,9 i równoczesne zmniejszenie ich średnicy do $0,31 \mu$. Obserwacje powyższe wymagają potwierdzenia, jednakże nowsze dane wykazują tak znaczną labilność i plastyczność struktury granowej (55), że możliwość przekształcania wewnętrznej struktury wyrośniętego chloroplastu należy uważać za prawdopodobną.

T a b l i c a 1

Średnia wielkość średnicy chloroplastów w liściach pochodzących z pełnego światła i z cienia (51)

Gatunek	Średnica chloroplastów w μ	
	ze światła	z cienia
<i>Adiantum cuneatum</i>	$3,06 \pm 0,26$	$5,81 \pm 0,47$
<i>Polypodium vulgare</i>	$3,43 \pm 0,35$	$6,76 \pm 0,50$
<i>Cedrus deodora</i>	$2,88 \pm 0,23$	$7,24 \pm 0,54$
<i>Lilium regale</i>	$2,91 \pm 0,19$	$6,22 \pm 0,37$
<i>Asparagus sprengeri</i>	$4,34 \pm 0,36$	$7,38 \pm 0,54$

T a b l i c a 2

Liczba gran w chloroplaście i średnia wielkość średnicy gran u *Antirrhinum majus* (2)

Warunki	Tkanka	Liczba gran	Średnica gran w μ
Liść normalnie oświetlony	Miękisz palisadowy	78,2	0,35
	Miękisz gąbczasty	41,3	0,62
Liść oświetlony od dołu	Miękisz palisadowy	około 45	0,59
	Miękisz gąbczasty	około 45	0,52

3. Ilość i wzajemne stosunki barwników

Adaptacja filogenetyczna. Przystosowanie poszczególnych gatunków roślinnych do określonego środowiska wyraża się nie tylko w ich strukturze anatomicznej, ale również w ilościach i wzajemnych stosunkach barwników fotosyntetycznych. Na ogół przyjmuje się, że ilość chlorofilów w liściach roślin ceniolubnych jest większa niż u gatunków światłolubnych (17, 66, 67, 109). Rozrzut wyników pomiarów jest jednak bardzo duży, a w dodatku trudno je porównywać, ponieważ warunki

ekologiczne modyfikują także wielkość liści i ich strukturę co zmienia podstawę obliczeń (świeża masa, sucha masa, powierzchnia liścia), do której odnosi się ilość chlorofilów. Tak na przykład Shirley (114) stwierdził, że pięciokrotnie zmniejszenie natężenia światła powoduje wzrost ilości chlorofilu w stosunku do świeżej masy, ale nie w stosunku do powierzchni liścia.

Znacznie wyraźniejsze różnice skorelowane z warunkami świetlnymi środowiska stwierdza się we wzajemnych stosunkach ilościowych poszczególnych barwników. Jako charakterystyczne wielkości określa się zwykle stosunek molarny chlorofilu *a* do chlorofilu *b* $\left(Q \frac{a}{b}\right)$ oraz stosunek molarny ksantofili do karotenoidów $\left(Q \frac{x}{c}\right)$. Mimo również dość znacznego rozrzutu wyników dla poszczególnych gatunków roślin średnie wartości obliczone dla gatunków rosnących w określonych środowiskach wykazują wyraźną kierunkową zmienność. W miarę zmniejszania natężenia oświetlenia powiększa się ilość chlorofilu *b* w stosunku do chlorofilu *a*, a maleje ilość karotenów w stosunku do ksantofili (106, 107, 108) (Tablica 3). Różnice są bardzo wyraźne i na ich podstawie Engle nazwał chlorofil *b* „typowym barwnikiem cienia”. Natomiast stosunek stężeń obu chlorofili do stężeń karotenoidów, wahający się w granicach od 2 do 4 nie wykazuje kierunkowej tendencji zmian zależnych od natężenia oświetlenia (107). Należy podkreślić, że zarówno chlorofil *b* jak i ksantofile są formami bardziej utlenionymi w stosunku do chlorofilu *a* i karotenów. Tak więc względne stężenie „utlenionych” barwników obniża się w roślinach przystosowanych do silnego światła (96).

Zależność składu barwników od warunków środowiskowych występuje znacznie wyraźniej u roślin niższych — przede wszystkim u morskich glonów. Na podstawie znanej strefowości występowania glonów (najbliżej powierzchni — zielone *Chlorophyceae*, najgłębiej — czerwone krasnorosty, a brązowe *Pheophyceae* w strefie pośredniej) Engleman wysunął (22, 23) przypuszczenie, że filogenetyczne przystosowanie ma w tym wypadku charakter dopełniającej adaptacji chromatycznej. Światło dzienne po przejściu na przykład przez 20 m warstwę wody jest prawie pozbawione promieni niebieskich i czerwonych, głównie absorbowanych przez chlorofile i karotenoidy. Adaptacja chromatyczna miałyby umożliwić pochłanianie światła zielonego, przenikającego najgłębiej, przy czym brunatny barwnik fukoksantyna, ma przynajmniej częściową zdolność pochłaniania tego światła, natomiast fikoerytryna krasnorostów absorbuje głównie w zakresie zielonym. Ilościowe badania barwników glonów (67, 68) wykazały, że dla gatunków krasnorostów występujących na różnych głębokościach, stosunek fikoerytryny do chlorofilów wzrasta wraz z głębokością. W długotrwałej dyskusji jaka wywiązała się nad

hipotezą uzupełniającej adaptacji chromatycznej (20, 35, 37, 75, 76, 87, 88) podniesiono przede wszystkim, że rolę czynnika kształtującego zestaw barwników może spełniać nie tylko barwa światła, ale również (a może wyłącznie) jego natężenie.

Tablica 3

Wpływ warunków świetlnych na skład barwników w liściach roślin zielonych

Rośliny	$Q \frac{a}{b}^*$	$Q \frac{x}{c}^{**}$	Literatura
Rośliny alpejskie	5,55	4,6	
Rośliny wodne wynurzone	4,40	4,0	
Rośliny lądowe miejsc słonecznych	4,36	3,6	
Rośliny z cienia (rozproszone światło nieba)	3,01	5,5	105, 109, 17
Rośliny z cienia (zielony cień)	2,60	5,3	
Rośliny wodne zanurzone	2,27	5,7	
Zielone glony (całe rośliny)	1,39	6,4	
<i>Sambucus nigra</i>			
ze światła	3,6	5,8	
z cienia	2,6	6,3	
<i>Fagus Silvatica</i>			105
ze światła	3,3	3,8	
z cienia	2,5	4,6	
<i>Phaseolus multiflorus</i>			
ze światła	4,5	4,7	
z cienia	3,3	5,2	
<i>Nymphae alba</i>			
miękkisz palisadowy	5,8	2,6	
miękkisz gąbczasty	3,4	3,6	112

* $Q \frac{a}{b}$ – stosunek chlorofilu *a* do chlorofilu *b*

** $Q \frac{x}{c}$ – stosunek ksantofili do karotenów

Adaptacja ontogenetyczna daje indywidualnym organizmom możliwość dostosowania się do warunków zewnętrznych w zakresie zmienności dopuszczonej przez determinację genetyczną kierującą syntezą barwników w określony dla danego gatunku sposób. U roślin wyższych, liście rozwijające się w cieniu wykazują więcej chlorofilu *b* w stosunku do *a* niż liście tej samej rośliny wyrosłe w pełnym słońcu (Tablica 3) (150, 105). Stosunek $Q \frac{a}{b}$ wydaje się być bardzo czułym wskaźnikiem stosunków świetlnych, gdyż, jak wykazali Seybold i Weissweiler (112), nawet w obrębie tego samego liścia górna, silniej oświetlona warstwa komórek asymilujących wykazuje mniej chlorofilu *b* w stosunku do *a*, w porównaniu z warstwami tkanki silniej zacienionymi (Tablica 3). Nale-

ży jednak podkreślić, że zmiana ilości i składu barwników liścia ma mniejszy wpływ na absorpcję światła, niżby to można przypuszczać na podstawie własności optycznych roztworów barwników (19). Rysunek 6a przedstawia absorpcję dwu liści buka (*Fagus sylvaticus*). Mimo, że liść ze światła zawiera 1,5 razy więcej chlorofilów w stosunku do liścia z cienia (6,5 i 4,3 mg na 100 cm²) i 1,8 razy więcej karotenoidów (1,78 i 0,98) oraz inny stosunek $Q \frac{a}{b}$ (4,4 i 3,7) to jednak różnice w absorpcji światła są znikome. Związane jest to z faktem, że liść jest tkanką złożoną, w której stosunki anatomiczne determinujące drogę światła mogą wywierać znaczny wpływ na absorpcję światła. Jak podkreśla Rabinowitch (97) również zmiana stosunku karotenów do ksantofili nie może mieć wyraźnego wpływu na absorpcję wobec zbliżonych własności spektralnych obu typów barwników.

Tablica 4
Zawartość chlorofilów u *Chlorella vulgaris* w % suchej masy

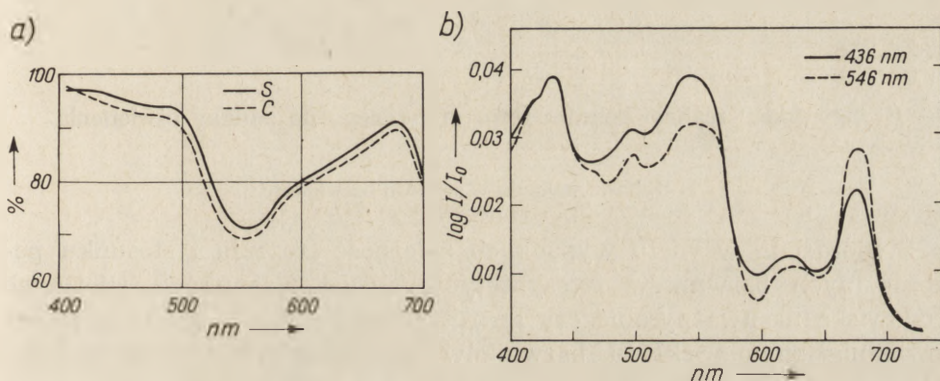
Warunki	% suchej masy	Literatura
Kultury z silnego światła	1,8	142
z słabego światła	4,0	
Kultury z silnego światła	2,7	
z słabego światła	4,9	84

Adaptacja ontogenetyczna u roślin wyższych wydaje się być uzależniona tylko od natężenia światła, a nie od jego barwy. Według Hagenana (33) młode rośliny owsa hodowane w świetle pięciu różnych zakresów spektralnych nie wykazały istotnych różnic we wzajemnym stosunku barwników. Natomiast Simonis (117) podaje, że u *Elodea* hodowanej w świetle czerwonym wzrasta stosunek chlorofilów do karotenoidów.

Wśród glonów adaptacja ontogenetyczna jest jeszcze wyraźniejsza. U *Chlorella* na przykład zawartość chlorofilu w stosunku do suchej masy zmienia się znacznie (Tablica 4).

U glonów niezielonych (krasnorosty, sinice) adaptacja może prowadzić do wręcz widocznej zmiany barwy. Okazy tego samego gatunku krasnorostu, rosnące na coraz większych głębokościach wykazują systematyczny wzrost zarówno ogólnej ilości barwników jak i stosunku fikocytryny do chlorofilów (67, 68). Krasnorosty znajdujące się przy po-

wierzchni są często zupełnie zielone (96). Znane są także fakty zmiany zabarwienia obserwowane w laboratoryjnych hodowlach glonów, np. u *Chaetoceras* z ciemnobrązowej (w świetle zielonym) do żółtej (w świetle czerwonym) (79) lub u sinic z niebieskiej (w świetle słabym) do żółtej (w pełnym świetle słonecznym) (83, 98). W dawniejszych badaniach czynnik natężenia światła często nie był dostatecznie kontrolowany. Harder (36) stwierdza, że dla uzyskania adaptacji chromatycznej definiowanej według Engelmana ma znaczenie nie tylko barwa ale i natężenie światła. Sargent (98) zaprzecza w ogóle wpływowi barwy światła; badany przez niego glon *Gleocapsa montana* staje się niebieski w słabym świetle, a żółto-zielony w silnym, niezależnie od barwy światła.



Rys. 6. a Absorpcja światła w liściach buka (*Fagus silvaticus*): S — wyrosłego w pełnym świetle słonecznym, C — wyrosłego w cieniu (111)

b. Absorpcja światła w wodnej zawieszynie komórek krasnorostu *Porphyridium cruentum* wyhodowanego w świetle monochromatycznym zielonym i niebieskim o tym samym natężeniu (12)

Nowsze badania (12) polegające na hodowli krasnorostu *Porphyridium cruentum* w świetle monochromatycznym wykazały, że przy zastosowaniu światła niebieskiego i zielonego o tej samej energii skład barwników glonu jest jednak różny (rysunek 6), ale stwierdzone zmiany idą w kierunku przewidzianym przez teorię uzupełniającą adaptacji chromatycznej tylko przy niskich natężeniach światła, przy wyższych zaś wykazują tendencje odwrotne (Tablica 5). Według Brody'ego i Emerssona (12) reakcja taka ma sens zachowawczy ponieważ przy niskich natężeniach chodzi o maksymalne wykorzystanie energii światła, a przy wysokich o korzystne w tych warunkach dla fotosyntezy zmniejszenie energii absorbowanej w barwnikach.

Tablica 5

Stosunek fikoerytryn do chlorofilu u *Porphyridum cruentum*
(mierzony jako $R = \text{absorpcja przy } 545 \text{ nm} / \text{absorpcja przy } 680 \text{ nm}$)
(12)

Energia $\text{erg/cm}^2\text{s} \times 10^4$	R dla glonów hodowanych w świetle o długości fali	
	436 nm	546 nm
18,3	2,23	
6,16	1,80	
0,48	1,20	
0,0096	0,71	
2,49		1,24
0,19		1,40
0,0076		1,50

III. „Szybkie“ reakcje aparatu fotosyntetycznego na zmiany oświetlenia

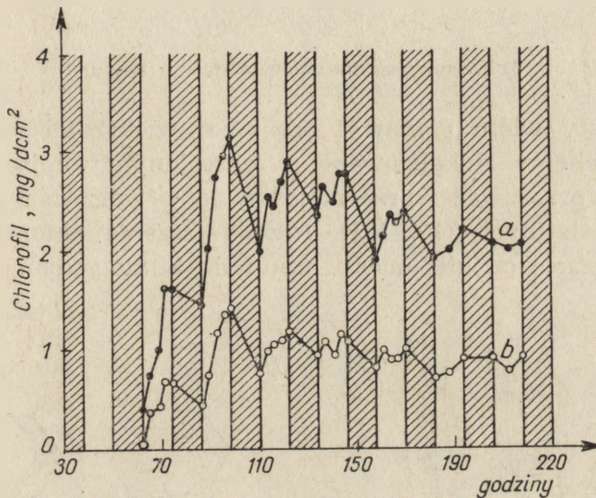
1. Dobowe wahania w stężeniu barwników

Stwierdzona w wielu wypadkach zależność stężenia i stosunku poszczególnych barwników fotosyntetycznych od warunków świetlnych środowiska nasuwa pytanie czy aparat fotosyntetyczny nie reaguje odpowiednią zmianą składu barwników na naturalne dobowe zmiany, w natężeniu oświetlenia. Możliwość taka nie jest *a priori* wykluczona, gdyż ostateczny poziom barwników w dojrzałym rozwiniętym liściu jest, jak wykazały badania izotopowe, wynikiem równowagi między stałym tworzeniem się i rozpadem chlorofilów (30, 115, 121), może więc podlegać wpływom czynników zewnętrznych, o ile działają one w niejednakowy sposób na szybkość rozpadu i syntezy.

Zagadnienie istnienia dziennych wahań w stężeniu chlorofilów w liściach było tematem licznych i kontrowersyjnych prac. Wielu autorów wykrywało, często bardzo istotne zmiany ilości barwników fotosyntetycznych w rytmie dobowym (13, 14, 15, 48, 131, 143, 144), inni stwierdzali stały poziom barwników chlorofilowych niezależnie od pory dnia, w której pobierano próbki (18, 102, 103, 111, 112, 147, 151). W wyniku krytycznych badań nad tym zagadnieniem (5, 110, 147, 148) należy przyjąć, że ilość chlorofilów w dojrzałych, wyrosniętych liściach jest stała w ciągu doby. Stwierdzone zaś wahania dzienne były związane z błędami metodycznymi dotyczącymi zarówno ekstrakcji i oznaczania ilościowego barwników, jak i nie uwzględniania dziennych zmian, jakim podlega podstawa odniesienia obliczeń na przykład utrata wody z liści przy stałej ilości chlorofilu może być powodem pozornego wzrostu jego „stężenia” na jednostkę świeżej masy lub wreszcie związane z faktem,

że pomiary wykonywano na liściach jeszcze rosnących. Należy zatem wnosić, że jeśli nawet zmieniające się okresowo warunki świetlne wpływają na szybkość syntezy i rozpadu chlorofilów w wyrośniętym liściu, to wynikające stąd zmiany stężenia barwników są zbyt małe, aby można je było uchwycić przy pomocy stosowanych dziś metod.

Inaczej przedstawia się sprawa dziennych wahań ilości chlorofilów w liściach jeszcze rosnących. W tym wypadku stwierdzono istotne zmiany zarówno w ilości jak i w stosunku poszczególnych barwników skorelowane z okresem oświetlenia i ciemności (5, 73, 118, 148) (rysunek 7).



Rys. 7. Zmiany w stężeniu chlorofilów *a* i *b* w liściu fasoli rosnącym w rytmie 12 godz. światła i 12 godz. ciemności (148)

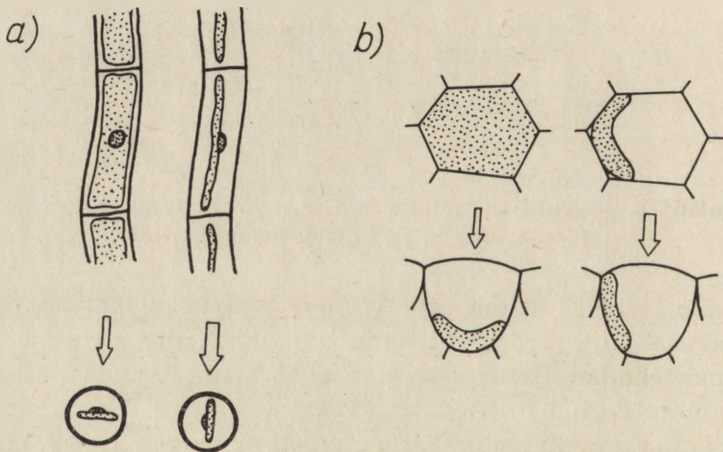
Zjawisko to należy tłumaczyć różnym wpływem jaki wywiera światło na poszczególne procesy istotne dla określenia stężenia chlorofilu (wzrost powierzchni liścia, wzrost suchej masy, wzrost świeżej masy, synteza chlorofilu *a* i *b*). Regułą jest przy tym, że stężenie barwników w odniesieniu do powierzchni liścia wzrasta w okresie oświetlenia, a spada w okresie ciemności. Zjawisko to można częściowo wytłumaczyć tym, że światło działa hamująco na wzrost powierzchni, pobudzając równocześnie syntezę chlorofilów. W ciemności następuje niejako „rozcieńczenie” barwników. Jednakże zmianom ilościowym towarzyszy także wahanie stosunku chlorofilu *a* do *b* (5, 73, 106, 148) co wskazuje, że niezależnie od efektu rozcieńczania szybkość syntezy barwników w okresach światła i ciemności jest różna dla chlorofilów *a* i *b*.

Głony odznaczają się znacznie większą labilnością składu barwników niż rośliny wyższe. Wielokrotnie obserwowano wyraźne zmiany ich zabarwienia zachodzące w czasie rzędu kilku godzin. Szczególnie niektóre sinice mogą jak kameleon zmieniać swe zabarwienie w zależności od

barwy i natężenia padającego na nie światła (29). Przyczyną tych zmian może być zarówno zjawisko adaptacji ontogenetycznej, która wobec szybkiego wzrostu tych organizmów ujawnia się w o wiele krótszym czasie niż u roślin wyższych, jak i destrukcyjny, nieodwracalny wpływ światła na niektóre barwniki fotosyntetyczne uwydatniający się szczególnie przy działaniu silnego światła na organizmy zaadaptowane do warunków cienistych (patrz niżej). Odpowiedź na pytanie jaki udział w rzeczonych zjawiskach mają odwracalne dobowe wahania może dostarczyć tylko badanie zmian składu barwnikowego glonów w naturalnym dla nich i powtarzalnym rytmie światła i ciemności.

2. Przemieszczenia chloroplastów w komórce

Chloroplasty wielu glonów i ogromnej większości roślin wyższych nie są nieruchomo zlokalizowane w określonym miejscu w komórce, ale mogą się przesuwać i przegrupowywać w zależności od aktualnych warunków świetlnych (40, 101). Przemieszczenia chloroplastów odbywają się w czasie od kilkunastu minut do kilku godzin, a więc należą

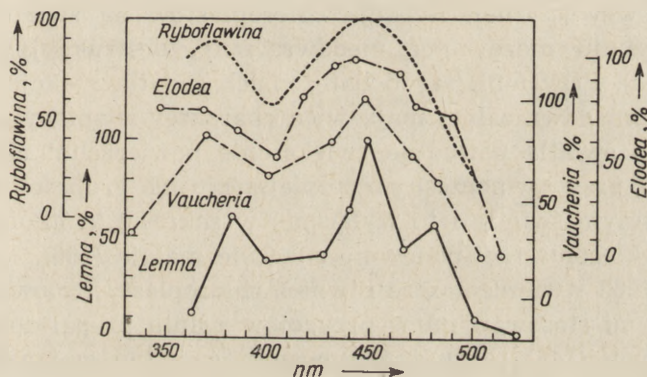


Rys. 8. Układ chloroplastów w komórce w świetle słabym i świetle silnym: a — komórki nitkowatego glonu *Mougeotia*, b — komórki liścia widliczki (*Selaginella Martensii* (42, 101)

do typowych „szybkich” procesów adaptacyjnych. Sposób zmiany położenia zależy od budowy chloroplastu i stosunków przestrzennych panujących w komórce, ale wspólną cechą ruchów jest zmniejszanie się powierzchni chloroplastów w świetle silnym i maksymalne jej zwiększenie w świetle słabym (rysunek 8). Tego rodzaju przegrupowanie musi prowadzić do zmian ilości energii świetlnej absorbowanej w komórce (157). Pomiary absorpcji światła w liściu, w którym chloroplasty ustawione

są raz w pozycji typowej dla światła słabego, a raz w pozycji typowej dla światła silnego wykazują, że zmiany absorpcji nie są jednak zbyt wielkie i wynoszą na przykład dla liścia *Begonia multiflora* 3—5%, dla *Tradescantia viridis* 6—12%, dla *Lemna trisulca* 3—12% (99, 104, 162).

Przy słabym oświetleniu zmiana położenia chloroplastów pozwala wykorzystać możliwie maksymalnie energię światła co znacznie zwiększa fotosyntezę, natomiast przy silnym oświetleniu przesunięcie się chloroplastów do pozycji typowej dla światła silnego z reguły nie wpływa na fotosyntezę, ponieważ natężenia światła, które wywołują te ruchy przekraczają punkt wysycenia fotosyntezy (158, 159). Zmniejszenie absorpcji w silnym oświetleniu może mieć jednak pewne znaczenie ochronne przed destrukcyjnym działaniem światła o dużym natężeniu. Zakres natężenia światła, w którym chloroplasty utrzymują pozycje typowe dla światła słabego jest różny dla różnych gatunków roślin, zwłaszcza dla roślin ceniolubnych i światłolubnych, a nawet w obrębie tego samego gatunku mogą wystąpić znaczne przesunięcia tego zakresu na drodze adaptacji ontogenetycznej (4).



Rys. 9. Widma działania w fototaksji chloroplastów w komórkach *Lemna*, *Vaucheria*, widmo fotodinezy *Elodea* i absorpcja ryboflawiny (27, 43, 100, 164)

Mechanizm przemieszczeń nie jest jeszcze w pełni poznany (165). Widmo działania w wywoływaniu pozycji chloroplastów typowej dla światła silnego i światła słabego wskazuje na aktywność promieniowania krótkofalowego i bliskiego ultrafioletu (rysunek 9) (27, 69, 164), a jego kształt sugeruje udział barwników flawinowych w przegrupowywaniu się chloroplastów. Ponieważ podobne jest widmo działania światła w zakotwiczeniu chloroplastów przy zewnętrznej żelowej warstwie ektoplazmy (134, 135) przypuszcza się, że pierwotną reakcją świetlną jest wpływ na stopień zakotwiczenia (rozluźnienie w świetle silnym), a następnie chloroplasty są biernie przesuwane przez protoplazmę aż do miejsca gdzie znajdą optymalne warunki świetlne i gdzie nastąpi ponowne ich zakotwiczenie (27, 161, 164). Promieniowanie długofalowe nie wpływa na układ

chloroplastów, przyspiesza natomiast ich przemieszczanie (164). Wydaje się, że promieniowanie to działa w procesie fotofosforylacji, w którym powstaje ATP. Dyfundując do cytoplazmy ATP może stymulować szybkość jej ruchów. Przypuszczenie to opiera się zarówno na widmie działania światła długofalowego (164, 167) jak i na wpływie inhibitorów fotofosforylacji znoszących przyspieszające działanie czerwieni (169, 170), jak też na stwierdzeniu, że ATP powstający w fotofosforylacji przenika z chloroplastów do cytoplazmy komórki po jej oświetleniu (97).

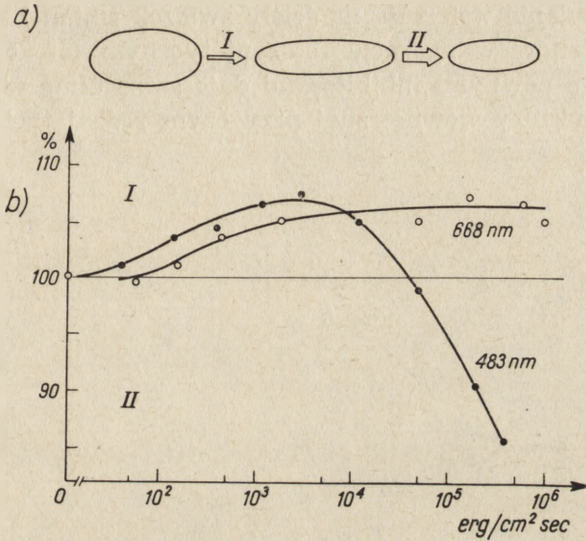
Jedynym stwierdzonym dotąd wyjątkiem o odmiennym widmie działania światła w przemieszczeniach chloroplastów są dwa gatunki glonów: *Mougeotia* i *Mesotaenium*, u których układ chloroplastów jest kontrolowany przez barwniki fitochromowe (41, 44).

3. Zmiany kształtu i struktury chloroplastów

Zmiana natężenia oświetlenia wywołuje nie tylko przesunięcia chloroplastów w obrębie komórki, ale również zmiany ich kształtu, objętości i struktury wewnętrznej. Reakcja chloroplastów na światło o bardzo dużym natężeniu może mieć nieodwracalny, destrukcyjny charakter (rozdział IV.3). Przy mniejszych natężeniach światła reakcje chloroplastów są w pełni odwracalne, mają więc charakter adaptacyjny. Osłabienie natężenia światła powoduje zwiększenie powierzchni chloroplastów (93, 101, 166), przy równoczesnym zmniejszeniu ich grubości (50, 63). Natomiast w silnym świetle i to wyłącznie w zakresie krótkofalowym powierzchnia chloroplastów ponownie znacznie maleje (166).

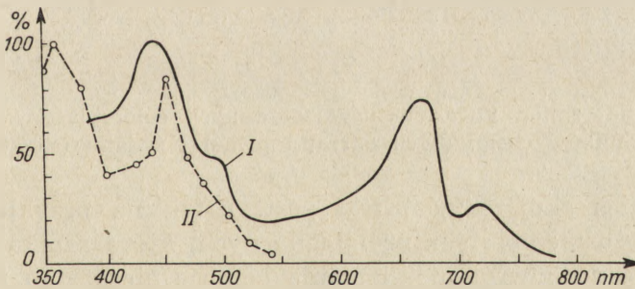
W roku 1962 stwierdzono, że również chloroplasty izolowane normalnymi metodami stosowanymi w przygotowywaniu preparatów do badań biochemicznych (146) reagują na warunki świetlne zmianami kształtu i struktury (52, 89, 90). Odkrycie to było punktem zwrotnym w badaniach nad wpływem światła na zmiany kształtu, gdyż pozwoliło śledzić te zjawiska prostymi metodami, dającymi przy tym dokładniejsze wyniki niż metody cytologiczne. Do badania zmian kształtu izolowanych chloroplastów stosuje się pomiary: stopnia rozproszenia światła w zawieszynie (16, 52, 54, 89, 90), zbitej masy po odwirowaniu (6, 54), lub objętości (za pomocą licznika Coultera) (52), a także badania w mikroskopie elektronowym (53, 55). W licznych pracach, które opublikowano w ciągu ostatnich 3 lat, wykazano, że reakcje fotostrukturalne izolowanych chloroplastów są zjawiskiem powszechnym, występującym nie tylko w chloroplastach szpinaku, najczęściej stosowanych jako obiekt badań, ale także w chloroplastach mchów (71), glonów (6), a nawet w systemach lamelli izolowanych z bakterii purpurowych (91). Zmiany strukturalne chloroplastu wywołane światłem przedstawia schematycznie rysunek 10a. Reakcja I powodująca rozplaszczanie chloroplastu w stosunku do

stanu jaki miał miejsce w ciemności wywoływana jest słabym oświetleniem rzędu kilkuset $\text{erg/cm}^2\text{s}$. Rozpłaszczenie to wiąże się ze wzrostem powierzchni o 5—15% przy równoczesnym zmniejszeniu objętości o 20—50% (6, 52). W wywoływaniu tej reakcji czynne jest światło całego zakresu widzialnego, przy czym maksymalną aktywność wykazuje pro-



Rys. 10.a. Schemat zmian kształtu chloroplastu pod wpływem oświetlenia.

b. Zależność powierzchni chloroplastu mchu *Mnium undulatum* od natężenia promieniowania dla dwu długości fali (171)

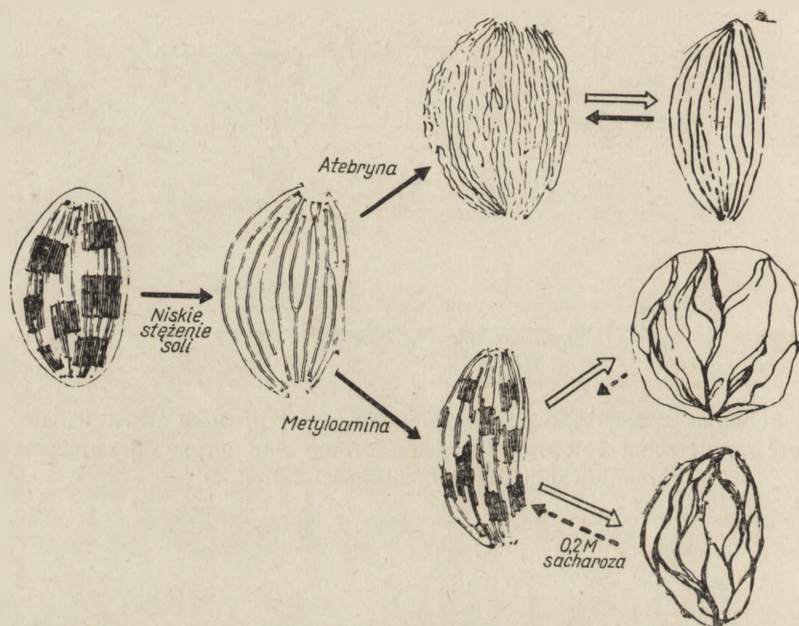


Rys. 11. Widmo działania ekspansji chloroplastów szpinaku (reakcja I, rysunek 12) i w kontrakcji chloroplastów mchu *Mnium* (reakcja II). Za 100% skali przyjęto efekt maksymalny (53, 171)

mieniowanie o długości fali 435 i 680 nm (rysunek 11) (53). Kształt widma działania sugeruje pośrednictwo barwników fotosyntetycznych. Reakcja I jest hamowana w obecności inhibitorów fotofosforylacji jak jony NH_4^+ , α -fenantrolina, hydroksylamina, DCMU, CCP (6, 52, 90, 171) natomiast jest niewrażliwa na cyjanki (52). W silnym świetle krótkofalowym

(średnio powyżej $10\,000\text{ erg/cm}^2\text{s}$) występuje reakcja II powodująca zmniejszanie powierzchni chloroplastu (171). Reakcja ta jest niewrażliwa na inhibitory fotofosforylacji, natomiast można ją zablokować działaniem jodku potasu. Widmo działania światła mieści się w granicach 350—500 nm i wykazuje maksimum przy 450 i 360—380 nm, co może wskazywać na udział barwników flawinowych (rysunek 11).

Ostatnie badania wskazują na ścisły związek zmian kształtu z transportem elektronów w aparacie fotosyntetycznym (54, 55). Zaburzenie tego transportu pewnymi inhibitorami daje szczególnie wyraźne zmiany objętości i struktury wewnętrznej przy czym rodzaj tych zmian zależy



Rys. 12. Schemat zmian ultrastruktury izolowanych chloroplastów szpinaku pod działaniem czynników chemicznych (strzałki pełne) i światła (strzałki puste) (55)

od substancji rozkojarzającej transport. I tak na przykład atebryna powoduje rozluźnienie struktur lamellarnych, które zanika pod działaniem światła, na odwrót metyloamina hamuje nieco stan napęcznienia lamelli, ale pod wpływem światła stopień rozsunięcia lamelli znacznie się powiększa i to z reguły nieodwracalnie (rysunek 12). Największe zmiany objętości stwierdzono przy braku zewnętrznych akceptorów elektronów.

Mechanizm powstawania zmian fotostrukturalnych nie jest jasny. Zarówno uzyskane elektronogramy (55) jak i fakt, że zmiany strukturalne zachodzą w nieobłonionych systemach lamellarnych, a nawet fragmentach tych systemów (55, 91), wskazywałyby na rolę sił oddziaływania wzajemnego poszczególnych lamelli w tych procesach. Związek

między reakcjami fotostrukturalnymi, a fotofosforylacją jak również fakt, że podobne zmiany strukturalne jak pod wpływem światła udaje się uzyskać działaniem ATP (52, 90), sugerowałyby rolę fotofosforylacji w mechanizmie kontrakcji lamelli. Wyizolowanie przez Ohnishi (86) białek kurczliwych z chloroplastów przemawia na korzyść tej hipotezy. Z drugiej strony nie można wykluczyć znaczenia ATP lub jego prekursorów dla działania pompy osmotycznej zarówno w zewnętrznej błonie chloroplastu, jak i błonach tylakoidów. Zaburzenie procesów osmotycznych prowadziłoby do zmian w pobieraniu wody i jonów, a co za tym idzie i rozsuwania lamelli. Nie można wreszcie wykluczyć, że transport elektronów, związany z transportem jonów zmienia środowisko jonowe wokół błon, co z kolei wpływa na ich wzajemne przyciąganie (55).

IV. Destrukcyjne działanie światła na aparat fotosyntetyczny

1. Inaktywacja fotosyntezy

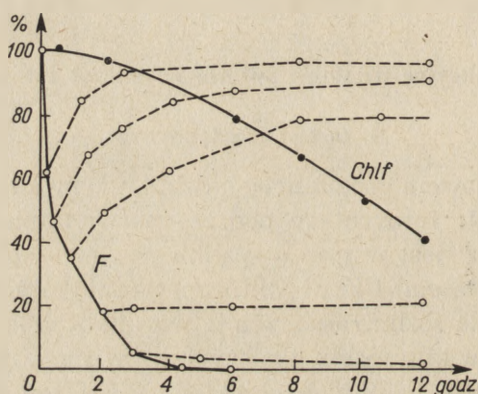
Pierwszym objawem szkodliwego działania światła o dużym natężeniu jest obniżenie fotosyntezy podczas naświetlania. Pojęcie „światło o dużym natężeniu” jest w tym wypadku względne, gdyż wrażliwość na światło jest rezultatem filo- i ontogenetycznej adaptacji i wykazuje znaczne różnice. Dla roślin rosnących w warunkach skrajnego zacielenia światło o natężeniu kilkunastu tysięcy luksów może już hamować fotosyntezę, podczas gdy w innych obiektach efekt ten występuje dopiero przy natężeniach przekraczających 100 000 luksów (38, 39, 74, 76, 128, 130). Z badań nad fotoinaktywacją wynika, że aby światło mogło wywołać obniżenie fotosyntezy jego natężenie musi przekroczyć pewną wartość graniczną. Stopień zahamowania fotosyntezy zależy od czasu naświetlania i zwiększa się bardzo szybko ze wzrostem natężenia światła (82, 160). W krańcowym wypadku może dojść do zupełnego zahamowania fotosyntezy, a wówczas zużywanie tlenu jest równe (160) lub większe (82) niż przy normalnym oddychaniu mimo równoczesnego oświetlenia obiektu silnym światłem. O ile inaktywacja fotosyntezy nie jest zbyt daleko posunięta, jest ona całkowicie lub przynajmniej częściowo odwracalna po wyłączeniu działania silnego światła (rysunek 13) (76, 77, 127).

Jak wykazał Steemann-Nielsen (128) światło o wysokich natężeniach, ale leżących poniżej wspomnianej granicy, a więc nie wywołujące osłabienia fotosyntezy w czasie naświetlań, może również wywierać pewien wpływ destrukcyjny, objawiający się tym, że po powrocie do światła o małym natężeniu fotosynteza jest mniej intensywna niżby należało oczekiwać i dopiero stopniowo (w ciągu kilku godzin) wraca do poziomu charakterystycznego dla światła o danym natężeniu.

Mechanizm fotoinaktywacji nie jest znany. Czynne w tym zjawisku jest promieniowanie całego zakresu widzialnego, ale aktywność promie-

niowania krótkofalowego jest znacznie większa niż światła czerwonego (58). Interpretacja badań nad kinetyką inaktywacji fotosyntezy wykonanych przy zastosowaniu błysków światła (58, 59) wskazuje, że inaktywacja świetlna aparatu fotosyntetycznego polega na fotooksydacji jednego z enzymów biorących udział w fotosyntezie.

Wydaje się, że trwała inaktywacja fotosyntezy ma pewne znaczenie dla roślin rosnących w warunkach naturalnych. Powoduje ona nie tylko skrócenie okresu aktywności poszczególnych liści, ale wpływa również na rozmieszczenie aktywności fotosyntetycznej w obrębie tkanek liścia (125, 126). Jak wykazał Starzeczki (125) w młodym liściu największą sprawność fotosyntetyczną ma miękisz palisadowy, natomiast w liściach,



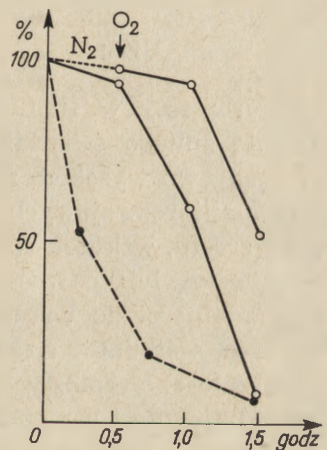
Rys. 13. Inaktywacja fotosyntezy i rozkład chlorofilu w liściach *Lemna trisulca* poddanych działaniu światła o intensywności 100 000 luksów. Linie przerywane oznaczają zmiany aktywności aparatu fotosyntetycznego po przerwaniu naświetlania (160)

które przez dłuższy czas były wystawione na działanie pełnego światła słonecznego bardziej sprawne wykorzystanie światła odbywa się w miękiszu gąbczastym, prawdopodobnie na skutek inaktywacji chloroplastów w najsilniej naświetlanych komórkach miękiszu palisadowego. Na podstawie tych wyników można wysunąć przypuszczenie, że silny rozwój miękiszu palisadowego u roślin światłolubnych związany jest nie tyle z rozbudową czynnego aparatu fotosyntetycznego, ile z wytworzeniem filtra ochronnego. Tkanka ta, choć z biegiem czasu traci zdolność do fotosyntezy, pochłania jednak nadal światło osłabiając natężenie promieniowania docierającego do głębiej leżących tkanek liścia.

2. Rozkład barwników fotosyntetycznych

Barwniki fotosyntetyczne w żywej komórce są znacznie bardziej odporne na działanie światła niż w stanie roztworu — prawdopodobnie dzięki powiązaniu z białkiem i lipidami w strukturach chloroplastu.

Jednakże również w żywej komórce może zachodzić w silnym świetle proces ich rozkładu, co w krańcowym wypadku prowadzić może do zupełnego wyblaknięcia zielonych tkanek (77, 80). Z uwagi na podatność barwników *in vivo* na fotodestrukcyjną, można wyróżnić wśród roślin szereg grup od bardzo wrażliwych do bardzo odpornych (78). Rozkład barwników pod wpływem silnego oświetlenia zachodzi wyłącznie w obecności tlenu, polega więc na fotooksydacji (119), a rozpoczyna się z reguły dopiero wówczas, gdy fotosynteza została już całkowicie lub w znacznej mierze zahamowana (21, 79, 160) (rysunek 13). W trakcie rozkładu barwników zmienia się ich wzajemny stosunek co świadczy, że nie wszystkie są jednakowo podatne na fotooksydację. Tak na przykład u *Chlorella* normalny stosunek chlorofilu *a* do *b* równy 2,85 spada w czasie ubytku barwników do 0,94, co wskazuje na szybszy rozkład chlorofilu *a* (119). Z pośród karotenoidów karoteny są znacznie bardziej podatne na fotooksydację niż ksantofile (33, 119).



Rys. 14. Rozkład chlorofilu w komórkach glonu *Chlorella*, poddanych naświetlaniu światłem o natężeniu 100 000 luksów. Linia przerywana — komórki zabite wysoką temperaturą, linia ciągła — komórki żywe (119)

Światło całego zakresu widma widzialnego zdolne jest do wywołania fotooksydacyjnego rozkładu barwników (33, 168), przy czym aktywność światła poszczególnych zakresów spektralnych jest proporcjonalna do ilości energii pochłanianej przez barwniki fotosyntetyczne. Natomiast promieniowania UV w zakresie 240—310 nm nie wywołuje rozkładu barwników nawet po śmierci komórki (3, 168).

W przebiegu rozkładu barwników można wyróżnić fazę wstępną (fazę indukcji), podczas której silne światło nie wywołuje zmian w stężeniu barwników i fazę właściwej fotooksydacji prowadzącą do szybkiego ich zaniku (119, 168) (rysunek 14).

Zabicie komórki wiąże się z zupełnym zanikiem fazy indukcji — rozkład barwników rozpoczyna się od razu po rozpoczęciu ekspozycji (rysunek 14). W komórce naświetlanej w warunkach beztlennych faza

indukcji rozpoczyna się dopiero po doprowadzeniu tlenu, mimo że silne światło już poprzednio działało. Faza wstępna jest odwracalna — jeżeli komórki pod koniec fazy wstępnej umieścić na pewien czas w ciemności, ponowne naświetlenie rozpoczyna nową fazę indukcji (119). Dane te wskazują, że w żywej komórce istnieją mechanizmy ochronne przed destrukcyjnym działaniem światła o wysokich natężeniach. Procesy fotooksydacyjne rozpoczynają się gdy mechanizmy ochronne zawodzą. Pozostaje kwestią otwartą, czy rolę ochronną spełniają jakieś procesy metaboliczne ulegające zahamowaniu w fazie indukcji (119), czy w fazie tej następuje rozkład struktury białko-barwniki. Wzrost labilności barwników w komórkach poddanych głodowi azotowemu (1) mógłby świadczyć na korzyść tego drugiego przypuszczenia. Również badania nad rozkładem pod wpływem światła barwników wyizolowanych w formie kompleksu z białkiem (chloroplastyna) wskazują na to, że połączenie z białkiem chroni barwniki przed szybkim rozkładem, którego wystąpienie uzależnione jest od denaturacji komponenty białkowej (154).

3. Zmiany morfologiczne podczas fotorozkładu barwników

Chloroplasty w stadium rozwoju są bardzo podatne na szkodliwe działanie silnego światła. W okresie tym nawet zastosowanie światła o niekrajcowo wysokich natężeniach (rzędu 10—20 klx) może prowadzić do anomalii rozwojowych objawiających się między innymi zatrzymaniem wzrostu, wskutek czego powstają bardzo małe (średnicy około 2 μ) chloroplasty, lub odwrotnie — zahamowaniem podziałów przy zachowaniu zdolności do wzrostu, w rezultacie czego powstają chloroplasty olbrzymie, o średnicy sięgającej do 20 μ i więcej (26).

Dojrzałe chloroplasty są znacznie bardziej odporne na działanie silnego światła, ale i u nich natężenie oświetlenia wywołujące inaktywację fotosyntezy i rozkład chlorofilu powodują charakterystyczne zmiany w ułożeniu, wymiarach i wyglądzie chloroplastów. Zmiany te są z reguły nieodwracalne. Ich obraz mikroskopowy może być bardzo różny w zależności od gatunku rośliny.

Światło o dużym natężeniu może prowadzić do całkowitego lub częściowego zablokowania przesunięć chloroplastów (95, 166) lub też powodować, że chloroplasty zamiast lokalizować się w miejscach typowych dla układu światła silnego grupują się w nieregularne skupienia (101, 160). Chloroplasty znajdujące się w centrum skupień najpóźniej ulegają odbarwieniu. U niektórych gatunków chloroplasty skleją się podczas bardzo silnego naświetlania przyjmując nieregularne kształty połączone mostkami (9, 80).

Rozkład barwników obserwuje się pod mikroskopem jako wyblaknięcie chloroplastów przechodzące stopniowo w zupełne odbarwienie; niekiedy jednak chloroplasty w stadium odbarwiania stają się żółte

z uwagi na wolniej przebiegający rozkład barwników karotenoidowych (80). Wszystkie te objawy mają charakter wybitnie lokalny i ograniczone są tylko do tych komórek, które były poddane działaniu silnego światła. Nawet w obrębie jednej komórki ulegają uszkodzeniu tylko te chloroplasty, które były bezpośrednio naświetlane (95).

Opisany powyżej obraz zmian morfologicznych chloroplastów występuje przy naświetlaniu widzialnym zakresem widma. Promieniowanie ultrafioletowe szczególnie krótkofalowe (230—310 nm) wywołuje zupełnie inny obraz (8, 166). Jakkolwiek działanie ultrafioletu nie wchodzi w zakres tego artykułu, warto podkreślić brak ścisłego związku między odpornością na UV, a warunkami siedliskowymi roślin. O ile odporność na silne promieniowanie widzialne jest z reguły tym większa im silniejsze oświetlenie panuje w środowisku, w którym dane gatunki rosną, o tyle w stosunku do ultrafioletu nie ma takiej zależności i często gatunki cieniulubne wykazują bardzo silną, a gatunki światłolubne znikomą odporność (7, 8).

LITERATURA

1. Aach H. G., *Arch. Mikrobiol.* **19**, 166 (1953).
2. Abel B., *Naturwiss.* **43**, 136 (1956).
3. Arnold W., *J. Gen. Physiol.* **17**, 135 (1934).
4. Babuskin L. M., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **102**, 1215 (1955).
5. Bauer A., *Planta* **51**, 84 (1958).
6. Belsky M. M., Siegenthaler P. A., Packer L., *Plant Physiol.* **40**, 290 (1965).
7. Biebl R., *Protoplasma* **41**, 353 (1952).
8. Biebl R., *Marine Biol. Assoc. U. K.* **31**, 307 (1952).
9. Biebl R., *Öster. Bot. Z.* **101**, 502 (1954).
10. Bjorkman O., Holmgren P., *Physiol. Plantarum* **16**, 889 (1963).
11. Blaauw-Jansen G., Kamen J. G., Thomas J. B., *Biochim. Biophys. Acta* **5**, 179 (1950).
12. Brody M., Emerson R., *Am. J. Botany* **46**, 433 (1959).
13. Bukatsch F., *Z. Ges. Naturwiss.* **5**, 263 (1939).
14. Bukatsch F., *Z. Ges. Naturwiss.* **6**, 197 (1940).
15. Bukatsch F., *Z. Ges. Naturwiss.* **8**, 79 (1942).
16. Dilley R. A., Vernon L. P., *Biochemistry* **3**, 817 (1964).
17. Egle K., *Planta* **26**, 546 (1937).
18. Egle K., *Bot. Archiv.* **45**, 93 (1944).
19. Egle K., w *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, tom V/1 red. W. Ruhland, Berlin 1960, str. 444.
20. Ehrke G., *Planta* **17**, 650 (1932).
21. Emerson R., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **3**, 128 (1935).
22. Engelmann T. W., *Botan. Ztg.* **41**, 1, 17 (1883).
23. Engelmann T. W., *Botan. Ztg.* **42**, 82 (1884).
24. Engelmann T. W., Gaidukov N. I., *Arch. Anat. Physiol.* 333 (1902).
25. Erikson G., Kahn A., Waller B., Wettstein D. von, *Ber. dtsh. Bot. Ges.* **74**, 221 (1961).

26. Fasse-Franciskett U., *Protoplasma* **45**, 194 (1955).
27. Fischer-Arnold G., *Protoplasma* **56**, 495 (1963).
28. Fischer H., Oesterreicher A., *Z. Physiol. Chem.* **262**, 243 (1940).
29. Gaidukov N. I., *Ber. dtsh. Bot. Ges.* **24**, 1 (1906).
30. Godnev I. N., Shlyk A. A., *Intern. Congr. on the Peaceful Uses of Atomic Energy* **12**, 358 (1955).
31. Grave G., *Protoplasma* **44**, 273 (1955).
32. Haberlandt G., *Jb. Wiss. Bot.* **13**, 84 (1882).
33. Hager A., *Planta* **49**, 524 (1957).
34. Hansen H. C., *Physiol. Plantarum* **12**, 545 (1959).
35. Harder R., *Z. Bot.* **9**, 224 (1917).
36. Harder R., *Ber. dtsh. Bot. Ges.* **40**, 26 (1922).
37. Harder R., *Z. Bot.* **15**, 305 (1923).
38. Harder R., *Planta* **11**, 263 (1930).
39. Harder R., *Planta* **20**, 699 (1933).
40. Haupt W., w *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, tom XVII/1, red. W. Ruhland, Berlin 159, str. 278.
41. Haupt W., *Planta* **53**, 484 (1959).
42. Haupt W., *Ber. dtsh. Bot. Ges.* **76**, 313 (1963).
43. Haupt W., Schonfeld I., *Ber. dtsh. Bot. Ges.* **75**, 14 (1962).
44. Haupt W., Thiele R., *Planta* **56**, 388 (1961).
45. Heitz E., *Planta* **26**, 134 (1936).
46. Heitz E., *Exptl. Cell. Res.* **7**, 606 (1954).
47. Henningsen K. W., w *Currents in Photosynthesis* red. J. B. Thomas J. C. Goedheer, Rotterdam 1966, str. 441.
48. Henrici M., *Rep. Dir. Veterin. Educat. and Res. Pretoria* **1**, 227 (1926).
49. Hesselmann H., *Beih. Bot. Zbl.* **17**, 311 (1904).
50. Hilgenheger H., Menke W., *Z. Naturforsch.* **20b**, 699 (1965).
51. Irmak L. R., *Rev. de la Fac. des Sc. l'Univ. Istanbul B* **22**, 191 (1957).
52. Itoh M., Izawa S., Shibata K., *Biochim. Biophys. Acta* **66**, 319 (1963).
53. Izawa S., Itoh M., Shibata K., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 349 (1963).
54. Izawa S., Good N. E., *Plant Physiol.* **41**, 533 (1966).
55. Izawa S., Good N. E., *Plant Physiol.* **41**, 544 (1954).
56. Kaja H., *Ber. dtsh. Bot. Ges.* **67**, 93 (1954).
57. Kandler O., Sironval S., *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 207 (1959).
58. Kok B., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 245 (1956).
59. Kok B., Businger J. A., *Nature* **177**, 135 (1956).
60. Koski V. M., Ph. Dr Thesis, Univ. Minnesota (1949).
61. Koski V. M., French C. S., Smith J. H. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **31**, 1 (1951).
62. Koski V. M., Smith J. H. C., *Carnegie Inst. Wash. Year Book* **48**, 90 (1948).
63. Kushida H., Itoh M., Izawa S., Shibata K., *Biochim. Biophys. Acta* **79**, 201 (1964).
64. Leyon H., *Exptl. Cell Res.* **7**, 609 (1954).
65. Lubimenko V. N., *Rev. Gen. Bot.* **17**, 391 (1905).
66. Lubimenko V. N., *Rev. Gen. Bot.* **20**, 162 (1908).
67. Lubimenko V. N., *Bull. Inst. sci. Lesshaft* **12**, 5 (1926).
68. Lubimenko V. N., *Rev. Gen. Bot.* **40**, 23 (1928).
69. Mayer F., *Z. f. Bot.* **52**, 346 (1964).
70. Menke W., *Z. Naturforsch.* **17b**, 188 (1962).
71. Menke W., *Z. Naturforsch.* **18b**, 821 (1963).
72. Mitrakos K., *Planta* **52**, 583 (1959).
73. Mitrakos K., *Physiol. Plantarum* **14**, 497 (1961).

74. Montfort C., *Jb. Wiss. Bot.* **72**, 776 (1930).
75. Montfort C., *Jb. Wiss. Bot.* **79**, 493 (1934).
76. Montfort C., *Jb. Wiss. Bot.* **84**, 1 (1936).
77. Montfort C., *Planta* **32**, 121 (1941).
78. Montfort C., Zollner G., *Bot. Arch.* **43**, 393 (1942).
79. Mothes K., Sagromsky H., *Naturwissenschaften* **29**, 271 (1941).
80. Munding H., *Protoplasma* **41**, 212 (1952).
81. Mühlenthaler K., Frey-Wyssling A., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, 507 (1959).
82. Myers J., Burr G. O., *J. Gen. Physiol.* **24**, 45 (1940).
83. Nadson G., *Bull. jardin botan. St. Petersbourg* **8**, (1908).
84. Noddack W., Eichhoff H. I., *Z. Physiol. Chem.* **185**, 222 (1939).
85. Nordhausen M., *Ber. dtsh. Bot. Ges.* **21**, 30 (1903).
86. Ohnishi T., *J. Biochem. (Tokyo)* **55**, 494 (1964).
87. Oltmanns F., *Jb. Wiss. Bot.* **16**, 1 (1883).
88. Oltmanns F., *Morphologie und Biologie der Algen*, Jena 1905.
89. Packer L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 355 (1962).
90. Packer L., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 12 (1963).
91. Packer L., Marchant R. I., Mukohata Y., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 23 (1963).
92. Perner E., *Z. Naturforsch.* **11b**, 567 (1956).
93. Peteler K., *Protoplasma* **32**, 9 (1939).
94. Price L., Klein W. H., *Plant Physiol.* **36**, 733 (1961).
95. Pringsheim N., *Jb. Wiss. Bot.* **12**, 288 (1879).
96. Rabinowitch E. J., *Photosynthesis and related processes*, tom I, New York 1945.
97. Santarius K. A., Heber U., *Biochim. Biophys. Acta* **102**, 39 (1965).
98. Sargent M. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **20**, 251 (1934).
99. Schanderl H., Kaempfert W., *Planta* **18**, 700 (1933).
100. Seitz K., *Protoplasma* **58**, 621 (1963).
101. Senn G., *Die Gestalts- und Lagerveränderungen der Pflanzenchromatophoren*, Leipzig 1908.
102. Seybold A., *Bot. Arch.* **43**, 71 (1942).
103. Seybold A., *Planta* **38**, 601 (1950).
104. Seybold A., *Naturwissenschaften* **43**, 90 (1956).
105. Seybold A., Egle K., *Planta* **26**, 491 (1937).
106. Seybold A., Egle K., *Jb. Wiss. Bot.* **86**, 50, 80 (1938).
107. Seybold A., Egle K., *Planta* **28**, 87 (1938).
108. Seybold A., Egle K., *Planta* **29**, 114 (1939).
109. Seybold A., Egle K., *Bot. Arch.* **40**, 560 (1940).
110. Seybold A., Falk H., *Planta* **53**, 339 (1959).
111. Seybold A., Weissweiler A., *Bot. Arch.* **43**, 252 (1942).
112. Seybold A., Weissweiler A., *Bot. Arch.* **44**, 102 (1943).
113. Shibata K., *J. Biochem. (Tokyo)* **44**, 147 (1957).
114. Shirley H. L., *Am. J. Botany* **16**, 354 (1929).
115. Shlyk A. A., *Metabolizm chlorofila w zelenom rastienii*, Minsk 1965.
116. Shlyk A. A., Kaler V. L., Vlasenok L. I., Gaponenko V. I., *Photochem. Photobiol.* **2**, 129 (1963).
117. Simonis W., *Planta* **29**, 192 (1939).
118. Sironval C., *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* **85**, 285 (1953).
119. Sironval C., Kandler O., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 359 (1958).
120. Smith J. H. C., Benitez A., *Plant Physiol.* **29**, 359 (1958).
121. Smith J. H. C., Young V. M. K., w *Radiation Biology*, red. A. Hollaender, tom III str. 393.

122. Stahl I., *Bot. Ztg* 18 (1880).
123. Stahl I., *Jenaische Zeitschr. f. Naturwiss.* 16, 162 (1883).
124. Starzecki W., *Acta Soc. Bot. Polon.* 27, 22L (1958).
125. Starzecki W., *Acta Soc. Bot.* 31, 419 (1962).
126. Starzecki W., *Acta Biol. Cracov.* 7, 21 (1964).
127. Steemann-Nielsen E., *Physiol. Plantarum* 2, 247 (1949).
128. Steemann-Nielsen E., *Physiol. Plantarum* 5, 334 (1952).
129. Steemann-Nielsen E., *Physiol. Plantarum* 15, 161 (1962).
130. Steemann-Nielsen E., Hansen V. K., Jorgensen E. G., *Physiol. Plantarum* 15, 505 (1962).
131. Steuer I., Diss. Univ. München, 1945.
132. Strugger S., *Naturwissenschaften* 37, 166 (1950).
133. Strugger S., *Protoplasma* 43, 120 (1954).
134. Virgin H. I., *Physiol. Plantarum* 4, 255 (1951).
135. Virgin H. I., *Physiol. Plantarum* 5, 575 (1952).
136. Virgin H. I., *Physiol. Plantarum* 8, 389 (1955).
137. Virgin H. I., *Physiol. Plantarum* 11, 347 (1958).
138. Virgin H. I., *Physiol. Plantarum* 13, 155 (1960).
139. Virgin H. I., *Physiol. Plantarum* 14, 384 (1961).
140. Virgin H. I., *Physiol. Plantarum* 14, 439 (1961).
141. Virgin H. I., Kahn A., Wettstein D. von, *Photochem. Photobiol.* 2, 83 (1963).
142. Warburg O., Negelein E., *Z. Physik. Chem.* 102, 235 (1922).
143. Wendel K., *Z. ges. Naturwiss.* 6, 327 (1940).
144. Wendel K., *Protoplasma* 48, 382 (1957).
145. Wettstein D. von, Kahn A., *Proc. Eur. Conf. on Electron Micr.* 2, 1051 (1960).
146. Whatley F. R., Arnon D. I., w Methods in Enzymology, tom VI red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan (1963), str. 308.
147. Więckowski S., *Acta Soc. Bot. Polon.* 26, 657 (1957).
148. Więckowski S., *Acta Soc. Bot. Polon.* 29, 395 (1960).
149. Więckowski S., *Wiadomości botaniczne* 8, 3 (1964).
150. Willstätter R., Stoll A., *Untersuchungen über Chlorophyll*, Berlin 1913.
151. Willstätter R., Stoll A., *Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure*, Berlin 1918.
152. Withrow R. B., Wolf J. B., Price L., *Plant Physiol.* 31, XIII (Suppl.) (1956).
153. Wolf J. B., Price L., *Arch. Biochem. Biophys.* 72, 293 (1957).
154. Wolken J. J., Mallon A. D., *Biochim. Biophys. Acta* 25, 267 (1957).
155. Wylie R., *Am. J. Botany* 35, 251 (1949).
156. Zurzycka A., Zurzycki J., *Acta Soc. Bot. Polon.* 22, 667 (1953).
157. Zurzycki J., *Acta Bot. Polon.* 22, 299 (1953).
158. Zurzycki J., *Experientia* 11, 263 (1955).
159. Zurzycki J., *Acta Soc. Bot. Polon.* 24, 27 (1955).
160. Zurzycki J., *Acta Soc. Bot. Polon.* 26, 157 (1957).
161. Zurzycki J., *Acta Soc. Bot. Polon.* 29, 385 (1960).
162. Zurzycki J., *Acta Soc. Bot. Polon.* 30, 503 (1961).
163. Zurzycki J., *Ber. dtsh. Bot. Ges.* 74, 214 (1961).
164. Zurzycki J., *Acta Soc. Bot. Polon.* 31, 489 (1962).
165. Zurzycki J., w *Encyclopedia of plant physiology*, tom XVII/2 red. W. Ruhland, Berlin, str. 940 (1962).
166. Zurzycki J., *Protoplasma* 58, 458 (1964).
167. Zurzycki J., *Acta Soc. Bot. Polon.* 33, 133 (1964).
168. Zurzycki J., *Acta Soc. Bot. Polon.* 33, 121 (1964).
169. Zurzycki J., *Acta Soc. Bot. Polon.* 34, 637 (1965).
170. Zurzycki J., w *Currents in Photosynthesis*, red. J. B. Thomas i J. C. Goedheer, Rotterdam (1966), str. 235.
171. Zurzycki J., *Acta Soc. Bot. Polon.* 35 (w druku).

STANISŁAW WIĘCKOWSKI*

Formy chlorofilu *in vivo* i ich rola w fotosyntezie

Chlorophyll Forms *in vivo* and Their Function in Photosynthesis

The main properties of various forms of chlorophyll and bacteriochlorophyll *in vivo* and their function in two photoreactions of photosynthesis are briefly discussed.

Określenie najważniejszych właściwości barwników asymilacyjnych *in vitro* nie nastroczało specjalnych trudności, gdyż związki te można uzyskać w większych ilościach w stanie czystym. Jednakże w rozpuszczalnikach organicznych mają one inne właściwości niż w komórce nieuszkodzonej. Wielu autorów starało się wykazać, że w pewnych warunkach chlorofile *in vitro* i *in vivo* mają podobne właściwości, na przykład jednodrobinowa, zorientowana i odpowiednio gęsta warstwa chlorofilu *a* na powierzchni wody ma w zakresie czerwieni widmo absorpcyjne podobne do widma chlorofilu w komórce (47). W określonych warunkach *in vitro* (na przykład w obecności pirydyny i kwasu askorbinowego) może zajść odwracalna fotoredukcja chlorofilu i związane z nią zmiany widma absorpcyjnego (51). Podobne zmiany wykazano *in vivo* u tych drobin chlorofilu, które biorą bezpośredni udział w transporcie elektronów w procesie fotosyntezy.

Badania nad chlorofilem *in vivo* umożliwiło dopiero zastosowanie bardzo czułych metod spektrofotometrycznych.

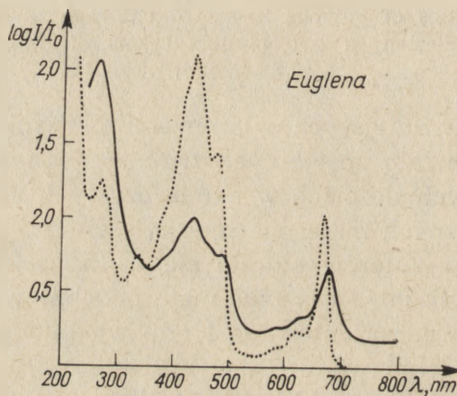
I. Właściwości chlorofilu *in vivo*

Na początku obecnego stulecia Monteverde i Lubimenko (58, 59, 60) wykazali, że barwniki asymilacyjne mają inne własności spektralne gdy znajdują się w komórce, a inne gdy są rozpuszczone

* dr, adiunkt w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.

Wykaz używanych skrótów: Ca — chlorofil *a*; Cb — chlorofil *b*; B — bakteriochlorofil; F — forma chlorofilu identyfikowana na podstawie widma fluorescencyjnego; P — forma chlorofilu identyfikowana na podstawie maksimum absorpcji w dalekiej czerwieni. W symbolach form chlorofilu (np. Ca₆₇₀) liczba u dołu oznacza długość fali, przy której pojawia się maksimum absorpcji światła. nm = mμ.

w rozpuszczalnikach organicznych. Wskazywało to na istnienie połączeń protochlorofilu i chlorofilu z innymi składnikami komórki, ulegających rozbiciu podczas ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi. Późniejsze badania potwierdziły przypuszczenia Monteverde i Lubimenki; stwierdzono między innymi (30, 68), że maksima absorpcji żywych zielonych komórek lub koloidalnych wyciągów wodnych z liści są przesunięte o kilka lub kilkanaście nm w stronę fal dłuższych, a także bardziej spłaszczone w porównaniu z widmami barwników w roztworach na przykład w etanolu (rysunek 1). Możliwe, że różnice te tylko częściowo związane są z inną formą występowania chlorofilu *in vivo*, a częściowo wywołane są absorpcją światła przez inne składniki komórki.



Rys. 1. Widmo absorpcyjne zawiesiny komórek *Euglena* (linia ciągła) i wyciągu alkoholowego z tej samej liczby komórek (linia przerywana) (86).

Większość badaczy uważa jednak, że widmo absorpcyjne barwników *in vivo* modyfikowane jest tylko przez dołączoną do nich część białko-lipidową (83 i inni). Opierają się oni na porównaniu widm absorpcyjnych barwników syntetycznych w roztworze z widmami tych samych barwników połączonych z substancjami wysoko spolimeryzowanymi (63). K r a s n o w s k y i w s p. (56) przypuszczają natomiast, że skomplikowany obraz widm absorpcyjnych *in vivo* uwarunkowany jest także występowaniem niektórych drobin chlorofilu w formie monomerycznej, a innych w formie agregatów. Jeszcze inni sądzą, że bliskie sąsiedztwo drobin karotenoidów na przykład u bakterii powoduje przesunięcia maksimum absorpcji bakteriochlorofilu w kierunku dłuższych fal (3, 45).

Cząstki zawierające barwnik i białko w zbuforowanym roztworze wodnym otrzymano w wielu pracowniach. S m i t h (69), B o a r d m a n (4, 5) i inni stosując metody czysto chemiczne i chromatograficzne oraz frakcjonowane wirowanie otrzymali kompleks protochlorofil-białko zdolny do przemiany przy udziale światła w kompleks chlorofil *a*-białko (Smith zaproponował, aby kompleksy te nazywać holochromami). Okre-

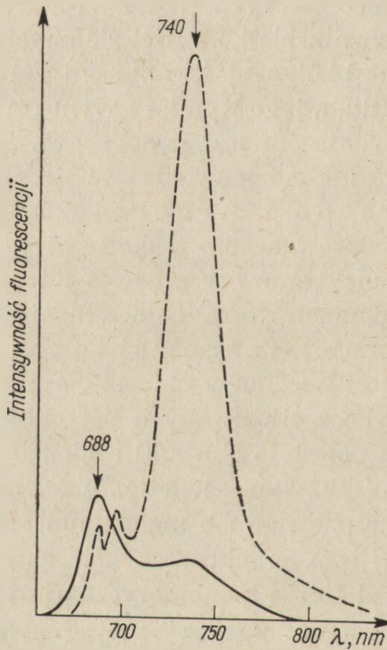
ślono także najważniejsze właściwości fizyko-chemiczne holochromu protochlorofilu, ciężar „drobinowy” tego kompleksu mieści się w granicach od 600 000 do 1 000 000 (4, 71, 72), na zdjęciach uzyskanych w mikroskopie elektronowym „makromolekuły” te mają kształt spłaszczonej elipsoidy o średnicach 218, 193 i 93 Å (5, 72), współczynnik sedymentacji wynosi 16—18 s (4, 74), a współczynnik dyfuzji $2,70 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}$ (4). Holochrom protochlorofilu jest substancją niejednorodną, gdyż nawet najdokładniej oczyszczony zawiera zawsze pewną ilość karotenoidów (70) i nieaktywnej formy protochlorofilu, to znaczy formy niezdolnej do przemiany w chlorofil *a* przy udziale światła (5). Część białkowa tego kompleksu jest zupełnie nieznaną; stwierdzono jedynie, że w jej skład wchodzi stosunkowo dużo tyrozyny (71). Park i wsp. (64, 65) otrzymali analogiczne cząstki barwnik-białko z liści zielonych i nazwali je kwantasomami. Oprócz części białkowej kwantasom zawiera prawdopodobnie kilkaset drobin chlorofilu, a jego wymiary wynoszą $185 \times 155 \times 100 \text{ Å}$ (64). Przypuszcza się, że kwantasom jest podstawową jednostką strukturalną gran chloroplastu. Być może odpowiada on jednostce fotosyntetycznej opisaną przez Emersona i Arnolda (25). Wyizolowane kwantasomy są zdolne do przeprowadzenia reakcji świetlnych i ciemnych związanych z transportem elektronów w procesie fotosyntezy (16, 65).

Nowy etap w badaniach form chlorofilu *in vivo* zapoczątkowały w latach 1952—1955 prace Krasnowskiego i wsp. (53, 54, 55). Badając przemianę protochlorofilu w chlorofil *a*, po oświetleniu koloidalnych wyciągów wodnych z etiolowanych liści, stwierdzili oni, że bezpośrednio po oświetleniu powstaje chlorofil z maksimum absorpcji w czerwieni przy 670 nm. Po dłuższym oświetleniu forma ta częściowo zanika, a na jej miejsce tworzy się nowa o maksimum absorpcji przy 677—678 nm. Krasnowski i wsp. przypuszczają, że chlorofil o maksimum absorpcji przy 670 nm jest formą monomeryczną i aktywną w fotosyntezie, natomiast forma o maksimum absorpcji przy 677—678 nm jest nieaktywnym w fotosyntezie polimerem. Stopniowe powstawanie różnych form chlorofilu po oświetleniu etiolowanych roślin zostało potwierdzone przez innych badaczy (32, 67).

Różne formy chlorofilu *a* występują nie tylko okresowo podczas zazieleniania się etiolowanych roślin, znajdują się one także w zielonych, zdolnych do fotosyntezy komórkach. Halldal (46) wykrył dwie formy chlorofilu *a* u *Anacystis nidulans*. Dwie formy mające maksima absorpcji przy 678 i 672 nm stwierdzono również u *Porphyrula lacineata* (80), przy czym okazało się, że usunięcie fikobilin z komórek nie wpływa na położenie maksimów. Według Brown i Frencha (15) w młodych kulturach *Euglena* występują dwie formy chlorofilu *a* (Ca_{670} i Ca_{685}), natomiast w starszych, hodowanych w słabym świetle, tworzy się trzecia forma z maksimum absorpcji przy 695 nm (Ca_{695}). Dłuższe trzymanie

kultury w ciemności wywołuje tworzenie się czwartej formy (Ca_{710}), która powstaje przypuszczalnie z Ca_{670} (10). U *Chlorella* nie stwierdzono analogicznych zmian w widmie absorpcyjnym związanych z wiekiem kultury (14). Według Thomasa (75, 79) w chloroplastach *Aspidistra elatior* występuje sześć różnych form chlorofilu *a*, zaś u *Anacystis nidulans* nawet siedem. Kok wykrył formę chlorofilu o maksimum absorpcji w dalekiej czerwieni i oznaczył ją symbolem P_{700} (48, 50).

Ponieważ wiadomo, że położenie maksimum absorpcji chlorofilu może być związane z gatunkiem rośliny (32) nie jest wykluczone, że niektóre jego formy uważane za odmienne są w istocie identyczne na przykład P_{700} i Ca_{695} .



Rys. 2. Widmo fluorescencyjne cienkiego liścia *Adiantum caudatum* w temperaturze $+20^{\circ}\text{C}$ (linia ciągła) i w temperaturze -196°C (linia przerywana) (40).

Na istnienie kilku form chlorofilu *a in vivo* wskazuje też analiza widm fluorescencyjnych. Chlorofil *in vivo* emituje światło z wydajnością 2—3%. U glonów widmo fluorescencyjne chlorofilu w temperaturze pokojowej ma jedno wyraźne maksimum przy około 685 nm. Natomiast w temperaturze ciekłego azotu występują dwa lub trzy maksima: przy 686 nm, 696 nm i 717—720 nm (9, 37, 40, 41). W młodych kulturach sinic i krasnorostów te trzy maksima są mniej więcej równej wysokości, a w starszych kulturach i u zielenic maksimum przy 717 nm jest najwyższe (40). Według Goedheera (40) w chloroplastach roślin wyższych w temperaturach poniżej -90°C też występują trzy maksima (przy 686, 696 i najwyższe przy 735—740 nm) (rysunek 2).

Poszczególne maksima fluorescencyjne przypisuje on trzem różnym formom chlorofilu *a* i uważa się: $F_{686} = Ca_{670}$, $F_{696} = Ca_{680}$, $F_{740} = Ca_{695}$ (40). Występujące w niskich temperaturach maksima fluorescencyjne pojawiają się stopniowo po oświetleniu etiolowanych liści fasoli (37), co także wskazuje na pewną kolejność tworzenia się poszczególnych form chlorofilu w komórce.

Starano się także oznaczyć inne właściwości, poza spektralnymi, poszczególnych form. Ca_{695} jest najbardziej wrażliwy na działanie silnego światła, wyższej temperatury i kwasoty (11, 75). Najbardziej odporny na działanie światła o większym natężeniu ma być Ca_{673} (14).

Warunkiem ilościowego oznaczania poszczególnych form chlorofilu jest dokładne ich rozdzielenie, porównanie wysokości maksimów absorpcji pozwala bowiem tylko na przybliżone oznaczenia. Takie przybliżone wartości wskazują, że skład chlorofilów *in vivo* uzależniony jest od gatunku rośliny i warunków hodowli (15, 55). U *Euglena gracilis* Ca_{695} występuje w ilości około 20%, w nieco większym stężeniu u *Ochromonas danice*, u innych glonów w ilościach 3 do 5%. *Euglena mutabilis* nie zawiera w ogóle tej formy (15).

Niektórym badaczom udało się częściowo oddzielić od siebie omawiane formy chlorofilu *a*. Allen i wsp. stosując wirowanie w gradencie glicerolu częściowo oddzielili Ca_{670} od Ca_{683} . Frakcjonowane wirowanie chloroplastów lub chromatoforów uprzednio rozbitych ultradźwiękami (77), traktowanych desoksycholanem sodu (12, 13) lub digitoniną (6) prowadzi także do częściowego rozdziału poszczególnych form związanych ze składnikiem lipoproteinowym. W wielu przypadkach rozdzielone frakcje były czynne fotochemicznie, to znaczy mogły redukować lub utleniać pewne związki chemiczne przy udziale światła (6, 12, 13).

Również widma absorpcyjne zawiesziny komórek różnych gatunków bakterii purpurowych wskazują na istnienie dwóch lub trzech różnych form bakteriochlorofilu *in vivo* (8, 20, 83 i inni). Zależnie od położenia maksimum w bliskiej podczerwieni nazwano je B_{890} , B_{850} i B_{800} (20). Te formy bakteriochlorofilu również częściowo rozdzielono, na przykład Brill (7) odwirował frakcję zawierającą B_{890} z komórek *Rhodospseudomonas spheroides* traktowanych desoksycholanem. Podobne wyniki otrzymano stosując frakcjonowane wirowanie komórek bakteryjnych potraktowanych tritonem X (8).

Smith i French (73) przywiązują wielką wagę do możliwości rozdziału form chlorofilu w stanie naturalnym, ponieważ wskazywałoby to z jednej strony na realność istnienia różnych kompleksów chlorofilu *a* oddzielonych od siebie przestrzennie, a z drugiej strony pozwoliłoby sądzić o funkcji poszczególnych form w fotosyntezie.

W dotychczasowych badaniach nad barwnikami *in vivo* zajmowano się przede wszystkim chlorofilem *a*, ze względu na możliwość łatwego

analizowania jego widma absorpcyjnego w czerwieni. Poza chlorofilem *a* bowiem jedynie chlorofil *b* absorbuje światło w zakresie czerwieni. Jednakże maksimum absorpcji chlorofilu *b* jest przesunięte w kierunku krótszych fal, poza tym występuje on w mniejszych ilościach i jego absorpcja właściwa ma niższe wartości, zaś jego synteza jest opóźniona w stosunku do syntezy chlorofilu *a*; znane są także rośliny, które nie zawierają w ogóle chlorofilu *b*.

II. Funkcje chlorofilu w fotosyntezie

Obserwacje Emersona (24, 26) zapoczątkowały serię bardzo intensywnych badań nad fotochemiczną stroną fotosyntezy. Badacz ten stwierdził, że w świetle czerwonym o długości fali około 690 nm jeszcze dość silnie absorbowanym przez chlorofil fotosynteza jest niewspółmier- nie słaba. Natomiast uzupełnienie światła o tej długości fali promienio- waniem o krótszej fali (około 644 nm) znacznie podwyższa intensywność fotosyntezy. Wyniki te sugerowały istnienie conajmniej dwóch reakcji fotochemicznych współdziałających w asymilacji CO₂. Późniejsze badania (22, 57, 62, 87) w zupełności potwierdziły przypuszczenia Emersona.

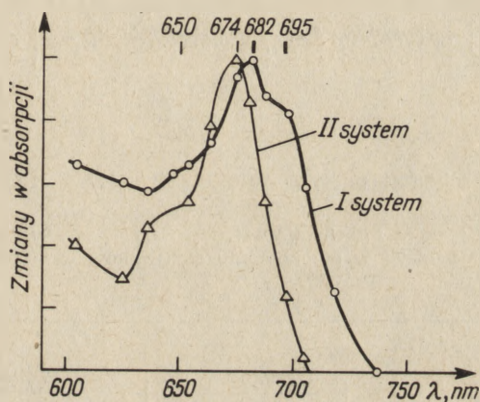
W badaniach mechanizmu przenoszenia wodoru (dokładniej elek- tronów) z H₂O na NADP w procesie fotosyntezy duże usługi oddają obser- wacje zmian w widmach absorpcyjnych związków biorących bezpośredni udział w tym przenoszeniu (mają one inne widma w stanie zredukowa- nym niż w utlenionym). Dotyczy to zwłaszcza cytochromu *f*, plastocyja- niny i tych drobin chlorofilu, które biorą bezpośredni udział w transporcie elektronów. Zmiany te są odwracalne i mogą także zachodzić w układach częściowo zmienionych, na przykład w obecności dostarczonych z ze- wnątrz pewnych dawców lub biorców elektronów (18, 23, 29, 36 i inni). Duże usługi oddaje także pomiar potencjałów redoksowych.

Duysens i wsp. (21, 22) badając widmo działania światła w foto- oksydacji cytochromu *f* *in vivo* stwierdzili, że w procesie tym biorą udział dwa systemy fotochemiczne, nazwane przez nich I i II systemem fotochemicznym. Energia absorbowana przez I system powoduje prawdo- podobnie utlenianie cytochromu *f*, natomiast przez II system — jego redukcję.

Stosując izolowane chloroplasty lub fragmenty chloroplastów udało się wielu badaczom oddzielić te dwie reakcje fotochemiczne od siebie i określić odpowiadające im widma działania. Witt i wsp. (61, 84, 85, 86) wykazali, że II system (związany z odwracalną zmianą absorpcji przy 475 i 515 nm) staje się nieaktywny w starszych chloroplastach w obec- ności zredukowanego dwuchlorofenoloindofenolu lub zredukowanego metylosiarczanu *N*-metylofenazyniowego (PMS_{zred}) jako dawców elek- tronów. Traci on również swoją aktywność po podgrzaniu chloroplastów do temperatury 50°C lub po ekstrakcji eterem naftowym. W tych wa-

runkach czynny jest system I, z którym wiążą się odwracalne zmiany absorpcji przy 433 i 703 nm. System I traci aktywność pod wpływem żelazicyjanku. W ten sposób inaktywując jeden system można było wyznaczyć widmo działania światła dla drugiego systemu. Widmo działania dla I systemu ma główne maksimum przy 682 nm i słabsze przy 695 nm, natomiast dla systemu II największą aktywność światła obserwuje się przy 674 nm, a słabszą przy 650 nm (rysunek 3).

Goedheer (38, 39) badał aktywność reakcji fotochemicznych poprzez pomiar natężenia luminescencji. Jeżeli obiekt roślinny zostanie oświetlony promieniami czerwonymi o krótszej fali, wtedy światło to jest absorbowane przez system oznaczony jako „p”, który w pewnych warunkach może powodować luminescencję. Luminescencja ta jest



Rys. 3. Widma działania światła dla systemów fotochemicznych czynnych w fotosyntezie. Materiał: fragmenty chloroplastów szpinaku.

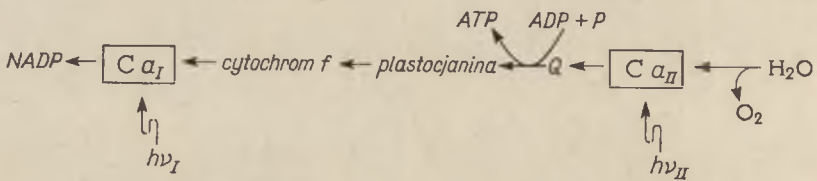
Odcięte — długości fali światła wzbudzającego; rzędne — zmiany absorpcji przy 515 nm (system II) i przy 433 nm (system I) (61)

bardzo słaba lub w ogóle nie wystąpi, jeżeli obok jest równocześnie czynny drugi system zwany „q” absorbujący światło czerwone o dłuższej fali. Według Goedheera system p jest związany z utlenianiem wody i redukcją związku x (przypuszczalnie plastochinonu) i cytochromu. Natomiast światło absorbowane przez system q powoduje utlenianie cytochromu i redukcję nukleotydu pirydynowego. System q odpowiada więc wyżej opisanemu I systemowi, natomiast system p — II systemowi.

W transporcie elektronów w procesie fotosyntezy oprócz dwóch reakcji fotochemicznych istnieje także kilka reakcji ciemnych (21, 29, 57, 61, 66 i inni). Jeden z wielu zaproponowanych schematów wędrówki elektronów z H_2O na NADP przedstawiono na rysunku 4.

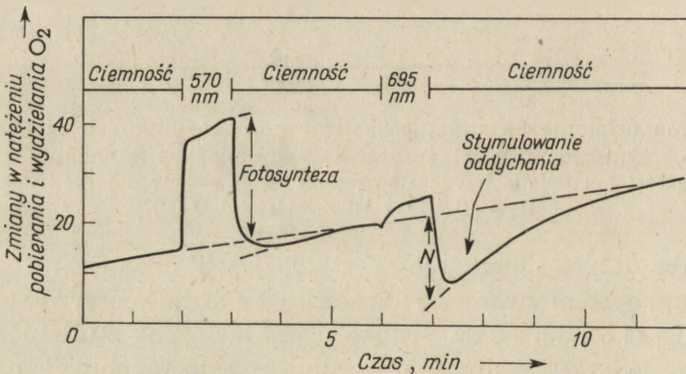
Grupa badaczy z Instytutu Carnegiego w Stanford pod kierunkiem prof. Frencha interesuje się nie bezpośrednim udziałem reakcji fotochemicznych w transporcie elektronów związanych z asymilacją CO_2 lecz udziałem tych reakcji w procesie wydzielania i pobierania tlenu.

Stwierdzono (27, 28, 34), że u wielu glonów światło zielone (570 nm) absorbowane głównie przez fikobiliny, wywołuje intensywną fotosyntezę bezpośrednio po oświetleniu (rysunek 5). W okresie ciemności następującym bezpośrednio po okresie działania światła zielonego, odbywa się normalne pobieranie tlenu związane z oddychaniem (mniej więcej tak samo intensywne jak u obiektu kontrolnego, to znaczy trzymanego w ciągłej ciemności). Natomiast jeżeli oświetlić roślinę monochromatycznym światłem czerwonym o długości fali 695 nm natężenie fotosyntezy jest niewielkie. Jednakże w okresie ciemności następującym bezpośrednio po okresie działania światła czerwonego pobieranie tlenu jest znacznie intensywniejsze niż u obiektu kontrolnego (rysunek 5).



Rys. 4. Uproszczony schemat przenoszenia elektronów z H_2O na NADP w procesie fotosyntezy.

$h\nu_I$, $h\nu_{II}$ — 1-sza i 2-ga reakcja fotochemiczna; Ca_I , Ca_{II} — specjalne formy chlorofilu a biorące bezpośredni udział w przenoszeniu elektronów; Q — plastochinon (29)



Rys. 5. Zmiany w natężeniu wydzielania i pobierania O_2 u *Porphyridium cruentum* (wartości względne — odczyty na aparacie samorejestrującym) wywołane oświetleniem światłem zielonym i czerwonym. Odcinek N reprezentuje fotostymulację oddychania.

Stosowanie intensywności światła: zielone — $178 \text{ erg cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, czerwone — $216 \text{ erg cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (34)

Badacze grupy Frencha określili widma działania światła dla stymulacji wydzielania tlenu w okresach oświetlenia i stymulacji pobierania tlenu w okresach ciemności. U *Ulva* widmo działania dla pobierania tlenu ma główne maksimum przy 675 nm i słabsze przy 650 nm. Natomiast widmo działania dla wydzielania tlenu ma główne maksimum przy 650 nm i słabsze przy 675 nm (81). Określenie widm działania

światła dla stymulowania wydzielania i pobierania tlenu było możliwe dzięki zablokowaniu jednego z fotosystemów (powodującego wydzielanie tlenu w okresach oświetlenia) działaniem 3-(3,4-dwuchlorofenylo)-1,1-dwumetylomocznika (DCMU). Związek ten nie inaktywuje systemu fotochemicznego stymulującego pobieranie tlenu w okresie ciemności. Mechanizm stymulującego działania światła na pobieranie tlenu podczas oddychania jest nieznan. Być może jeden z fotosystemów czynnych w fotosyntezie działa na szybkość przemiany metabolitów procesu oddechowego (33).

Aktywność systemów fotochemicznych związanych z fotosyntezą uwarunkowana jest absorpcją światła przez barwniki asymilacyjne. Govindjee i Rabinowitch (43) pierwsi zwrócili uwagę na możliwość uczestniczenia określonych form chlorofilu w różnych reakcjach fotosyntezy. Müller, Fork i Witt (61) porównali widma czynne systemów I i II z położeniem maksimów absorpcji poszczególnych barwników asymilacyjnych i wykazali, że z systemem I związany jest Ca_{682} , Ca_{695} i być może częściowo Cb_{650} (patrz także 29). Natomiast z II systemem jest związany Cb_{650} i Ca_{674} . Podobnie Goedheer (41) wykazał, że z systemem q związane są Ca_{680} i Ca_{695} , zaś z systemem p — Ca_{670} . French i Fork (34) przypuszczają, że pobieranie tlenu jest stymulowane przez system absorbujący światło raczej długofalowe, w którym biorą udział Ca_{683} i Ca_{695} , natomiast wydzielanie tlenu jest związane z chlorofilem b, Ca_{675} , karotenoidami i fikobilinami. Pierwszy z wymienionych systemów tak zwany system chlorofilowy absorbujący fale długie (LWC — od ang. *long wavelength chlorophyll system*) odpowiada systemowi I. Drugi — pomocniczy system barwników (AP od ang. *accessory pigment system*) odpowiada systemowi II.

Nasuwa się pytanie, czy wszystkie spośród drobin barwników związanych bądź to z systemem I bądź z systemem II pełnią identyczną funkcję, to znaczy absorbują kwanty świetlne i biorą udział w przeniesieniu elektronów, czy też są określone drobinie specjalnie predestynowane do uczestniczenia w reakcjach związanych z przenoszeniem elektronów. Dotychczas nie uzyskano pełnej odpowiedzi na to pytanie. Kok (49, 50) podał szereg dowodów wskazujących, że chlorofil P_{700} uczestniczy bezpośrednio tylko w jednej reakcji fotochemicznej. Govindjee (44) przypuszcza natomiast, że stwierdzone przez niego maksima fluorescencji przy 696 i 720 nm pochodzą od drobin chlorofilu a biorących bezpośredni udział w dwóch reakcjach fotochemicznych: F_{696} byłby związany z systemem II, a F_{720} z systemem I. Prawdopodobnie forma chlorofilu F_{720} odpowiada chlorofilowi P_{700} . Nie jest wykluczone, że ta sama forma chlorofilu może uczestniczyć w obu systemach (66). Natomiast według hipotezy Goedheera (42) w systemie II nie ma specjalnej formy chlorofilu występującej w bardzo małych ilościach i pełniącej

funkcję pułapki energii (*energy trap*); rolę tę mają spełniać wszystkie drobiny Ca_{670} .

U bakterii purpurowych w jednym systemie ma bezpośrednio uczestniczyć tylko część drobin bakteriochlorofilu B_{890} (79). Barwniki uczestniczące bezpośrednio w reakcjach związanych z przenoszeniem elektronów, gdyż występują w małym stężeniu na przykład chlorofil P_{700} wprawdzie występuje powszechnie w roślinach, ale w stężeniu mniejszym niż 1% ogólnej ilości chlorofilu (48). U *Rhodospirillum rubrum* i *Rhodopseudomonas spheroides* na około 50 drobin różnych form bakteriochlorofilu przypada jedna drobina B_{890} (82).

Funkcja innych drobin barwników asymilacyjnych ogranicza się do absorpcji kwantów energii świetlnej i przekazywania jej na pułapki energii. Przenoszenie energii z jednych drobin na inne odbywa się według teorii Förstera na drodze indukowanego rezonansu. Efektywność przenoszenia energii jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości między drobinami i odbywa się od drobin absorbujących światło o krótszych falach (większa energia kwantu) do drobin absorbujących światło o dłuższych falach (mniejsza energia kwantu). U *Rhodospirillum rubrum* i *Chromatium* energia absorbowana przez karotenoidy jest przekazywana z wydajnością 30—40%, u *Rhodopseudomonas spheroides* z wydajnością bliską 90% (2, 35); natomiast z bakteriochlorofilu B_{800} do B_{850} i z B_{850} do B_{890} z wydajnością prawie 100% (19).

Niektóre z opisanych wyników wymagają jeszcze potwierdzenia. Wydaje się jednak, że istnienie dwóch reakcji fotochemicznych współdziałających ze sobą w procesie fotosyntezy jest dostatecznie udowodnione. Z każdą z tych reakcji związany jest określony system barwników asymilacyjnych. Barwniki główne, występujące w bardzo małych ilościach bezpośrednio uczestniczą w reakcjach fotochemicznych. Funkcja barwników towarzyszących, występujących w znacznie większym stężeniu ogranicza się do absorbowania kwantów energii świetlnej i przekazywania jej na barwniki główne.

W artykule tym starano się przedstawić, w sposób najbardziej ogólny, niektóre problemy związane z fotochemiczną stroną fotosyntezy. Ze względu na ogromną liczbę prac poświęconych temu zagadnieniu nie podano pełnego wykazu piśmiennictwa. Zainteresowani mogą znaleźć takie wykazy w innych opracowaniach (17, 31, 52, 73, 78).

LITERATURA

1. Allen M. B., Murchio J. C., Jeffrey S. W., Bandix S. G., *Plant Physiol.* **37**, xii (1962).
2. Ames J., *Biochim. Biophys. Acta* **66**, 22 (1963).

3. Bergeron J. A., Fuller R. C., *Nature* **184**, 1340 (1959).
4. Boardman N. K., *Biochim. Biophys. Acta* **62**, 63 (1962).
5. Boardman N. K., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 279 (1962).
6. Boardman N. K., Anderson J. M., *Nature* **203**, 166 (1964).
7. Bril C., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 458 (1958).
8. Bril C., Thesis, University of Utrecht (1964).
9. Brody M., *Science* **128**, 838 (1958).
10. Brown S. J., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 299 (1963).
11. Brown S. J., *Photochem. Photobiol.* **2**, 159 (1963).
12. Brown S. J., Bril C., *Carnegie Inst. Wash. Year Book* **64**, 373 (1965).
13. Brown S. J., Bril C., Urbach W., *Plant. Physiol.* **40**, 1086 (1965).
14. Brown S. J., French C. S., *Plant Physiol.* **34**, 305 (1959).
15. Brown S. J., French C. S., *Biophys. J.* **1**, 539 (1961).
16. Calvin M., *Science* **135**, 879 (1962).
17. Clayton R. K., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **14**, 159 (1963).
18. Clayton R. K., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 312 (1963).
19. Duysens L. N. M., Thesis, University of Utrecht (cyt. za C. Bril — 8).
20. Duysens L. N. M., *Nature* **168**, 548 (1951).
21. Duysens L. N. M., Amesz J., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 243 (1962).
22. Duysens L. N. M., Amesz J., Kamp M. B., *Nature* **190**, 510 (1961).
23. Duysens L. N. M., Huiskamp W. J., Vos J. J., van der Hard J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 188 (1956).
24. Emerson R., *Science* **125**, 746 (1957).
25. Emerson R., Arnold W. J., *J. Gen. Physiol.* **16**, 191 (1932).
26. Emerson R., Lewis C. M., *Carnegie Inst. Wash. Year Book* **40**, 157 (1941).
27. Fork D. C., w Photosynthesis Mechanisms in Green Plants Publication 1145, Nat. Acad. Sci. U. S. (1963), str. 352.
28. Fork D. C., w La photosynthese, wyd. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1963, str. 243.
29. Fork D. C., Urbach W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 1307 (1965).
30. French C. S., w Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals, red. R. B., Withrow, Am. Assoc. for the Advancement of Science, Washington, D. C., 1959, str. 15.
31. French C. S., w Encyclopedia of Plant Physiology, red. W. Ruhland, t. V/1 Springer Verlag, Berlin 1960, str. 252.
32. French C. S., w Light and Life, red. W. D. McElroy, B. Glass. John Hopkins Press, 1961, str. 447.
33. French C. S., w Currents in Photosynthesis red. J. B. Thomas, J. C. Goedheer, Ad. Donker — Publisher, Rotterdam 1966, str. 285.
34. French C. S., Fork D. C. w Proc. V Intern. Congr. Biochem. Moskwa 1963, t. VI, str. 122.
35. Goedheer J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 1 (1959).
36. Goedheer J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 389 (1960).
37. Goedheer J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 420 (1961).
38. Goedheer J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 294 (1962).
39. Goedheer J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **66**, 61 (1963).
40. Goedheer J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **88**, 304 (1964).
41. Goedheer J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **102**, 73 (1965).
42. Goedheer J. C., w Currents in Photosynthesis red. J. B. Thomas, J. C. Goedheer, Ad. Donker — Publisher, Rotterdam 1966, str. 177.
43. Govindjee R., Rabinowitch E., *Biophys. J.* **1**, 73 (1960).
44. Govindjee R., w Currents in Photosynthesis, red. J. B., Thomas, J. C., Goedheer, Ad. Donker — Publisher, Rotterdam 1966, str. 93.

45. Griffiths M., Sistrom W. R., Cohen-Bazire G., Stanier R. Y., *Nature* **176**, 1211 (1955).
46. Halldal P., *Physiol. Plantarum* **11**, 401 (1958).
47. Jacobs E. E., Holt A. S., Kromhout R., Rabinowitch E., *Arch. Biochem.* **7**, 495 (1957).
48. Kok B., *Acta Bot. Neerd.* **6**, 318 (1957).
49. Kok B., w *Currents in Photosynthesis*, red. J. B. Thomas, J. C. Goedheer, Ad. Donker — Publisher, Rotterdam 1966, str. 383.
50. Kok B., Hoch G., w *La Photosynthese*, wyd. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1963, str. 93.
51. Krasnowsky A. A., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **60**, 421 (1948).
52. Krasnowsky A. A., *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **11**, 363 (1960).
53. Krasnowsky A. A., Kosobutskaja M., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **85**, 177 (1952).
54. Krasnowsky A. A., Kosobutskaja M., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **91**, 343 (1953).
55. Krasnowsky A. A., Kosobutskaja M., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **104**, 440 (1955).
56. Krasnowsky A. A., Kosobutskaja M., Voynowskaja K. K., *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **92**, 1201 (1953).
57. Losada M., Whytley F. R., Arnon D. L., *Nature* **190**, 606 (1961).
58. Lubimenko V., *Rev. Gen. Botan.* **40**, 23 (1928).
59. Monteverde N., Lubimenko V., *Bull. Jardin Imp. bot. St. Petersburg* **9** cz. 2 i 3 (cyt. za K. Eglem — *Encyclopedia of Plant Physiology*, red. W. Ruhland, t. V/1, Springer Verlag, Berlin 1960, str. 323).
60. Monteverde N., Lubimenko V., *Biol. Zbl.* **31**, 449 (1911).
61. Müller A., Fork D. C., Witt H. T., *Z. Naturforsch.* **18b**, 142 (1963).
62. Myers J., French C. S., *J. Gen. Physiol.* **43**, 723 (1960).
63. Oster G., Broyde S. B., *Nature* **192**, 132 (1961).
64. Park R. B., Biggins J., *Science* **144**, 1009 (1964).
65. Park R. B., Pon N. G., *J. Mol. Biol.* **3**, 1 (1961).
66. Rumberg B., Müller A., Witt H. T., *Nature* **194**, 854 (1962).
67. Shibata K., *J. Biochem. (Jap.)* **44**, 147 (1957).
68. Shibata K., Benson A. A., Calvin M., *Biochim. Biophys. Acta* **15**, 461 (1954).
69. Smith J. H. C., *Carnegie Inst. Wash. Year Book* **60**, 371 (1961).
70. Smith J. H. C., w *Biological Structure and Function*, red. T. W. Goodwin, O. Lindberg, t. II, Acad. Press, London 1961, str. 325.
71. Smith J. H. C., Coomber J. C., *Carnegie Inst. Wash. Year Book* **58**, 331 (1959).
72. Smith J. H. C., Coomber J. C., *Carnegie Inst. Wash. Year Book* **60**, 371 (1961).
73. Smith J. H. C., French C. S., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **14**, 181 (1963).
74. Smith J. H. C., Kupke D. W., *Nature* **178**, 751 (1956).
75. Thomas J. B., *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 202 (1962).
76. Thomas J. B., w *La Photosynthese*, wyd. Centre National de la Recherches Scientifique, Paris 1963, str. 287.
77. Thomas J. B., Broekhuis J. W. w *Currents in Photosynthesis*, red. J. B. Thomas, J. C. Goedheer, Ad. Donker — Publisher, Rotterdam 1966, str. 57.
78. Thomas J. B., Goedheer J. C. red. *Currents in Photosynthesis*, Ad. Donker — Publisher, Rotterdam 1966.
79. Thomas J. B., Hammans J. W. K., Arnolds J. W., *Biochim. Biophys. Acta* **102**, 324 (1965).
80. Thomas J. B., Marsman J. W., *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 316 (1959).

81. Vidaver W., *Plant Physiol.* **41**, 87 (1966).
82. Vredenberg W. J., Duysens L. N. M., *Nature* **197**, 355 (1963).
83. Wassink E. C., Katz E., Dorrestein R., *Enzymologia* **7**, 113 (1939).
84. Witt H. T., Müller A., Rumberg B., *Nature* **191**, 194 (1961).
85. Witt H. T., Müller A., Rumberg B., *Nature* **192**, 967 (1961).
86. Witt H. T., Suerra B., Vater J., w *Currents in Photosynthesis*, red. J. B. Thomas, J. C. Goedheer, Ad. Donker — Publisher, Rotterdam 1966, str. 273.
87. Wittingham C. P., Bishop P. M., *Nature* **192**, 426 (1961).

Komunikat nr 2

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej i Komitet Organizacyjny III Zjazdu uprzejmie zawiadamia, że III Zjazd Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej odbędzie się w dniach od 26 do 28 stycznia 1968 r. w Białymstoku.

Tematem zjazdu będzie:

„Diagnostyka Laboratoryjna Schorzeń Nerkowych”

Zarząd Główny i Komitet Organizacyjny proszą o zgłaszanie tytułów prac do dnia 1 marca 1967 r. i o nadsyłanie streszczeń nie przekraczających 200 słów do dnia 1 maja 1967.

Zgłoszenia prac i streszczenia należy przesłać na adres:

Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej SDL, Warszawa, ul. Ceglowska 80.

W czasie Zjazdu w dn. 26 stycznia 1968 odbędzie się Walne Zebranie Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej.

Zarząd Główny P.T.D.L.

i

Komitet Organizacyjny

J. W. SZARKOWSKI, T. GOŁASZEWSKI*

Molekularna struktura chloroplastów a światło

The Molecular Structure of Chloroplasts and the Light

The effect of light on the development of plastid substructure elements correlated with biochemical changes at the molecular level in the organella are discussed. Attention has been focused on the unique biological status of chloroplasts expressed in the fact that light enables, as the indispensable factor, the formation of structures specialized in utilisation of light energy.

W procesie fotosyntezy czynne są plastydy o różnym stopniu uorganizowania struktury wewnętrznej: chloroplasty, feoplasty brunatnic i rodoplasty krasnorostów i okrzemek (38) oraz najprawdopodobniej chromatofory bakterii fotosyntetyzujących. Podstawowa funkcja tych organelli jest uzależniona od światła, jednakże warunkiem ich fizjologicznej czynności, obok obecności barwników asymilacyjnych, jest określona struktura wewnętrzna. Barwniki asymilacyjne jako składniki elementów substrukturalnych plastydu grają rolę w procesach wykształcania się struktury tej organelli, a wiadomo, iż światło jest nieodzownym czynnikiem w pewnych etapach syntezy chlorofilu. Logiczną implikacją tych stwierdzeń jest hipoteza, coraz bardziej dziś ugruntowywana, o udziale światła w samym procesie rozwoju struktury plastydów.

Treścią naszego artykułu będą zagadnienia udziału światła w wykształcaniu się podstawowego elementu struktury plastydów — systemu lamellarnego oraz w procesach różnicowania się struktury organelli na poziomie cząsteczkowym. Zagadnienia te należy omawiać łącznie, gdy rozważa się tak zwany morfogenetyczny wpływ światła na rozwój organelli nie mający nic wspólnego w fotosyntezę (67, 113). Pominiemy natomiast wpływ światła na fotosyntezę i na ruchy chloroplastów w komórce. (Szerszy opis tego zjawiska można znaleźć w 37, 38 i 122).

Wpływając bezpośrednio na rozwój plastydów czynnych w fotosyntezie, a także w biosyntezie białek i przemianach tłuszczowców (36) światło jest podstawowym czynnikiem w rozwoju organizmu roślinnego traktowanego jako całość. Choć w ciemności odbywa się również wzrost

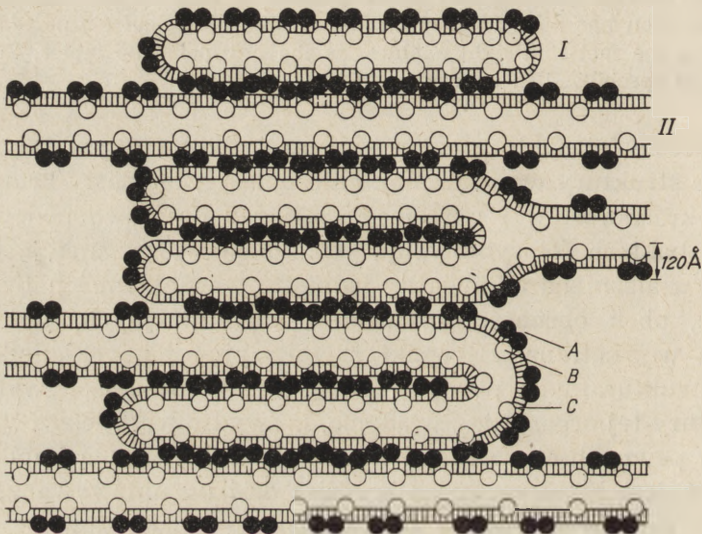
* Doc., dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

* Dr, adiunkt, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

rośliny, to jednak jest on powolniejszy w późniejszych etapach (120) — figury mitotyczne w tkankach merystematycznych roślin etiolowanych, są mniej liczne niż u roślin oświetlanych (16).

I. Wewnętrzne uorganizowanie chloroplastów

Chloroplasty roślin odmiennych stanowisk systematycznych różnią się wielkością i kształtem. Różnice te są szczególnie wyraźne u roślin niższych, natomiast u roślin wyższych dojrzałe chloroplasty mają bardziej ujednolicony, soczewkowaty kształt i średnicę około 4—6 μ , a grubość około 2—3 μ .



Rys. 1. Ułożenie tylakoidów w obszarze granum (wg 75).

I. Tylakoid granum (nieprzechodzący); II. Tylakoid stromy (przechodzący); A. Kompleksy wieloenzymowe, B. Cząstki białkowe 60 Å, C. Warstwa lipidowa 40 Å

W latach 1938—1940 Menke (60, 61) badając strukturę chloroplastów roślin z rodzaju *Anthoceros* w spolaryzowanym świetle nadfioletowym stwierdził, że są one wypełnione tworami o wyglądzie blaszek, nazwanych lamellami, co potwierdzono następnie za pomocą mikroskopu elektronowego również na innych obiektach. Lamelle są tworami dwumembranowymi, przypominającymi wyglądem spłaszczone worki — stąd Menke (62) zaproponował dla nich nazwę „tylakoidy”.

Układ lamelarny jest powszechny w świecie roślinnym. Nawet u prymitywnych przedstawicieli świata roślinnego, na przykład u sinic nie mających plastydów, aparat fotosyntetyczny zbudowany jest z tylakoidów rozłożonych pojedynczo w chromatoplazmie najprawdopodobniej w sta-

łych odległościach (58). U roślin zawierających plastydy podstawą struktury chloroplastów jest układ zamkniętych lamelli zatopionych w substancji podstawowej plastydu czyli w *matrix*; całość otoczona jest podwójną błoną ograniczającą chloroplast od reszty cytoplazmy. Wielopostaciowość układu lamelarnego wynika z różnego ułożenia tylakoidów wewnątrz plastydu. W plastydach glonów tylakoidy ułożone blisko siebie tworzą zespoły, a ilość tylakoidów w zespole jest, przynajmniej w niektórych grupach systematycznych stała (58). W chloroplastach roślin wyższych zawierających skupiska zieleni tak zwane grana (termin użyty po raz pierwszy przez Meyera w 1882 r.) występują dwa podstawowe typy tylakoidów: dłuższe tylakoidy stromy — przebiegające zgodnie z dłuższą osią chloroplastów i krótsze tylakoidy gran — wchodzące w skład jednego granum. Granum powstaje przez charakterystyczne ułożenie tylakoidów w stos (57, 59, 75) względnie przez ich zagięcie lub rozszczepienie (75) (rysunek 1). Wehrmayer (111, 112) zaobserwował u *Spinacia oleracea*, że niektóre tylakoidy tworzące granum, z jednej jego strony wychodzą do obszaru międzygranowego, a z drugiej zaś kończą się na brzegu stosu. Te tylakoidy nazywa on nieprzechodzącymi w odróżnieniu od przechodzących, które są wspólne dla kilku gran.

II. Budowa błon tworzących tylakoidy

Głównymi składnikami budulcowymi tylakoidów są białka i tłuszcze (36, 38, 57). Tylakoidy są nośnikami chlorofilu, którego ilość ocenia się na 8—10% (58).

Zastosowanie w mikroskopii elektronowej nadmanganianu potasu do utrwalania preparatów tkankowych pozwoliło stwierdzić, że błony tworzące tylakoidy posiadają symetryczną trójwarstwową budowę: dwie warstwy ciemne, gęste dla elektronów, obejmują z obu stron warstwę jasną. Obie warstwy zewnętrzne, zbudowane głównie z białek mają grubość 20 Å, zaś warstwa środkowa, zbudowana z lipidów — 35 Å (73). Budowa ta jest podobna w szczegółach do tak zwanej jednostki strukturalnej błon (*membrane unit*) o grubości 75 Å postulowanej przez Robertsona (89) dla całego szeregu różnych błon komórkowych.

W ostatnich latach wielu autorów postulowało modele struktury molekularnej błon tworzących tylakoidy. Omawiają je dokładnie Frey-Wyssling i Mühlethaler (31). Modele te nawiązywały w zasadzie do zaproponowanego przez Danielli i Dawsona w 1935 r. (19) i ogólnie przyjętego modelu, według którego podstawowe składniki błon — białka i lipidy są ułożone warstwowo. Palisady złożone z dwóch cząsteczek fosfolipidów są usytuowane między dwiema warstwami białek, prawdopodobnie globularnych. Białka i lipidy stanowią więc zasadniczo oddzielne, lecz zarazem ciągłe fazy, bowiem polarne grupy fosfo-

lipidów są elektrostatycznie związane z białkami (3). Możliwość udziału hydrofobowych grup lipidów w tworzeniu kompleksów białkowo-lipidowych, ma również znaczenie w kształtowaniu struktury molekularnej błon (3).

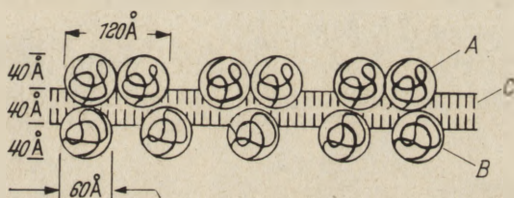
Oczyszczone strukturalne białko tylakoidów z chloroplastów *Allium porrum* zawiera 8 końcowych grup $-NH_2$ i 13 końcowych grup $-COOH$, co wskazuje, że składa się ono z wielu łańcuchów polipeptydowych (63, 64). U roślin różnych grup systematycznych procentowy udział poszczególnych aminokwasów w białku lamelarnym chloroplastów okazał się stosunkowo stały (108, 109). Strukturalne białko tylakoidów rozpuszczając się w bezwodnym kwasie mrówkowym rozpada się na jednorodne podjednostki o stałej sedymentacji 5,9S (110). Skład aminokwasowy takich podjednostek jest identyczny ze składem nierozpuszczonego białka strukturalnego tylakoidów. Istnienie regularnych podjednostek białkowych o jednakowej stałej sedymentacji pozwala wnosić o granularnej organizacji błon tylakoidów.

Spśród ośmiu frakcji tłuszczowców otrzymanych z całej tkanki liściowej, pięć występuje w plastydach (119). Lipidy chloroplastów związane są głównie z układem lamelarnym. Podstawowymi ich składnikami są gliko-, sulfo- oraz fosfolipidy, przede wszystkim fosfatydylo- i dwufosfatydyloglicerol (57). W lipidach chloroplastów szpinaku znaleziono ponad 10 różnych kwasów tłuszczowych, przeważnie nienasyconych. Głównym składnikiem jest kwas linolenowy, a wśród nasyconych przeważa kwas palmitynowy (16). Bogactwo lipidów zawierających grupy tak hydrofilowe jak i hydrofobowe, skłania do poglądu, że określają one strukturę lamelarną chloroplastów. Specjalną rolę według *Benson*a (4) gra tutaj fosfatydylo- i dwufosfatydyloglicerol.

Ogólnie przyjęty pogląd, że błony tworzące tylakoidy mają symetrię jednostki strukturalnej błon zakwestionowali *Park* i *Pon* (84) w 1961 r. Otrzymali oni tylakoidy szpinaku przez rozbicie chloroplastów ultradźwiękami i stwierdzili, że błony tworzące tylakoidy mają budowę granularną. Przedstawiony przez nich model zakłada, że błony te mają strukturę niesymetryczną i są utworzone z dwu różnych warstw — wewnętrznej warstwy powtarzających się elementów granularnych i zewnętrznej warstwy ciągłej, niegranularnej, przy czym całkowita grubość tylakoidu wynosiłaby 160 Å. Częstki granularne nazwane kwantasomami (17), mają wymiary $185 \times 155 \times 100$ Å (83). Podobną koncepcję granularnej struktury tylakoidów przedstawili *Kreutz* i *Menke* (52) na podstawie pomiarów ugięcia promieni X przez tylakoidy. Według nich grubość tylakoidu wynosi około 177 Å, średnica granuli — 36 Å, zaś grubość warstwy lipidowej, na której ułożone są granule — około 35 Å. Należy podkreślić, że po raz pierwszy występowanie powtarzających się tworów granularnych o średnicy 65 Å na powierzchni błon chloroplastowych

stwierdzili już w 1953 r. Frey-Wyssling i Steinmann (33) i przypuszczali, że są to kompleksy chromo-lipoproteidowe. Można by przyjąć, że kompleksy te stanowią najmniejszą, morfologiczną jednostkę fotosyntetyczną, postulowaną uprzednio przez Emersona i Arnoldda (24). Według Koka (51) taka jednostka powinna zawierać 300 cząsteczek chlorofilu, a według Basshama i Shibaty (2) — 480. Park i wsp. (83, 85) przyjmują, że kwantasom jest najmniejszą jednostką strukturalną zdolną do przeprowadzenia reakcji świetlnej fotosyntezy. Zawiera ona 50% substancji białkowych, a resztę stanowią substancje rozpuszczalne w heksanie, acetonie i metanolu. Analiza spektrochemiczna wykazała w nich obecność Mg, Ca, Fe, Mn, Cu, Al i Si. Obliczono przy tym, że na jeden kwantasom przypada około 230 cząsteczek chlorofilu. Ciężar cząsteczkowy kwantasomu wynosi $2,0 \times 10^6$.

Do koncepcji, że błony tylakoidów mają symetrię jednostki strukturalnej błon wracają jednak ostatnio Mühlthaler i wsp. (75). Badali oni strukturę tylakoidów szpinaku kilkoma metodami; między innymi zastosowali nową metodę tak zwaną „freeze etching” opisaną niedawno przez



Rys. 2. Struktura błony tworzącej tylakoid (wg 75).

A. Kompleksy wieloenzymowe; B. Cząstki białkowe; C. Warstwa lipidowa

Moora i wsp. (68, 69, 70). Metoda ta polega na odsublimumaniu lodu ze skrawków mikrotomowych. Powstały w ten sposób rysunek napyla się węglem a platyną i otrzymaną replikę bada w mikroskopie elektronowym. Stosując tę metodę Mühlthaler i wsp. (75) doszli do wniosku, że błony zbudowane są z trzech warstw: środkowej, najprawdopodobniej lipidowej i dwóch warstw granularnych natury białkowej. Granule o średnicy 60 Å są częściowo zanurzone w warstwie lipidowej o grubości 40 Å tak, że całkowita grubość błony wynosi 120 Å (rys. 2). Autorzy są zdania, że nadmanganian potasu, czy czterotlenek osmu zwykle stosowane do utrwalania i kontrastowania preparatów niszczą warstwy granularne przez co zamiast granuli na zdjęciach widoczne są dwie jednorodnie ciemne warstwy leżące symetrycznie po obu stronach jasnej warstwy lipidowej. Zmienia się przy tym grubość błon tylakoidu z 120 Å na 75 Å (20 + 35 + 20 Å) (73). Jednostki granularne obserwowane przez Mühlthaler i wsp. na zewnętrznej stronie błony okalającej tylakoid mają tendencję do tworzenia zespołów złożonych z czterech jednostek. Taki zespół o ciężarze cząsteczkowym około 372 000, odpo-

wiadałby rozmiarami kwantasomowi. Również Park (82) stwierdza, że kwantasom zbudowany jest z czterech podjednostek granularnych, których średnica wynosi około 90 Å. Uważa on, że kwantasomy mogą tworzyć bądź układy krystaliczne, stanowiące najwyższą uorganizowaną formę tylakoidów, lub zespoły nieuporządkowane, przy czym rodzaj układu, na przykład w chloroplastach liści szpinaku, zależy od warunków oświetlenia. U roślin krótkiego dnia, na przykład z rodzaju *Pharbitis* układ kwantasomów jest, jak się wydaje, niezależny od warunków oświetlenia.

Granularną strukturę błony tylakoidów stwierdzono także u roślin niższych, na przykład u glonu *Oscillatoria rubescens*, nie mającego chloroplastów. Większość granuli wynosiła około 50 Å, a błony tworzące tylakoidy miały symetrię jednostki strukturalnej błon (43).

W ciągu ostatnich dziesięciu lat zebrano liczne dowody, że również inne błony komórkowe zbudowane są z powtarzających się uorganizowanych jednostek, tworzących kompleksy enzymatyczne (39). Tak na przykład błony mitochondriów zbudowane są z powtarzających się cząstek elementarnych (EP), które rozmiarami i ciężarem cząsteczkowym odpowiadają kwantasomom chloroplastów, a są kompleksami enzymów łańcucha oddechowego (27, 28).

W ostatnich latach doniesiono o innym rodzaju tworów granularnych w chloroplastach (36, 65, 66) mianowicie rybosomach, zlokalizowanych w *matrix*.

III. Wpływ światła białego na rozwój struktury plastydów

Pozbawione chlorofilu plastydy roślin wyższych hodowanych w ciemności są uboższe w białka, mają mniejsze rozmiary i bardziej kuliste kształty niż plastydy roślin hodowanych w normalnych warunkach oświetlenia (21). Plastydy glonu *Euglena gracilis* zwiększają na świetle pulę własnych białek (12, 13). Plastydolema etiolowanych plastydów jest znacznie bardziej krucha niż chloroplastów (56). Stanowi to niewątpliwie odbicie pewnych różnic w składzie chemicznym obu tych form plastydów, najbardziej różnią się one jednak strukturą wewnętrzną. Jak stwierdzili Hodge i wsp. (42) za pomocą mikroskopu elektronowego plastydy etiolowanej kukurydzy nie mają typowej dla chloroplastów, warstwowej struktury wewnętrznej. U bakterii fotosyntetyzujących w warunkach zaciemnienia zmienia się ilość zarówno barwników asymilacyjnych jak i chromatoforów (kuliste twory o średnicy około 1100 Å), stanowiących aparat fotosyntetyczny (81, 91). Jednakże w warunkach ograniczonego dostępu tlenu bakterie te syntetyzują barwniki asymilacyjne i tworzą chromatofory nawet w ciemności (18). Według Fasse-Franziskett (26) metamorfoza plastydów — ich rozwój ze stadiów proplastydów, czyli zawiązków plastydialnych — nie jest skorelowany z rozwojem całych komórek, zależy natomiast od oświetlenia. Świa-

tło wywiera więc niejako podwójny wpływ na aparat fotosyntetyczny roślin; na skład chemiczny plastydów, co jak przyjmuje S i s s a k i a n (99) wynika z przesunięcia równowagi procesów katabolicznych i anabolicznych na korzyść tych ostatnich i na proces różnicowania się struktury organelli. Obydwa te efekty są ze sobą ściśle związane i współzależne. W związku z tym w badaniach nad wpływem światła na rozwój plastydów wyróżnić można dwa główne kierunki: morfologiczny i biochemiczny, które kolejno omówimy.

Pod wpływem światła w komórkach roślin hodowanych uprzednio w ciemności, zwiększa się ilość plastydów (21). Rosną przy tym ich rozmiary, zmienia się ich kształt z kulistego na dyskoidalny oraz barwa ze słomkowo-żółtej na zieloną (21, 25, 34, 56, 121). Zmiana barwy wskazuje na syntezę chlorofilu. Komórki glonów odzyskują normalną ilość plastydów w ciągu 36—48 godzin po oświetleniu (98). Gdy natomiast oświetlane komórki na przykład *Euglena gracilis* umieści się w ciemności, wówczas chloroplasty powoli zmniejszają swoje rozmiary (25) i tracą układ lamelarny (25, 118). Po ponownym oświetleniu układ ten wykształca się z powrotem w ciągu około 72 godzin (118), przy czym chlorofil pojawia się zanim utworzy się układ tylakoidów. Prawdopodobnie dzieje się tak również podczas metamorfozy plastydów z zawiązków proplastydialnych, w normalnych warunkach wzrostu roślin na świetle.

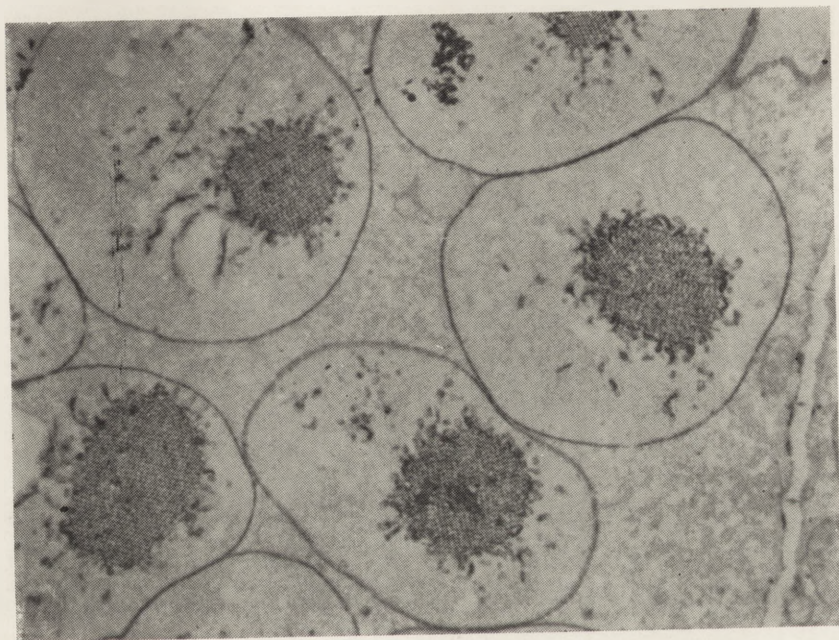
H o d g e i wsp. (42) zaobserwowali w plastydach etiolowanej kukurydzy zamiast systemu lamelarnego charakterystyczne twory pęcherzykowate. Uznali oni, że jest to etap rozwoju systemu lamelarnego i zaproponowali, dla całego układu nazwę „ciało prolamelarne” (*prolamellar body*). Twory te przyominały niekiedy kryształki obserwowane w młodych, niedojrzałych plastydach przez H e i t z a (40) i L e y o n a (53). Geneza ciała prolamelnego nie jest jasna. Zdaniem niektórych autorów (53) mogłoby ono powstawać w formie kryształów H e i t z a - L e y o n a przez wykrystalizowywanie pewnych rejonów stromy, zdaniem innych (71, 74) — przez wpuklenie otoczki plastydialnej do wnętrza plastydu i następne odłączanie się drobnych pęcherzyków. Najczęściej ciało prolamelarne stanowi zespół mniej lub bardziej regularnie ułożonych podługowatych pęcherzyków. M u r a k a m i (76) uważa, że czym dalej posunięty jest rozwój plastydu, tym bardziej regularny jest sposób ułożenia pęcherzyków ciała prolamelnego. Pod wpływem światła poszczególne pęcherzyki oddzielają się, po czym układają się w koncentryczne warstwy tworząc tak zwane struktury pierścieniowe (23), które można uważać za wczesny etap rozwoju tylakoidów. Następnie drogą fuzji powstawałyby system rurczek, przekształcających się ostatecznie w tylakoidy stromy i gran (46). Ostatnio zaobserwowano (1) zmiany struktury ciała prolamelnego pod wpływem różnych warunków oświetlenia u białych i słabo-zielonych mutantów kukurydzy. Po zaciemnieniu

rośliny, powstałe uprzednio w plastydach rureczki, pękają i wytwarzają się pęcherzyki. Ten rodzaj dezintegracji strukturalnej nasuwa myśl, że brak światła nie tylko hamuje rozwój plastydu, ale nawet uwstecznia jego organizację. Jednakże ciała prolamelarne obserwowano nawet w plastydach słabiej oświetlanych narządów roślin, jak na przykład wewnętrznych liści pąków względnie młodych liści roślin jednoliściennych tkwiących między podstawami liści starszych (71, 74).

Szczególnie dokładne badania nad wyglądem i strukturą ciała prolamelarne prowadzili Klein i wsp. (23, 45, 46, 47, 48, 50). Ich zdaniem ciało prolamelarne plastydów etiolowanych liści fasoli przedstawia się jako trójwymiarowa siateczka połączonych ze sobą pęcherzyków rurkoksztalnych, których wewnątrz jest bardziej gęste niż przestrzeń międzypęcherzykowa. Elementy tego tworzywa są dość ściśle ze sobą połączone, na co wskazuje fakt, że autorom udało się otrzymać wolne ciało prolamelarne, bez otaczającej je stromy i otoczki plastydialnej. Ciało prolamelarne wypełniać może — szczególnie w ostatnich stadiach swego rozwoju — całe wnętrze plastydu, choć niekiedy ma ono jedynie niewielkie rozmiary (50). Na rysunku 3 przedstawiono zdjęcie ciała prolamelarne w mikroskopie elektronowym.

Rozwój systemu tylakoidów jest ściśle uzależniony od końcowych etapów syntezy chlorofilu. W letalnych mutantach jęczmienia pozbawionych chlorofilu (72, 114, 115), organizacja plastydu nawet na świetle zatrzymana jest w stadium ciała prolamelarne. Podobnie bezbarwne lub słabo zabarwione plastydy plamistych odmian roślin z rodzaju *Liriope* wytwarzają zamiast tylakoidów ciała prolamelarne o mniej uporządkowanym ułożeniu pęcherzyków niż w ciele prolamelarne plastydów roślin etiolowanych (76). Zakłócenie syntezy chlorofilu przez streptomycynę (98) lub podwyższoną temperaturę (10, 11) również hamuje nieodwracalnie rozwój tylakoidów.

Są dane, że nowosyntetyzowany chlorofil jest w plastydzie w formie protochlorofilidu (106, 117) i dopiero na świetle jego podwójne wiązanie, znajdujące się prawdopodobnie w pozycji 7 i 8 układu porfirynowego (8, 101), ulega redukcji, a powstały chlorofilid łącząc się z fitolem daje chlorofil (46, 117). W plastydach etiolowanej *Eugleny* chlorofil nie występuje w wykrywalnych ilościach — stwierdzono jedynie protochlorofilid (78). Jednakże w liściach etiolowanej fasoli 20% protochlorofilidu jest połączone z fitolem (101). Opisano też mutant glonu *Chlamydomonas*, syntetyzujący chlorofil nawet w ciemności (90). Nieznany jest wprawdzie donator wodoru dla odbywającej się na świetle redukcji protochlorofilidu, nie jest jednak wykluczone, że redukcja ta przebiega jednocześnie z utlenianiem białka związanego z chlorofilidem, co może doprowadzić do pewnych zmian struktury tego białka zapoczątkowujących zmiany strukturalne całego plastydu (48).



Rys. 3. Elektrono-mikroskopowe zdjęcie ciała prolamelarnego etiolowanych liści fasoli 14 000 x (wg. 48).

Fitylacja powstałego na świetle chlorofilidu, odbywająca się prawdopodobnie przy udziale chlorofilazy (14, 117), zaczyna się po upływie około 1 godziny od rozpoczęcia naświetlania rośliny (15). W ciągu pierwszych 5 godzin oświetlania zmiany struktury plastydu odbywają się bez poważniejszych zmian zawartości chlorofilu (48). Wskazywałoby to, że po przekształceniu obecnego w etiolowanym plastydzie protochlorofilidu w chlorofil zająć muszą jakieś dodatkowe procesy zapoczątkowujące syntezę protochlorofilidu (78). Po 24-o godzinnym oświetlaniu roślin światłem o słabym natężeniu (około 20 lx) w temperaturze 26° w plastydach obecny jest chlorofilid, a z ciała prolamelnarnego powstają struktury pierścieniowe (23, 46). Oświetlenie światłem o natężeniu około 4000 lx powoduje pojawienie się w plastydach chlorofilu, przy czym szybko powstają tylakoidy (46). Podobną sekwencję zjawisk zaobserwowano podczas intensywnego oświetlania roślin uprzednio etiolowanych w temperaturze 3° (45). Klein i Bogorad (47) podsumowując dotychczasowe obserwacje stwierdzają, że po oświetleniu roślin etiolowanych można zaobserwować trzy następujące po sobie fazy rozwojowe plastydów. W fazie I gwałtownie rozluźnia się uporządkowany system rurkokształtnych elementów ciała prolamelnarnego tworzących centrum i powstają pojedyncze wydłużone pęcherzyki, a równocześnie odbywa się fotokonwersja protochlorofilidu w chlorofilid. W fazie II uformowane, wydłużone pęcherzyki rozprzestrzeniają się w stromie plastydu i tworzą wiązki układające się w pętle, które następnie przekształcają się w struktury pierścieniowe. Zanikowi ciała prolamelnarnego towarzyszy wstrzymanie syntezy chlorofilu, (faza „lag”). W końcowej III fazie rozwojowej plastydu rozpoczyna się gwałtowna synteza chlorofilu i powstają tylakoidy stromy i gran.

Butler (14) przypuszcza, że fitylacja chlorofilidu jest niezbędnym procesem dla powstawania tylakoidów, a według Virginia i wsp. (107) również powstawanie gran charakterystycznych dla chloroplastów roślin wyższych, odbywa się równolegle z syntezą chlorofilu.

Powstaje pytanie, dlaczego przyłączenie fitolu do chlorofilidu może mieć tak doniosłe znaczenie dla rozwoju systemu tylakoidów plastydu? Jest prawdopodobne, że apolarność ogona fitolowego cząsteczki chlorofilu umożliwiała lepsze jej rozpuszczenie w substancjach lipidowych plastydu. Przyjmując dawne koncepcje o warstwowej budowie tylakoidów (np. Frey-Wysslinga (29)) pasma białek i lipidów byłyby połączone monowarstwowo ułożonymi między nimi cząsteczkami chlorofilu. Jednakże wobec powszechnie dziś przyjętego poglądu o granularnej strukturze błon tylakoidów, gdzie poszczególne granule (kwantasomy) zawierają chlorofil i stanowią kompletne zespoły enzymatyczne, odpowiedź na postawione pytanie jest trudna.

Podobnie jak chlorofil stanowi integralny składnik tylakoidów, warunkujący ich strukturę, tak prekursorzy chlorofilu są prawdopodobnie

związane z ciałem prolamelarnym. Wykazano, że wyizolowane „wolne” ciało prolamelarne jest zdolne do fotokonwersji protochlorofilidu *in vitro*, bez dodatku innych frakcji komórkowych (50).

Obok chlorofilu również barwniki karotenoidowe są składnikami tylakoidów (kwantasomów) (83). Zdaniem Butlera (15) dopiero odpowiednie usytuowanie tych barwników w bliskim sąsiedztwie cząsteczek chlorofilu na terenie tylakoidów pozwala na odpowiednią wydajność procesu przenoszenia energii w czasie fotosyntezy. Badania nad wydajnością procesu przenoszenia energii mogą być zatem swojego rodzaju miarą i sprawdzianem stopnia rozwoju substruktury plastydu. Jednakże barwniki karotenoidowe nie odgrywają, jak się wydaje, poważniejszej roli we wczesnych etapach rozwoju ciała prolamelarnego, chociaż ich synteza zachodzić może w ciemności. Ich widma absorpcyjne różnią się od widma protochlorofilu, a zatem trudno było przyjąć, że biorą one udział w fotokonwersji tego prekursora chlorofilu (78).

IV. Wpływ światła o różnej długości fali na rozwój plastydów

Dotychczas omawialiśmy wpływ światła białego na rozwój plastydów. Badano również wpływ światła o określonym zakresie długości fal na rozwój substruktury plastydów. Fasse-Franziskett (26) stwierdziła, że światło fioletowe bardziej przyspiesza rozwój plastydów roślin etiolowanych niż światło czerwone. Bergfeld zaobserwował, że światło niebieskie ma największy morfogenetyczny wpływ na rozwój gametofitu paproci *Dryopteris filix* (5), powodując najintensywniejszą syntezę białek, głównie białek strukturalnych plastydów i szybkie zwiększanie się ilości plastydów w komórce oraz ich rozmiarów (6). Światło czerwone natomiast nie wpływało w poważniejszy sposób na intensywność syntezy białek plastydialnych i wzrost samych plastydów (5, 6). Nishimura i Huzisige (78) stwierdzili u *Euglena*, że widmo działania dla syntezy chlorofilu z protochlorofilidu jest zbliżone do widma absorpcyjnego chlorofilu (maksimum przy 650 m μ , a minimum — przy 500—550 m μ). Klein i wsp. (48) zauważyli, że dla przemiany protochlorofilidu w chlorofilid i do wywołania zmian strukturalnych w plastydach wystarcza monochromatyczne światło czerwone o długości fali 655 m μ i sumarycznej energii 120—280 ergów/mm². Natomiast światło o długości fali 683 m μ i tym samym poziomie energetycznym nie wywołuje żadnych zmian strukturalnych plastydów i powoduje tylko częściową fotokonwersję barwnika. Światło podczerwone o długości fali 700—730 m μ nawet na poziomie energetycznym około 2500 ergów/mm² nie zmienia struktury ciała prolamelarnego. Zatem światło o dłuższych falach ma mniejszy wpływ na rozwój struktury plastydów niedojrzałych funkcjonalnie, chociaż jest odpowiedniejsze dla przemian fotosyntetycznych, naj-

wyższą wydajność fotosyntezy uzyskuje się bowiem w świetle czerwonym (37).

Interesujące wyniki otrzymano badając rozwój plastydów pod wpływem światła nadfiołkowego. Jak wynika z prac Schiffa i wsp. (54, 92, 93, 94) oraz Gibora i Granicka (35), światłoczułe czynniki kierujące rozwojem plastydu znajdują się poza jądrem komórkowym — w cytoplazmie, a być może w samym plastydzie. Prace tych autorów mogą być uważane za rozwinięcie doświadczeń De Deken - Grenson i Godtsa (22), którzy zauważyli, iż po naświetleniu kolonii glonu *Euglena gracilis* światłem nadfiołkowym pojawiają się trzy typy populacji komórek — białe, zielone i mieszane. Schiff i wsp. (54, 92) badając ten sam obiekt wykazali, że subletalne dawki promieni o długości fali 254 m μ powodują powstawanie dziedzicznie białych, bezchlorofilowych komórek niezdolnych do zazielenienia. W naświetlanych koloniach niektóre komórki zachowują jednak zdolność do wykształcania chloroplastów po fotoreaktywacji światłem białym. Najwydatniejszą fotoreaktywację uzyskiwano w świetle niebieskim, a nie stwierdzono jej zupełnie w świetle czerwonym. Dawka promieni UV potrzebna do powstania tej samej ilości kolonii dziedzicznie białych jest mniejsza w przypadku naświetlania komórek etiolowanych. Przyczyną tego mogłaby być jakaś zmiana chemiczna wrażliwego na to promieniowanie rejonu plastydu (receptora) zachodząca w czasie rozwoju i zzielenienia lub zasłonięcie owego receptora przez rozwijającą się pod wpływem normalnego oświetlenia substrukturę plastydu; być może receptor znajdujący się częściowo lub całkowicie poza plastydem etiolowanym zostaje wbudowany do wnętrza zzieleniejącego plastydu i zasłonięty przez jego substruktury. Schiff i wsp. (54) są zdania, że wrażliwe na światło nadfiołkowe receptory są zbudowane z nukleoproteidów. Badając bowiem widmo działania światła dla inaktywacji plastydów etiolowanej *Eugleny*, czyli utraty przez nie zdolności tworzenia chlorofilu, stwierdzili dwa szczyty: przy 260 m μ i mniejszy przy 280 m μ .

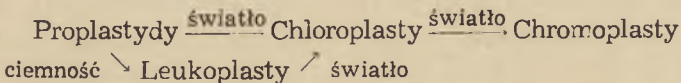
Gibor i Granick (35), za pomocą aparatu mikrowiązkowego naświetlali światłem nadfiołkowym wybiórczo jądra komórkowe i rejony cytoplazmatyczne komórek *Eugleny*. W pierwszym przypadku nie stwierdzali bielenia komórek potomnych, w drugim natomiast — potomne komórki nie miały chlorofilu. Tym samym poparli oni tezę Schiffa i wsp. (54, 92, 93, 94) o istnieniu w cytoplazmie czułych na światło nadfiołkowe receptorów, kierujących rozwojem plastydu. Czułość tych receptorów zsynchronizowana jest z podziałem komórek i wzrasta tuż przed podziałem (86); w czasie podziału — komórki glonu są mniej wrażliwe. Być może wynika to ze stanu morfologicznego i fizjologicznego naświetlanego „celu”, którym, nie jest wykluczone, są nukleoproteidowe cząstki receptorowe postulowane przez Schiffa i wsp. (54, 92, 93, 94).

V. Wzajemne przekształcenia plastydów

Światło indukujące rozwój systemu tylakoidów plastydu wpływa też na proces wzajemnych przekształceń różnych fenotypowych odmian tej organelli to znaczy chloroplastów, leukoplastów, bezbarwnych amyloplastów zawierających skrobię zapasową (które występują głównie w korzeniach i nie mają tylakoidów (44)) oraz chromoplastów czyli barwnych plastydów, pozbawionych wyżej uorganizowanej wewnętrznej struktury i nie zawierających chlorofilu.

Pozbawione tylakoidów leukoplasty pod wpływem światła mogą przekształcać się w chloroplasty. Nie mają tej zdolności leukoplasty zawierające dużą ilość białek i olejów tak zwane proteinoplasty i elaioplasty. W ciemności zaś, chloroplasty mogą tracić chlorofil i przekształcać się w leukoplasty. Niekiedy leukoplasty przekształcają się w chromatoplasty. Frey - Wyssling (30) wyróżnia trzy typy chromoplastów: — zawierające krystaliczne karotenoidy (w korzeniach marchwi), zawierające ziarna żółtych barwników — ksantofili (w żółtych płatkach kwiatowych) i zawierające liczne wiązki barwników uformowanych w kształcie nitki (często spotykane w owocach roślin z rodziny psiankowatych). Dwa ostatnie typy chromoplastów stanowią zdegenerowany typ plastydów z dużą zawartością lipidów.

W latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia Schimper (95) wysunął przypuszczenie, że każda z wymienionych odmian fenotypowych plastydów może przekształcać się w pozostałe, bez względu na stopień uorganizowania ich substruktur (hipoteza o politropowym charakterze transformacji plastydów). W tym ujęciu nawet chromoplasty, mające jedynie prymitywną strukturę wewnętrzną, mogłyby w warunkach odpowiedniego oświetlenia przekształcać się w chloroplasty. Nie zdawano sobie wówczas sprawy ze skomplikowanego charakteru procesu rozwoju struktury plastydów, której najwyższą formą ewolucyjną są granowe chloroplasty roślin wyższych. W 1955 roku Frey - Wyssling, Ruch i Berger (32) przedstawili teorię o monotropowym charakterze przemian plastydów, którą można ująć w następujący schemat:



Proplastidy czyli niewielkich rozmiarów plastidy (25) we wczesnych stadiach rozwojowych, występujące w tkankach merystematycznych (wzrostowych) mogą, w zależności od warunków oświetlenia, przekształcać się bądź w chloroplasty, bądź w leukoplasty, przy czym z leukoplastów mogą również powstawać plastidy zielone. Chloroplasty przy braku światła, tracą układ tylakoidów, a równocześnie nagromadzają skrobię. Zmiany takie obserwowali ostatnio Ohad, Siekevitz i Palade

u glonu *Chlamydomonas reinhardi* (80). Chromoplasty byłyby starczą, zdegenerowaną strukturalnie i funkcjonalnie formą plastydów. Zdaniem Frey - Wyslīga i wsp. (23) przekształcenie chromoplastów w uorganizowane strukturalnie plastydy nie jest możliwe. Silne i długotrwałe oświetlanie niewątpliwie przyczynia się w pewnej mierze do przemian degeneracyjnych w chloroplastach, co uwidacznia się choćby w fackie żółknięcia liści w okresie jesiennym.

VI. Molekularne mechanizmy formowania się struktury chloroplastów

Podstawowa rola światła w procesie rozwoju plastydów związana jest ze zmianami ich metabolizmu. Światło wpływa na procesy fizyko-chemiczne wywołujące takie zjawiska jak zmiany objętości plastydów (121), reagowanie układów białek kurczliwych tych organelli i jak zmiany w transporcie jonów metalicznych oraz gromadzenie jonów wodorowych (20)*.

Rozwój systemu tylakoidów pod wpływem światła wymaga dopływu białek i lipidów jako podstawowego budulca. Jak wspomnieliśmy, w plastydach roślin etiolowanych po oświetleniu dochodzi do znacznego zwiększenia syntezy i nagromadzenia białek (10, 11, 12, 13, 21, 88). W proces biosyntezy białek wprzęgnięte zostają, obecne w plastydach, takie układy jak enzymy aktywujące aminokwasy i rybosomy (36). Dojrzałe chloroplasty wyposażone w kompletny system tylakoidów, warunkujący ich zdolność do fotosyntezy, dysponują własną pulą substratów tej syntezy — między innymi aminokwasów. Zatem obserwuje się interesującą współzależność: rozwój układu tylakoidów, wymagający dopływu białek, doprowadza do wykształcenia się struktury, bez której nie byłby możliwy odpowiedni dla rozwijającej się komórki roślinnej poziom biosyntezy białek.

Dla utworzenia się tylakoidów niezbędny jest również wzmoczony dopływ lipidów. To zagadnienie wymaga jednak bardziej dokładnych badań niż dotychczasowe. Według B e n s o n a (3) fotosyntetyczne tworzenie lipidów może okazać się czynnikiem tak krytycznym dla rozwoju systemu tylakoidów w plastydach, jak jest nim fitylacja chlorofilidu. W trakcie tworzenia się systemu tylakoidów synteza cukrowców i lipidów w plastydzie ześrodkowywałaby się głównie na wytwarzaniu fosfatydyloglicerolu i galaktolipidów, podstawowych składników lipoproteidowych tylakoidów. Porównanie ilościowe i jakościowe lipidów w proplastydach i chloroplastach liści fasoli wskazuje na znaczny wzrost ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych w plastydach oświetlanych (77). U *Chlorella* oświetlanie komórek w nieobecności CO₂ wzmaga syntezę lipidów i magazynowanie energii, w wyniku czego dochodzi do nagromadzenia fosfatydyloglicerolu (4).

* Bogaty zestaw literatury na ten temat podali ostatnio L. P a c k e r, P. A. S i e g e n t h a l e r *Int. Rev. Cytol.* 20, 97 (1966).

Jak powiedzieliśmy, rozwój plastydów roślin etiolowanych jest związany z przekształcaniem protochlorofilidu w chlorofil. W związku z tym istotne jest spostrzeżenie, że w roślinach etiolowanych poddanych krótkotrwałemu działaniu światła białego lub bliskiej czerwieni, a następnie umieszczonych ponownie w ciemności, znacznie zwiększa się ilość białek i lipidów w plastydach, nie zachodzi jednak synteza chlorofilu i nie wykształcają się grana (56).

Ostatnio prowadzone są liczne badania nad udziałem w kontroli wzrostu i rozwoju roślin niebieskiego barwnika — fitochromu, który można uważać za osobliwy enzym, gdyż jego aktywność zależy od światła (97). M o h r i wsp. (113) uważają, że właśnie ten barwnik może być odpowiedzialny za uzależniony od światła ale niezależny od fotosyntezy rozwój roślin czyli fotomorfogenezę (67). Zdaniem M o h r a i wsp. (113) fitochrom kontroluje syntezę RNA i białek. U gorczycy (*Sinapis alba* L.) mianowicie, przy syntezie jednej z dwu form tego barwnika tak zwanego fitochromu P_{730} pod wpływem światła czerwonego następuje duży wzrost syntezy białka i RNA. Efekt ten hamowany jest przez światło dalekiej czerwieni — wówczas aktywna forma fitochromu P_{730} przekształcała się w formę nieczynną — P_{660} (wskaźniki oznaczają maksima absorpcyjne obu form). Wpływ fitochromu na syntezę RNA i białek nie jest całkowicie wyjaśniony. H o c k i M o h r (41) wysuwają hipotezę, że fitochrom działa poprzez różnicową aktywację genu. Natomiast według K l e i n a i wsp. (48) udział tego barwnika w procesie różnicowania się struktury plastydu, choć niewykluczony, jest mało prawdopodobny. W procesie morfologicznego dojrzewania plastydów roślin etiolowanych po naświetleniu rośliny pewną rolę mogą grać kwasy nukleinowe. Obecność RNA i DNA w plastydach roślin zielonych i etiolowanych stwierdzana była wielokrotnie (36, 102, 103). Wykazano tu, że aktynomycyna hamująca syntezę RNA zależną od DNA, hamuje także proces syntezy chlorofilu (9, 55, 87, 96), a zatem dla syntezy chlorofilu w plastydzie niezbędna byłaby synteza RNA zależna od DNA. Być może chodziłoby tu o syntezę informacyjnego RNA (104). Natomiast synteza DNA prawdopodobnie nie jest warunkiem formowania chlorofilu, ponieważ 5-fluorodezoksyurydyna zakłócająca syntezę DNA, w przeciwieństwie do 5-fluorouracylu zakłócającego syntezę RNA, nie wpływa hamująco na syntezę tego barwnika u *Euglena* (100). Mitomycyna C nie wpływa również na tę syntezę (96). Według v a n N o o r t a i W a l l a c e 'a (79) synteza DNA jest niezbędna dla syntezy chlorofilu u fasoli rosnącej w warunkach niedoboru żelaza; wówczas bowiem 5-fluorouracyl i 5-fluorodezoksyurydyna hamowały syntezę chlorofilu, którą można było przywrócić przez dodanie tymidyny lecz nie urydyny. S i s s a k i a n i wsp. (7) badali szerzej rolę nowosyntetyzowanego DNA i RNA w procesie powstawania chlorofilu w czasie zienlenia plastydów etiolowanej fasoli. Okazało się, że aktynomycyna

D w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ całkowicie hamuje syntezę chlorofilu. Syntezę tę znacznie obniżają 2-tiouracyl i 8-azaguanina. Urydyna — w przeciwieństwie do tymidyny — zmniejsza efekt hamujący 2-tiouracylu, co wskazywałoby na konieczność syntezy RNA dla tworzenia się chlorofilu. Mitomycyna blokująca syntezę DNA u *Escherichia coli*, w stężeniu 200—300 $\mu\text{g/ml}$ w znacznym stopniu choć nie całkowicie, hamowała syntezę chlorofilu. Zatem zahamowanie syntezy RNA hamuje całkowicie syntezę chlorofilu, natomiast przy zablokowanej syntezie DNA następuje poważne ale tylko częściowe zahamowanie syntezy tego barwnika. Należy przypomnieć, że po oświetleniu rośliny następuje duży wzrost ilości plastydów w komórce, co jest prawdopodobnie wynikiem podziałów już istniejących proplastydów. Zahamowanie syntezy DNA hamuje być może podziały proplastydów, które przekształcają się pod wpływem światła w dojrzałe chloroplasty, przy czym nie podlegają jednak podziałom i w rezultacie ilość chloroplastów w tkankach roślin zielonych jest równa ilości proplastydów w tkance etiolowanej. Zahamowanie zaś syntezy RNA hamuje proces przekształcania się plastydów etiolowanych w chloroplasty (7). Decydujące byłoby tu światło, indukujące syntezę RNA i DNA. Jaki jest jednak mechanizm tej indukcji na razie nie wiadomo.

LITERATURA

1. Bachmann M. D., Robertson D. S., Bowen C. C., *Am. J. Botany* **53**, No 6, Part 2, 603 (1966).
2. Bassham J. A., Shibata K., w *Research in Photosynthesis*, wyd. H. Gaffron et al., Interscience Publishers, New York, London 1957, str. 366.
3. Benson A. A., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **15**, 1 (1964).
4. Benson A. A., Vth Intern. Congress of Biochemistry, Moscow 1961, Preprint Nr 66.
5. Bergfeld R., *Z. Naturforsch.* **18b**, 328 (1963).
6. Bergfeld R., *Z. Naturforsch.* **19b**, 1076 (1964).
7. Beridze T. G., Odintsova M. S., Cherkashina N. A., Sissakian N. M., Doniesienie osobiste, IEG 7, memo no 323 (1966).
8. Boardman N. K., *Biochim. Biophys. Acta* **62**, 63 (1962).
9. Bogorad L., Jacobson A. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 113 (1964).
10. Brawerman G., Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 164 (1959).
11. Brawerman G., Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 172 (1959).
12. Brawerman G., Pogo A. O., Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 326 (1962).
13. Brawerman G., Pogo A. O., Chargaff E., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 418 (1961).
14. Butler W. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **92**, 287 (1961).
15. Butler W. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2**, 419 (1960).
16. Butler R. D., Lane G. R., *J. Linn. Soc. Bot. (London)* **56**, 170 (1959) cyt. wg 97.
17. Calvin M., *Science* **135**, 879 (1962).
18. Cohen-Bazire G., Kunisawa R., *J. Cell. Biol.* **16**, 401 (1963).
19. Danielli J. F., Davson H., *J. Cellular Comp. Physiol.* **5**, 495 (1935).

20. Deamer D. W., Packer L., *Fed. Proc.* **25**, 225 (1966).
21. De Deken-Grenson M., *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 203 (1954).
22. De Deken-Grenson M., Godts A., *Exptl. Cell. Res.* **19**, 376 (1960).
23. Eilam Y., Klein S., *J. Cell. Biol.* **14**, 169 (1962).
24. Emerson R., Arnold A., *J. Gen. Physiol.* **16**, 191 (1931).
25. Epstein H. T., Boy de la Tour E., Schiff J. A., *Nature* **185**, 825 (1960).
26. Fasse-Franziskett U., *Protoplasma* **45**, 194 (1955).
27. Fernández-Morán H., *Circulation* **26**, 1039 (1962).
28. Fernández-Morán H., Oda T., Blair P. V., Green D. E., *J. Cell. Biol.* **22**, 63 (1964).
29. Frey-Wyssling A., *Protoplasma* **29**, 279 (1937).
30. Frey-Wyssling A., *Recent Advances in Botany*, The University of Toronto Press, s. 737, 1961.
31. Frey-Wyssling A., Mühlethaler K., *Ultrastructural Plant Cytology*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam-London-New York, 1965.
32. Frey-Wyssling A., Ruch F., Berger X., *Protoplasma* **45**, 97 (1955).
33. Frey-Wyssling A., Steinmann E., *Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zuerich* **98**, 20 (1953).
34. Gibbs S. P., *J. Cell Biol.* **15**, 343 (1962).
35. Gibor A., Granick S., *J. Cell Biol.* **15**, 599 (1962).
36. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Postępy Biochem.* **10**, 491 (1964).
37. Górski F., *Fizjologia Roślin*, Tom 1, PWN, Warszawa, 1962.
38. Granick S., w *The Cell*, red. J. Brachet, E. A. Mirsky Vol. II, Academic Press, New York and London, 1961, str. 489.
39. Green D. E., Pardue J. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **55**, 1295 (1966).
40. Heitz E., *Exptl. Cell Res.* **7**, 606 (1954).
41. Hock B., Mohr H., *Planta* **61**, 209 (1964).
42. Hodge A. J., McLean J. D., Mercer F. V., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 597 (1956).
43. Jost M., *Arch. Mikrobiol.* **50**, 211 (1965).
44. Kawamatsu S., *Experientia* **17**, 313 (1961).
45. Klein S., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **8**, 529 (1960).
46. Klein S., *Nature* **196**, 992 (1962).
47. Klein S., Bogorad L., *J. Cell Biol.* **22**, 443 (1964).
48. Klein S., Bryan G., Bogorad L., *J. Cell Biol.* **22**, 433 (1964).
49. Klein S., Poljakoff-Mayber A., *Exptl. Cell Res.* **24**, 143 (1961).
50. Klein S., Poljakoff-Mayber A., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **11**, 433 (1961).
51. Kok B., Businger J. A., w *Research in Photosynthesis*, red. H. Gaffron et al., Interscience Publishers, New York, London 1957, str. 357.
52. Kreutz W., Menke W., *Z. Naturforsch.* **17b**, 675 (1962).
53. Leyon H., *Exptl. Cell Res.* **7**, 609 (1954).
54. Lyman H., Epstein H. T., Schiff J. A., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 301 (1961).
55. Mc Calla D. R., Allan R. K., *Nature* **209**, 504 (1964).
56. Mego J. L., Jagendorf A. T., *Biochim. Biophys. Acta* **53**, 237 (1961).
57. Menke W., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **13**, 27 (1963).
58. Menke W., *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **77**, 340 (1965).
59. Menke W., *Experientia* **16**, 537 (1960).
60. Menke W., *Kolloid Z.* **85**, 256 (1938).
61. Menke W., *Naturwissenschaften* **28**, 158 (1940).
62. Menke W., *Z. Naturforsch.* **16b**, 334 (1961).

63. Menke W., Jordan E., *Z. Naturforsch.* **14b**, 234 (1959).
64. Menke W., Jordan E., *Z. Naturforsch.* **14b**, 393 (1959).
65. Mikulska E., Odintsova M. S., Sisakian N. M., *Biochimija* **27**, 1061, (1962).
66. Mikulska E., Odincowa M. S., Sissakian N. M., *Naturwissenschaften* **49**, 549 (1962).
67. Mohr H., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **13**, 465 (1962).
68. Mohr H., *J. Ultrastructure Res.* **2**, 393 (1959).
69. Mohr H., *Z. Zellforsch.* **62**, 546 (1964).
70. Moor H., Mühlethaler K., Waldner H., Frey-Wyssling A., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**, 1 (1961).
71. Mühlethaler K., *Fortschr. Bot.* **21**, 46 (1959).
72. Mühlethaler K., *Fortschr. Bot.* **22**, 49 (1960).
73. Mühlethaler K., *Z. Wiss. Mikr.* **64**, 444 (1960).
74. Mühlethaler K., Frey-Wyssling A., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**, 507 (1959).
75. Mühlethaler K., Moor H., Szarkowski J. W., *Planta* **67**, 305 (1965).
76. Murakami S., *J. Electronmicroscopy* **9**, 91 (1960).
77. Newman D. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 179 (1962).
78. Nishimura M., Huzisige H., *J. Biochem. (Japan)* **46**, 225 (1959).
79. Noort D. van, Wallace A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **10**, 109 (1963).
80. Ohad I., Siekevitz P., Palade G. E., *Fed. Proc.* **25**, 225 (1966).
81. Pardee A. B., Schachman H. K., Stanier R. Y., *Nature* **169** 282 (1952).
82. Park R. B., *J. Cell Biol.* **27**, 151 (1965).
83. Park R. B., Biggins J., *Science* **144**, 1009 (1964).
84. Park R. B., Pon N. G., *J. Mol. Biol.* **3**, 1 (1961).
85. Park R. B., Pon N. G., *J. Mol. Biol.* **6**, 105 (1963).
86. Petropuls S. F., *Science* **145**, 392 (1964).
87. Pogo B. G., Pogo A. O., *J. Cell. Biol.* **22**, 296 (1964).
88. Rhodes M. C. J., Yemm E. W., *Nature* **200**, 1077 (1963).
89. Robertson J. D., *Biochem. Soc. Symposia*, red. E. M. Crook, Cambridge, University Press No 16, 1959, str. 3.
90. Sager R., Palade G. E., *Exptl. Cell Res.* **7**, 584 (1954).
91. Schachman H. K., Pardee A. B., Stanier R. Y., *Arch. Biochem. Biophys.* **38**, 245 (1952).
92. Schiff J. A., Epstein H. T., Lyman H., w Progress in Photobiology, Proc. 3rd Intern. Congress Photobiol. red. Christensen B. C., Buchmann B., Copenhagen, 1960, str. 289.
93. Schiff J. A., Lyman H., Epstein H. T., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 310 (1961).
94. Schiff J. A., Lyman H., Epstein H. T., *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 340 (1961).
95. Schimper A. F. W., *Jahrbuch wiss. Bot.* **16**, 1 (1885), cyt. wg 90.
96. Shah V. C., Lyman H., *J. Cell. Biol.* **29**, 174 (1966).
97. Siegelman H. W., Hendricks S. B., *Adv. in Enzymol.* **26**, 1 (1964).
98. Siegesmund K. A., Rosen W. G., Gawlik S. R., *Am. J. Botany* **49**, 137 (1962).
99. Sissakian N. W., *Adv. in Enzymol.* **20**, 201 (1958).
100. Smillie R. M., *Can J. Bot.* **41**, 123 (1963).
101. Smith J. H. C., *Symposia on Comparative Biology*, No 1, Academic Press, Inc., New York 1960, s. 257, cyt. wg 72.

102. Szarkowski J. W., Monografie Biochemiczne, No 10, PTBioch., PWN Warszawa, 1965.
103. Szarkowski J. W., Gołaszewski T., *Naturwissenschaften* **48**, 457 (1961).
104. Tewari K. K., Wildman S. G., *Science* **153**, 1269 (1966).
105. Thomson B. F., Miller P. M., *Am. J. Botany* **48**, 256 (1961).
106. Virgin H. I., *Physiol. Plantarum* **11**, 347 (1958).
107. Virgin H. I., Kahn A., Wettstein D. von., *Photochem. Photobiol.* **2**, 83 (1963).
108. Weber P., Praca doktorska, Uniwersytet w Kolonii, 1961.
109. Weber P., *Z. Naturforsch.* **17b**, 683 (1962).
110. Weber P., *Z. Naturforsch.* **18b**, 1105 (1963).
111. Wehrmeyer W., *Z. Naturforsch.* **16b**, 627 (1961).
112. Wehrmeyer W., *Z. Naturforsch.* **18b**, 60 (1963).
113. Weidner M., Jakobs M., Mohr H., *Z. Naturforsch.* **20b**, 689 (1965).
114. Wettstein D. von., *Brookhaven Symp. in Biology* **11**, 137 (1958), cyt. wg 72.
115. Wettstein D. von., *Development Cytology*, Ronald Press Co., New York 1959, cyt. wg 72.
116. Wolf F. T., Caniglio J. G., Davis J. T., *Plant Physiol.* **37**, 83 (1962).
117. Wolf J. B., Price L., *Arch. Biochem. Biophys.* **72**, 293 (1957).
118. Wolken J. J., Palade G. E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **56**, 873 (1953).
119. Zill L. P., Harmon E. A., *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 573 (1962).
120. Zucker M., *Plant Physiol.* **34**, 563 (1959).
121. Zurzycki J., *Acta Soc. Bot. Polon.* **35**, 281 (1966).
122. Zurzycki J., *Postępy Biochem.* **13**, 233 (1967).

WŁODZIMIERZ OSTROWSKI*

**Leon Marchlewski: Jedność świata roślin i zwierząt.
(w 20-lecie śmierci)**

„TEORIA DARWINA O POCHODZENIU GATUNKÓW
OPIERA SIĘ NA ZMIANACH FORMY POD WPŁY-
WEM ROZMAITYCH WARUNKÓW ŻYCIA W WALCE
O BYT. RÓŻNICE USTROJÓW POLEGAJĄ JEDNAK
NIE TYLKO NA ROZMAITEJ FORMIE I BUDOWIE
NARZĄDÓW, LECZ I NA RÓŻNICACH W SKŁADZIE
CHEMICZNYM TYCH ZWIĄZKÓW, Z KTÓRYCH
SKŁADAJĄ SIĘ ICH ŻYWE KOMÓRKI”.

M. Nencki, 1896 r.

Minęło 20 lat od śmierci profesora Marchlewskiego (zm. 16 stycznia 1946 r. w Krakowie), wielkiego chemika i badacza przyrody, kierownika Zakładu Chemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego, rektora tej Uczelni, wiceprezesa Polskiej Akademii Umiejętności, doktora *honoris causa* U. J. za badania nad chlorofilem oraz członka wielu towarzystw naukowych krajowych i zagranicznych. Całe swe długie i pracowite życie poświęcił nauce. Swoimi badaniami przysporzył sławy krajowi na całym świecie. Swą postawą społeczną i polityczną zdobył uznanie swoich najbliższych, jak również szerokich rzesz społeczeństwa. Był autorem ponad 200 publikacji: prac doświadczalnych, referatowych, monografii, podręczników i dyskusji.

Urodził się 15 grudnia 1869 r. we Włocławku na Kujawach w rodzinie kupieckiej. Po ukończeniu szkoły średniej studiuje przez pewien czas fizykę i chemię w Muzeum Przemysłu i Rolnictwa u Napoleona Milcera w Warszawie, gdzie pracował również w tym czasie wychowanek Mendelejewa Józef Boguski oraz młoda chemiczka Maria Skłodowska, późniejsza pani Curie. W 1888 r. Marchlewski zapisuje się na politechnikę w Zurychu i po jej ukończeniu w 1890 r. rozpoczyna pracę badawczą jako asystent G. Lungego, profesora technologii chemicznej w Zurychu. W tym okresie Marchlewski zajmuje się głównie chemią analityczną opracowując tablice ciężarów właściwych roztworów kwasu solnego i azotowego używane do dziś pod nazwą tablic Lungego i Marchlewskiego. W 1892 r. otrzymuje tytuł doktora filozofii na podstawie pracy pt.: „*Kritische Studien über die Sulfidschwefelbestimmungsmethoden*” (C. W. Kreidels Ver-

* doc. dr, kierownik Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Krakowie

lag, Wiesbaden, 1892). Na tej pracy kończy się też działalność Marchlewskiego jako chemika nieorganika.

W 1892 r. angażuje się na stanowisko asystenta do prywatnej pracowni chemicznej koło Manchesteru w Anglii, kierowanej przez znanego wówczas organika Edwarda Schuncka. Schunck miał doskonale wyposażoną jak na owe czasy pracownię i zajmował się głównie barwnikami roślinnymi. Marchlewski rozpoczyna tam pracę od chemii glikozydów i samodzielnie dochodzi do pierścieniowej struktury cząsteczki glikozyz wypowiadając się za koncepcją B. Tollensa, która wówczas była przedmiotem sporów wśród organików zajmujących się chemią węglowodanów. Do chemii cukrów Marchlewski wróci ponownie dopiero w 30 lat później, a na razie jego uwagę przyciąga inny problem.

Schunck między innymi zajmował się chemią chlorofilu wyosabniając kilka pochodnych tej substancji bez ich bliższej charakterystyki. Nieco wcześniej F. Hoppe-Seyler otrzymał z hemoglobiny ludzkiej czerwony barwnik nazwany *hematoporfiryną*, a M. Nencki w 1886 r. pracujący w Bernie Szwajcarskim, opisał po raz pierwszy metodę wyłuskiwania żelaza z heminy otrzymanej w stanie krystalicznym przez anatoma krakowskiego L. Teichmana w 1853 r. Droga żmudnych zabiegów z hematoporfiryny Nencki następnie wyosobnił związek pyrolowy, który nazwał *hemopyrolem*.

Mniej więcej w tym czasie kiedy Nencki prowadził badania nad barwnikiem krwi, Schunck otrzymał z zielonego chlorofilu czerwony barwnik przypominający zabarwieniem hematoporfirynę i nazwał go *filoporfiryną*. Oczywiście ani Schunck, ani Hoppe-Seyler zupełnie nie podejrzewali, że oba barwniki wyosobnione z dwu różnych źródeł — z zielonych roślin i z krwi ludzkiej — mogą mieć jakiegokolwiek genetyczne lub strukturalne podobieństwo. Marchlewski włącza się do badań nad chlorofilem i rozpoczyna wyodrębnianie filoporfiryny na dużą skalę, a następnie ustala wzór empiryczny wyosobnionej substancji. W tym okresie badań Marchlewski ciężko zachorował i przez szereg miesięcy przebywał w szpitalu w Szwajcarii. Podczas pobytu w szpitalu zainteresował się chemią krwi i o tym fakcie sam później wspomina w następujących słowach:

„Losy wkrótce potem zrzędziły, że zmuszony byłem patrzeć na gwałtowny wpływ krwi z własnej tętnicy*. Stan był na tyle ciężki, że obserwując krzątające się w koło mnie postacie w bieli zatraciłem subiektywność, a przeważało odczucie obiektywne. Krew, która w pracach moich ówczesnych nie odgrywała żadnej roli, o której chemii miałem tylko mgliste pojęcie, wyrosła w przyćmionych moich oczach na potęgę podziwu godną; toć byłem świadkiem tak usilnych starań ażeby ją dla mnie uratowano. Nastąpiły długie dni zupełnej beczynności, ale kult krwi niejako raz rozbudzony odezwał się podświadomie, gdy tylko zacząłem normalnie myśleć.

* miał krwotok z płuc

Pierwsza moja prośba była o traktaty z chemii krwi. Nie łatwo o nie było w prowincjonalnym mieście, ale przecież dostarczono mi elementarny podręcznik chemii organicznej Bernthseny, w którym o dziwo znalazłem w rozdziale o hemoglobinie bardzo starannie streszczone najnowsze wyniki badań wielkiego naszego Nenckiego. Oczom swoim wierzyć nie chciałem; opis tak zwanej hematoporfiryny otrzymanej z heminy Teichmana w Krakowie zgadzał się tak drobiazgowo z tymi wiadomościami, które pamiętałem o swojej filoporfirynie, że byłem gotów przypuścić, iż Nencki miał naszą substancję już przed nami w rękach pomimo, że nad chlorofilem nie pracował. Po powrocie do Manchesteru zwróciłem się do Nenckiego, wówczas już pracującego w Petersburgu, z prośbą o próbkę jego hematoporfiryny w celu bezpośredniego jej porównania z filoporfiryną. Rezultat był taki, jakiego się spodziewałem: filoporfiryna i hematoporfiryna nie okazały się wprawdzie identycznymi, ale niezwykle do siebie zbliżonymi. Zdawało się, że są różnymi stopniami utlenienia tej samej podstawowej substancji macierzystej”.

Podczas swoich studiów w szpitalu Marchlewski zwrócił uwagę na metody spektralne chemii organicznej i po powrocie do pracowni przebadal widmo absorpcyjne filoporfiryny i hematoporfiryny. Stwierdził duże podobieństwo tych widm, co wraz z wzorami empirycznymi obu substancji ($C_{32}H_{36}N_4O_2$ — filoporfiryna, $C_{34}H_{38}N_4O_6$ — hematoporfiryna) nasunęło mu myśl o wspólnej strukturze tych związków pochodzących z dwu odrębnych światów; roślin i zwierząt. Wyniki doświadczeń wraz z oryginalną hipotezą opublikował z Schunckiem w 1896 r. w pracy: E. Schunck and L. Marchlewski: Contribution to the Chemistry of Chlorophyll. VII. Phylloporphyrin and Haematoporphyrin: a Comparison. (Proc. Roy. Soc. 59, 193, (1896). Schunck nie omieszkał przy najbliższej okazji w ten sposób wyrazić się o roli młodego Polaka w tych badaniach: „*The discovery was made in my laboratory, but the merit of it is chiefly due to my friend and former collaborator, Dr Marchlewski* (J. Soc. Chem. Industry, 590, (1897).

W 1897 r. Marchlewski objął samodzielną placówkę naukową fabryki barwników i farmaceutyków w Clayton k/Manchesteru utrzymując nadal bliskie stosunki z Schunckiem i kontakty naukowe z Nenckim. Po przesłaniu Nenckiemu odbitki pracy z Schunckiem, Nencki z kolei poprosił o przesłanie mu próbki filoporfiryny celem wykazania zasadniczego składnika porfiryn, tj. pyroлу, którego obecność w hematoporfirynie, jak już wspomniano, wykazał wraz z J. Zaleskim szereg lat wcześniej. Nencki przeprowadził analizy, wykazał bez wątpienia obecność hemopyroлу w filoporfirynie Marchlewskiego i przesyłając dokładną relację z przebiegu analizy załączył z Petersburga taki oto list z datą 6 marca 1897 r.:

„Szanowny i Kochany Panie!

Chociaż nie mam przyjemności osobiście Was znać, to pozwolicie mi

powiedzieć, iż jest to fishing for compliments, jeżeli się unizonym pa-chołkiem nauki nazywacie. Natomiast życzę Wam, iżbyście tyle szczęścia w dalszych pracach mieli jak z filoporfiryną. Znam zresztą Was i z innych prac i sam schodząc z pola cieszę się, iż mogę powiedzieć vivat sequens. Nie zawsze jednak można robić tak świetne odkrycia jak filoporfiryna ale dalej pracować póki sił starczy zawsze można. Praca nad hematoporfiryną była najtrudniejszą w moim życiu i tylko co do trudności mogę ją porównać z obecną pracą nad księgosuszem bydła. Hoppe-Seyler mnie za nią zwymyślał. Niemcy ignorowali, w końcu p. Schmiedeberg przez p. Cloette oświadczył, że się omylił, ale w całym końcu prawda na wierzch wyszła, a jej doniosłość filoporfiryna pokazała — więcej jak 10 lat czekałem na uznanie — tak więc każdy fakt jest ważny, a ile on ważny, to z góry wiedzieć trudno — główna rzecz nie ustawać usque ad finem...”

Wyniki powyższych badań Marchlewskiego i Nenckiego ogłoszone zostają we wspólnej pracy: M. Nencki und L. Marchlewski: „*Zur Chemie des Chlorophylls Abbau des Phyllocyanins zum Hämopyroll*” (Ber. deutsch. chem. Gesell. **34**, 109 (1901).

W 1901 r. Stanisław Bondzyński, chemik fizjolog, kierownik Zakładu Badania Środków Spożywczych w Krakowie, został powołany na Katedrę Chemii Lekarskiej we Lwowie i na swoje miejsce zaproponował L. Marchlewskiego. Marchlewski przyjął propozycję, zreorganizował Zakład i rozpoczął dalsze prace nad chlorofilem. Z filoporfiryny otrzymał tak zwany kwas hematynowy, identyczny z otrzymanym przez Küstera z hemoglobiny. Z kału krów karmionych zieloną paszą izoluje następnie pochodne bakteryjnego rozkładu chlorofilu — *filoerytrynę* — jak się później okazało kluczowy związek dla wyjaśnienia ostatecznej struktury chlorofilu. W 1903 r. powołany zostaje do Polskiej Akademii Umiejętności jako jej najmłodszy członek w wieku 34 lat. W 1906 r. Katedrę Chemii Lekarskiej Uniwersytetu Jagiellońskiego opuszcza na skutek przejścia na emeryturę Aleksander Stopczański i Wydział Lekarski powołuje na to stanowisko L. Marchlewskiego. Otrzymał obszerny Zakład, otoczył się zdolnymi współpracownikami, co spowodowało, że ta placówka badawcza stała się najlepszą w Polsce na długi przeciąg czasu. W krótki czas po objęciu nowego warsztatu pracy Marchlewski rozpoczyna dalsze prace nad strukturą chlorofilu, głównie z J. Z. Roblem, uzyskując ciekawą pochodną filoporfiryny przez wprowadzenie atomu żelaza centralnie do układu porfirynowego. Nowy związek nazwany *filoheminą* wykazywał daleko idące podobieństwo do heminy otrzymanej z hemoglobiny ludzkiej. W ten sposób Marchlewski i Robel znaleźli niezwykle ważne ogniwo łączące strukturę chlorofilu z grupą prostetyczną barwnika krwi i ustalili przejście między tymi układami chemicznymi. Niestety Marchlewski w tym czasie nic nie wiedział o tym, że chlorofil, podobnie jak protohem, również posiada swój centralny atom metalu, mianowicie magnez.

Niemniej jednak w osiągnięciu swym Marchlewski widział jasno przejaw ewolucji w zakresie związków organicznych, zwłaszcza rozpatrując przemianę chlorofilu w heminę, dającą początek komórce zwierzęcej z hemoglobina. Zdawał sobie również dobrze sprawę, że świat roślin i zwierząt dzieli niezwykle cienka przegroda, która w miarę dalszych badań będzie stopniowo zanikać. W badaniach Marchlewskiego należy upatrywać początków biochemii ewolucyjnej.

Od tego momentu inicjatywę w badaniach nad chlorofilem przejęli inni: R. Willstätter w Zurychu oraz H. Fischer w Monachium. Pierwszy między innymi wykazał obecność magnezu w chlorofilu, drugi wyjaśnił do końca strukturę zielonego barwnika roślin. Fischer zsyntetyzował również heminę, za co otrzymał nagrodę Nobla w 1930 r. Choć Niemcy wyprzedzili Marchlewskiego w badaniach w dziedzinie, która od lat była jego domeną, nie czuł do nich urazy i żalu; co więcej, posyła Fischerowi cały zapas otrzymanej przez siebie filoerytryny, umożliwiając mu przeprowadzenie ostatecznych badań nad strukturą chlorofilu.

Koledzy niemieccy nie zachowali się jednak właściwie w stosunku do pioniera badań nad chlorofilem — systematycznie pomijali jego nazwisko w publikacjach i to Marchlewski głęboko przeżywał. Dopiero przed samą II wojną światową badacze amerykańscy przywrócili osiągnięciom Marchlewskiego właściwą rangę na terenie międzynarodowym.

Wybuch I wojny światowej dezorganizuje pracę naukową Zakładu i wtedy Marchlewski oddaje się wytężonej pracy społecznej. Bierze czynny udział w organizowaniu pomocy ofiarom wojny, następnie przez szereg lat zajmuje się organizacją Państwowego Naukowego Instytutu Rolniczego w Puławach, zniszczonego podczas wojny a potem Instytutu Gospodarstwa Wiejskiego w Bydgoszczy, za którą to pracę zdobył uznanie najwyższych władz. W Puławach organizuje doskonały ośrodek badań nad witaminami, oraz dział produkcji surowic i szczepionek przeciwko księgosuszowi, chorobie bydła, która groziła wyniszczeniem pogłównia w całej Europie. W 1924 r. wstępuje do Polskiego Stronnictwa Ludowego „Piaśt” i w swej działalności społeczno-politycznej występuje w obronie spraw polskiej wsi. Z ramienia tegoż Stronnictwa w 1930 r. zostaje wybrany do Senatu Rzeczypospolitej.

Praca naukowa Marchlewskiego w latach międzywojennych nie ma już tego rozmachu i entuzjazmu z jakim się jej oddawał do I wojny światowej. Powraca wprawdzie jeszcze raz po kilkudziesięcioletniej przerwie do chemii cukrów i własności widm różnych związków organicznych, ale choroby i zajęcia społeczne utrudniają mu pełne rozwinięcie tych badań. Przez cały czas swojej działalności naukowo-dydaktycznej prof. Marchlewski był ściśle związany z młodzieżą. Był jej oddany, kochał ją, choć był wymagający. W wysiłkach dydaktycznych sam się nie oszczędzał, cenił tylko pracę rzetelną, patriotyzm i szanował ideały młodzieży. Jakże

charakterystyczne są poniższe słowa profesora Marchlewskiego, które jako rektor skierował do młodzieży podczas inauguracji 563 roku akademickiego w Uniwersytecie Jagiellońskim:

„Ludzkość w rozwoju swym przechodzi różne fazy, często jest w upadku, jednak tylko po to, aby wznieść się na wyżyny jeszcze wznioślejsze. Żeby jej to ułatwić potrzeba nam hartu naszych Tatr, ukochania tradycji wzgórza Wawelu, zrozumienia nauki Kopca Kościuszki, ofiarnej i nieugiętej pracy wśród tych czcigodnych murów”.

RECENZJE KSIĄŻEK

Peptides, Proceedings of the Sixth European Peptide Symposium, Athens, red. L. Zervas, Pergamon Press 1966, str. XVI + 386

Książka zawiera referaty wygłoszone w czasie szóstego Europejskiego Sympozjum Peptydowego, które miało miejsce w Atenach w sierpniu 1963 r. Począwszy od roku 1958 sympozja na ten temat odbywały się corocznie i stawały sobie do tychczas za główny cel omawianie metod syntezy peptydów. Szóste Sympozjum obejmowało nie tylko problemy syntezy i degradacji peptydów, ale również zagadnienia związane z badaniem własności chemicznych i fizycznych peptydów oraz ich funkcji biologicznych. 46 wygłoszonych referatów umieszczono w książce w pełnym brzmieniu z wyjątkiem trzech, opublikowanych wcześniej. Sympozjum obejmowało 7 sekcji. Sekcja I dotyczyła syntezy peptydów (16 referatów). Przedstawiono w nich wyniki badań nad doбором odpowiednich związków maskujących grupy $-NH_2$, $-COOH$ i inne funkcyjne grupy bocznych łańcuchów w reakcjach syntezy. Omówiono stosowanie grupy ftalylowej do ochrony ugrupowania $\delta-NH_2$ ornityny, używanie reszty etylokarbamylowej do blokowania grup $-SH$ i reszty chlorobenzylowej do maskowania grup $-OH$ seryny. Podkreślano również korzyści stosowania grupy *o*-nitrofenylosulfonowej oraz metoksylowych pochodnych benzhydrylowych do blokowania grup $-NH_2$ i $-SH$. W związku z procesem kondensacji rozważano mechanizmy wielu reakcji i dyskutowano sprawę właściwego doboru katalizatorów oraz innych warunków reakcji pozwalających na wyeliminowanie równoczesnego tworzenia produktów ubocznych. Przedstawiono badania nad redukcją tosylaminokwasów i tosylpeptydów w ciekłym amoniaku, nad redukcją pochodnych nitroargininy oraz porównawczym rozpadem acidolitycznym ugrupowań karbobenzoksy różniących się charakterem podstawników w pierścieniu. W referatach tej sekcji omówiono także otrzymywanie peptydów za pomocą enzymów proteolitycznych, syntezę tych związków bez izolowania produktów pośrednich oraz problem cyklizacji szczególnie w odniesieniu do peptydów tioeterowych. W sekcji II zajmującej się zjawiskiem racemizacji (4 referaty) omawiano wpływ rozmaitych czynników na przebieg tego procesu, stawiano wnioski odnośnie mechanizmu reakcji oraz opisano zastosowanie chromatografii gazowej jako techniki polecanej przy badaniu racemizacji. Tematem sekcji III była degradacja łańcuchów peptydowych (5 referatów). Przedstawiono tu zarówno ogólny postęp w dziedzinie selektywnych nieenzymatycznych i enzymatycznych metod rozkładu poli-peptydów, jak też sposoby swoistego rozbijania pewnych określonych typów wiązań. Należą tu badania nad zastosowaniem *N*-sukcynylo-imidu do rozkładania wiązań peptydowych zawierających histydynę oraz nad ozonowym utlenianiem reszt tryptofanowych i cysteinowych. Przedstawiono również proponowany mechanizm reakcji *N*-etylomaleilo-imidu z cysteiną. Sekcja IV dotyczyła syntezy naturalnych peptydów i analogów, ich struktury i aktywności biologicznej. W 10 referatach tej sekcji zebrano wyniki badań nad zależnością funkcji biologicznej od struktury chemicznej pewnych analogów oksytocyny, bradykininy, angiotensyny, związków serii eniatyny oraz estrów acetylo-dwupeptydów zawierających melfalan. Przedstawiono także strukturę pewnych naturalnych peptydolidów i peptydoglikolidów. Synteza i własności specjalnych peptydów hy-

ły tematem V sekcji. W 3 referatach omówiono syntezę i polimeryzację peptydów zbudowanych z lizyny i kwasu glutaminowego jako modelowych związków służących do badania konformacji łańcuchów peptydowych, podano syntezę fragmentu 1—20 łańcucha rybonukleazy i cyklicznej części cząsteczki insuliny. Sekcja VI obejmowała 5 referatów traktujących o syntezie i własnościach peptydów zawierających rzadkie aminokwasy jak np. α -metyloalaninę i kwas α , α' -mesodwuamino-pimelinowy. Przedstawiono tu również metody syntezy O-peptydów tyrozyny, seryny i treoniny oraz strukturalne badania nad naturalnymi depsypeptydami z uwzględnieniem sposobów ich cyklizacji, warunków reakcji i tworzących się produktów. Sekcja VII dotyczyła chemicznych i fizycznych własności peptydów (3 referaty). Omówiono zastosowanie chromatografii gazowej w chemii aminokwasów i peptydów, szczególnie przy badaniu racemizacji i sekwencji, wyznaczenie wielkości i kształtu cząsteczek peptydów z zastosowaniem dyfuzji przez membrany oraz opisano metody rozdziału przeciwwądrowego polecanego do rozdzielania mieszanin fosforylowanych peptydów.

Książka ma przede wszystkim poważne znaczenie dla chemików organików i biochemików zajmujących się syntezą peptydów, ale zawiera również cenne informacje z metodyki badań strukturalnych związków peptydowych. Trzyletni okres wydawniczy przyczynił się wprawdzie do nadania książce pięknej szaty graficznej ale niestety umniejszył znacznie aktualność przedstawionych zagadnień.

Maria Sarnecka-Keller

Cyclitols and Phosphoinositides

Proceedings of the 2-nd Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Vienna, 21—24 April 1965. Volume 2. Edited by H. Kindl. Pergamon Press 1966, 80 stron, Cena 20 s.

Recenzowana książka zawiera materiały kolokwium pod tym samym tytułem zorganizowanego przez H. Kindla w ramach II Zjazdu FEBS w Wiedniu w r. 1965. Pomimo wielkiego postępu chemii i biochemii cyklitolu w ostatnim ćwierćwieczu, zagadnienia biosyntezy i roli biologicznej tych związków nadal zwracają uwagę badaczy wielu ośrodków. Kolokwium wiedeńskie było konfrontacją badań różnych pracowników nad zbliżonymi problemami i podsumowaniem osiągniętych wyników.

Redaktor recenzowanego tomu i organizator kolokwium podzielił całość materiału na część poświęconą biosyntezie mezo-inozytolu i innych cyklitolu oraz na część omawiającą występowanie, funkcję, biosyntezę i przemiany fosfoinozytydów.

Biosyntezie cyklitolu poświęcone są trzy prace: F. Eisenberga Jr o biosyntezie mezo-inozytolu w organizmach ssaków, H. Kindla o badaniach nad biosyntezą tego samego związku w mikroorganizmach i roślinach wyższych oraz O. Hoffmanna-Ostenhofa o biosyntezie cyklitolu innych niż mezo-inozytol. Wyniki tych prac potwierdzają sugestie Maquenne'a z r. 1903, że naturalnym substratem biosyntezy cyklitolu jest glukoza oraz pozwalają przyjąć wspólny mechanizm tej syntezy we wszystkich badanych organizmach. Mezo-inozytol powstaje z glukozy przez glukozo-6-fosforan, 5-keto-glukozo-6-fosforan mezo-inozo-6-fosforan i 1-fosforan mezo-inozytolu. Eisenberg i Kindl pracując na różnym materiale i odmiennymi metodami otrzymali preparaty enzymatyczne kierujące poszczególnymi etapami tego ciągu biosyntetycznego. Hoffmann-Ostenhof wykazał, że droga ta jest również wykorzystywana w przyrodzie do syntezy innych cyklitolu. Jedynym

cukrem wstępującym w ten ciąg jest glukoza, a scylitol, pinitol, quebrachitol i inne cyklitolowe powstają w wyniku przekształceń *mezo*-inozytolu lub połączenia ściśle z nim spokrewnionego np. *mezo*-inozozy.

Autor obszernej monografii o cyklitolach, recenzowanej już na łamach *Postępów Biochemii*, Th. Posternak zamieścił pracę o antagonistach inozytolu. Stojąc na stanowisku, że *mezo*-inozytol pełni w organizmach roślinnych rolę czynnika wzrostowego autor badał mechanizm tej czynności biologicznej obserwując zmiany morfologiczne i biochemiczne powstające pod wpływem analogów inozytolu o działaniu inhibitorów. Badania te prowadzą do wniosku, że czynność biologiczna inozytolu polega na jego wpływie na budowę błon komórkowych wywieranym za pośrednictwem RNA.

Część tomu poświęcona fosfoinozytydom składa się z czterech prac. Są to artykuły C. E. Ballou i Y. C. Lee o fosfoinozytydach *mycobacterii*, J. N. Hawthorne'a i R. H. Michella o dwu- i trójfosfoinozytydach w tkankach innych niż układ nerwowy, R. M. C. Dawsona o metabolizmie i funkcji polifosfoinozytydów w układzie nerwowym oraz praca R. J. Rossitera i F. B. Palmera o biosyntezie fosfoinozytydów w mózgu. Badania Ballou i Lee wykazały daleko idącą odmienność budowy fosfoinozytydów bakteryjnych od dobrze zbadanych pochodnych *mezo*-inozytolu tkanek ssaków. Podstawą struktury fosfoinozytydów *mycobacterii* są mannozydy *mezo*-inozytolu, zawierające od jednej do pięciu reszt D-mannozy na jedną cząsteczkę cyklitolu i jedną resztę fosfatydylową. Natomiast badane przez Hawthorne'a i Michella fosfoinozytydy wątroby i innych tkanek nie różnią się od związków wyodrębnianych z mózgu. Podstawą ich struktury jest fosfatydylo-*mezo*-inozytol, który może być estryfikowany jeszcze jedną lub dwoma resztami fosforanowymi. Zarówno badania Dawsona jak i Rossitera i Palmera wykazały, że w tkance nerwowej fosforylacja te zachodzą stopniowo i kosztem ATP. W biosyntezie tych fosfoinozytydów bierze udział CDP-dwugliceryd. Związki te znajdują się w tkance nerwowej w postaci kompleksów z białkami i prawdopodobnie ich rola polega na regulowaniu równowagi jonowej.

O ile wydaje się, że nie można się spodziewać, aby dalsze prace nad strukturą i biosyntezą cyklitolu zmieniły nasze poglądy w tej dziedzinie i kolokwium wiedeńskie było jakby zamknięciem pewnego etapu badań, to problemy związane z fosfoinozytydami zostały tam tylko zasygnalizowane. Cztery prace z czterech poważnych ośrodków zwracają uwagę na tę mało zbadaną grupę związków o dużej aktywności metabolicznej. Zrozumienie roli biologicznej tych połączeń może rzucić nowe światło na wiele dotąd niejasnych procesów fizjologicznych.

Stanisław Lewak

Biosynthesis of Aromatic Compounds

Proceedings of the 2-nd Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Vienna 21—24 April 1965. Edited by G. Billek. Pergamon Press, Oxford 1966. X + 142 stron. Cena 30 s.

Trzeci tom materiałów drugiego Zjazdu FEBS w Wiedniu w r. 1965 zawiera większość referatów wygłoszonych w ramach kolokwium na temat biosyntezy związków aromatycznych, zorganizowanego przez G. Billeka. Tom składa się z trzy-nastu artykułów omawiających różne aspekty zasadniczej tematyki kolokwium i stanowiących bądź prace przeglądowe poświęcone konkretnej drodze metabolicznej lub konkretnej grupie związków, bądź też obszernie doniesienia z prac własnych autora.

Powstawanie niemal każdego naturalnego związku aromatycznego można sprowadzić do szlaku wiodącego przez kwasy: szikimowy, chorizimowy i preferonowy lub też do cyklizacji łańcucha poliketydowego utworzonego w wyniku kondensacji acetylo- lub malonylo-koenzymu A. O ile pierwsza z tych dróg jest dość dobrze zbadana i powszechnie przyjęta, to druga, aczkolwiek istnieją dowody jej przebiegu w postaci licznych doświadczeń ze znakowanymi prekursorami, ciągle czeka na udokumentowanie w postaci wykrycia w materiale biologicznym produktów pośrednich i enzymów katalizujących poszczególne jej etapy. Hipotezy i problemy związane z powstawaniem układów aromatycznych wywodzących się z jednostek dwuwęglowych są przedmiotem pierwszego artykułu recenzowanego tomu napisanego przez A. J. Bircha, autora większości prac pozwalających na przyjęcie tej drogi biosyntetycznej.

Następna praca, również o charakterze przeglądowym, poświęcona jest biosyntezie grupy związków powstających wyłącznie w wyniku przekształceń kwasów fenylopropanowych, które są syntetyzowane na drodze „kwasu szikimowego”. Artykuł S. A. Browna o biosyntezie kumaryn omawia całość zagadnienia na tle wyników własnych badań.

Biosynteza flawonoidów, związków, w których powstawaniu biorą udział oba główne szlaki biosyntetyczne, jest przedmiotem prac prowadzonych od szeregu lat w pracowni H. Griesbacha. Artykuł jego, umieszczony w recenzowanym tomie, przedstawia całokształt zagadnienia uwypuklając ostatnie osiągnięcia i problemy dotąd niewyjaśnione. W podobny do flawonoidów sposób przebiega biosynteza innej grupy związków — stilbenów roślinnych, o których w kolejnej pracy piszą G. Billek i A. Schimpl.

M. H. Zenk jest odkrywcą biosyntezy pochodnych kwasu benzoowego w wyniku β -oksydacji układów C_{6+3} . Referat przedstawiony w Wiedniu omawia wszystkie znane sposoby powstawania związków C_{6+1} , ich występowanie i hipotezy dotyczące mechanizmu przemian.

Następne cztery artykuły noszą charakter prac doświadczalnych, tematycznie związanych z Kolokwium. Są to prace C. Ratledge'a o biosyntezie kwasu salicylowego w *Mycobacterium smegmatis*, K. Kratzla i J. Okaba o wbudowywaniu kwasu *p*-hydroksybenzoowego do ligniny, E. Lederera i współpracowników na temat pochodzenia grupy metylowej układu naftochinonowego witaminy K_2 syntetyzowanej przez *Mycobacterium phlei* oraz praca K. Schuberta o aromatyzacji steroidów przez mikroorganizmy.

Drugą część recenzowanego tomu, zawierającą część referatów wygłoszonych w drugim dniu Kolokwium otwiera stosunkowo obszerny przeglądowy artykuł K. Mothesa o powstawaniu układów aromatycznych w alkaloidach. Autor podkreśla węzłową pozycję kwasu chorizimowego. Zwraca uwagę na fakt powstawania tych samych układów, a nawet tych samych związków na odmiennych drogach w różnych organizmach roślinnych jak również na genetyczne uwarunkowanie poszczególnych etapów biosyntezy.

Również biosyntezie alkaloidów poświęcona jest, kolejna w tomie, praca A. R. Battersby o wbudowywaniu aromatycznych prekursorów do alkaloidów aporfirynowych. Na końcu zbioru materiałów Kolokwium wiedeńskiego umieszczono prace A. C. Neisha i współpracowników o biosyntezie glikozydów cyjanogennych oraz E. W. Underhilla i L. R. Wattera o biosyntezie glikozydów gorczycy.

Przedstawione na Kolokwium prace pozwalają na stwierdzenie, że poza podobieństwem struktury badanych związków i wspólnym przebiegiem wielu etapów biosyntezy, zbliżone są również i problemy, na które natrafiają wszyscy pracujący nad biosyntezą układów aromatycznych. Olbrzymi postęp osiągnięty w tej dziedzinie w ostatnim dziesięcioleciu zawdzięczamy przede wszystkim stosowaniu techniki izotopowej. Stąd też dobrze poznane są prekursory i produkty pośrednie biosyntezy,

natomiast niemal całkowicie brak jest danych o systemach enzymatycznych katalizujących poszczególne reakcje. Jedynym wyjątkiem są tutaj etapy szlaku przez kwas szikimowy, ale droga ta została po raz pierwszy zbadana na materiale mikrobiologicznym gdzie można było stosować technikę mutantów i bloków metabolicznych. Na konieczność badań enzymologicznych, które pozwoliłyby wyjaśnić mechanizm wielu przemian zwracają uwagę, między innymi, Birch, i Mothes. Również Griesebach pragnie w ten sposób wyjaśnić przebieg aktywacji jednostek fenylopropanowych włączanych do cząsteczek flawonoidów, a Zenk chciałby na tej drodze uzyskać potwierdzenie swych hipotez.

Recenzowany tom, podobnie jak wszystkie wydawnictwa *Pergamon Press* wydany jest bardzo starannie. Należy wyrazić żal, że ukazuje się dopiero w półtora roku po Zjeździe. Przy tak długim cyklu produkcji możnaby spodziewać się starannejszego opracowania korektorskiego (zauważone istotne błędy literowe na str. 45 i 97—98).

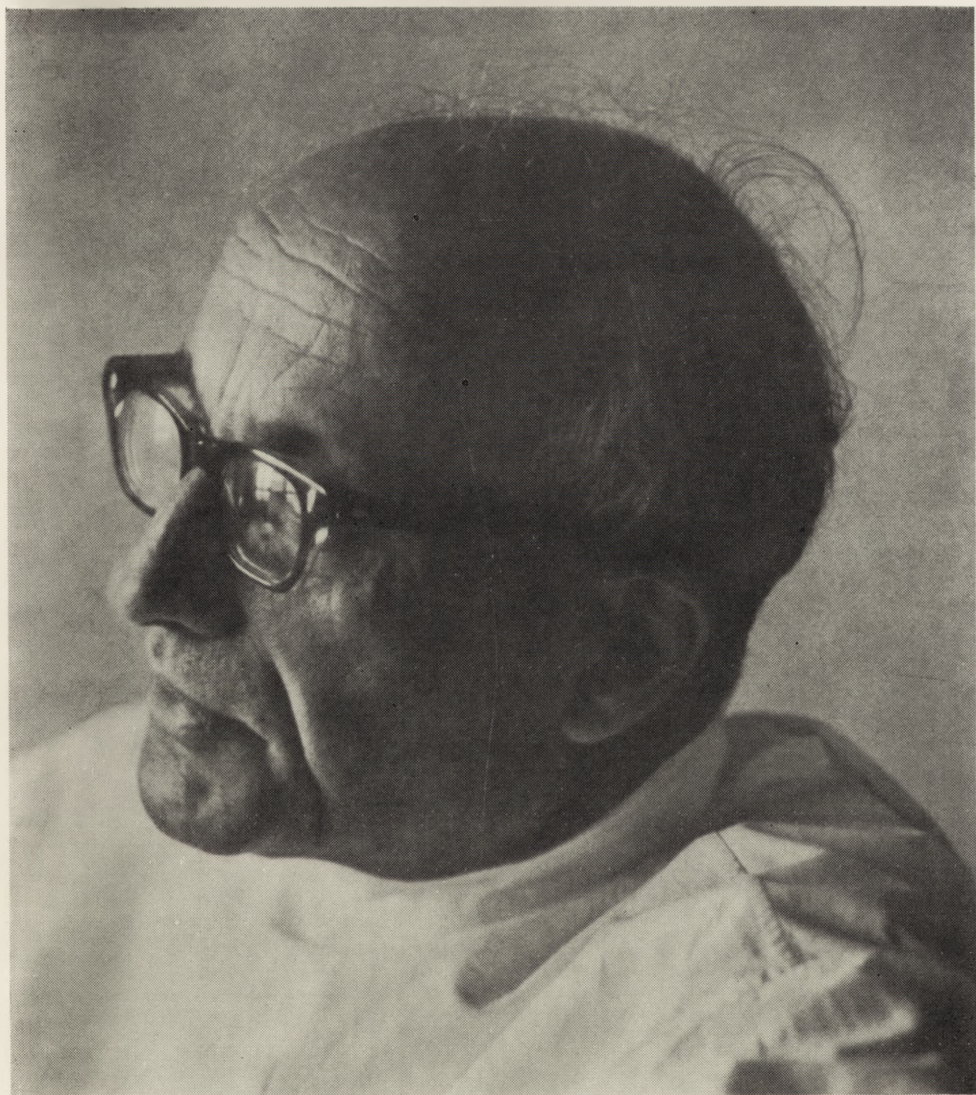
St. Lewak

Prof. dr Edward Kowalski

1914 – 1967

W dniu 15 kwietnia 1967 roku zmarł nagle, w pełni sił twórczych prof. dr Edward Kowalski, wybitny biochemik, radiobiolog i hematolog, wieloletni członek Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, kierownik Zakładu Radiobiologii i Ochrony Zdrowia Instytutu Badań Jądrowych.

Biochemia polska poniosła ciężką stratę.



Fot. M. HOLZMAN

KOMUNIKATY

Komunikaty sekcji fotobiologicznej PTBioch.

Konferencja fotobiologiczna w Krakowie

W dniach 10 i 11 maja 1966 r. odbyła się w Krakowie pierwsza naukowa konferencja sekcji fotobiologicznej Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Organizatorem konferencji był prof. J. Zurzycki. Na konferencji wygłoszono 25 — 15-minutowych referatów przedstawiających wyniki prac naukowych wykonanych w kraju w ostatnim okresie czasu w zakresie podstawowej fotochemii, fotochemii kwasów nukleinowych, fizycznych procesów leżących u podstaw fotosyntezy, fotofizjologii roślin i zwierząt oraz chemiluminiscencji. Po każdym referacie 5 minut czasu przeznaczone było na dyskusję, przy czym w przypadku komunikatów o tematyce zbliżonej dyskusję przeprowadzono łącznie nad kilkoma referatami. W programie Konferencji znajdowało się również zwiedzenie Katedry Fizjologii Zwierząt U.J. oraz Katedry Fizjologii Roślin U.J.

Wygłoszono następujące referaty:

Z Warszawy: K. L. Wierzchowski — Uwagi ogólne na temat mechanizmów fotochemicznych uszkodzeń aparatu genetycznego komórek bakteryjnych przez promieniowanie nadfioletowe. Z. Tramer — Badania nad fotodimeryzacją reszt 2,4-dwuketopirymidyn w polinukleotydach. M. Fikus — Fotochemia 5-halogenouracyli. E. Sztumpf-Kulikowska — Fotochemia kwasów orotowych. J. Maruchin, inż. S. Grabiec — Chemiluminescencja w reakcjach enzymatycznych. A. Bylina — Fotoizomerizacja *cis-trans* i stany tripletowe stylbenu. B. Pakuła — Wyznaczanie stałych dysocjacji kwasowej wolnych rodników ketylowych metodą fotolizy błyskowej. K. Rotkiewicz — Polarność cząsteczek aminoantracenów w pierwszym wzbudzonym stanie singletowym. A. Grabowska — Równowagi kwasowo-zasadowe azotowych heterocykli w stanie tripletowym.

Z Krakowa: T. Ruebenbauer — Wpływ światła na tworzenie się chlorofilu w korzeniach marchwi. J. Zurzycki — Badania nad kontrakcją izolowanych chloroplastów. A. Zurzycka — Fotomorfozy u grzybów. L. Rakoczy — Antagonistyczne działanie światła w procesie owocowania słuzowca *Physarum nudum*. S. Więckowski — Fotosynteza młodych liści fasoli. W. Starzecki — Problem adaptacji świetlnej w strukturze i funkcji liścia. J. Surowiak — Wpływ napromieniania ultrafioletem myszy białych w ich rozwoju postembrionalnym na spermatę i spermiogenezę. J. Surowiak, S. Tilgner — Zachowanie się kwaśnej fosfatazy w niektórych gruczołach dokrewnych myszy poddanych silnemu szokowi świetlnemu. H. Lach — Przebieg cyklu płciowego u myszy napromienianych różnymi zakresami i dawkami UV. R. Pado — Fotosynteza u *Paramecium bursaria*.

Z Torunia: D. Frąckowiak — Własności chlorofilidów w adsorbentach i roztworach stałych. Z. Kojro — Widma polaryzacji fluorescencji chlorofilidów *a* i *b*.

Z Lublina: K. Matusiak, A. Krzywicka, T. Jaroszyńska — Stymulujący wpływ światła na antybiotyczne działanie wyciągów z *Chlorella*.

Z Szczecina: J. Sławiński, L. Sławińska — Chemiluminescencja związków fenolowych w układach biologicznych.

Z Poznania: *J. Koziol* — Badania nad strukturalnymi własnościami flawin w rozpuszczalnikach organicznych.

Z Wrocławia: *B. Kamyk* — Zmiany w rytmie dobowym odczynowości acidofili krwi obwodowej myszy po silnych dawkach promieniowania UV i rtg.

Następna Konferencja sekcji odbędzie się wiosną 1967 roku w Poznaniu na zaproszenie doc. D. Frąckowiak.

Komunikat o V Międzynarodowym Kongresie Fotobiologicznym

W dniach 26 do 31 sierpnia 1968 w *Dartmouth College*, Hanover, stan New Hampshire, USA obradować będzie V Międzynarodowy Kongres Fotobiologiczny, zorganizowany przez Komitet Fotobiologiczny USA pod auspicjami Międzynarodowego Komitetu Fotobiologicznego (CIP) i Narodowej Akademii Nauk USA. Tematyką kongresu objęte będą przede wszystkim następujące zagadnienia:

- fotokemistyka podstawowa
- fotodynamiczne działanie promieniowania
- fotosynteza
- bioluminescencja
- fotokemistyka związków wielkocząsteczkowych
- fotodermatologia
- fotomorfologia
- widzenie
- fotoperiodyzm
- aparatura i widma działania
- mechanizmy usuwania uszkodzeń fotochemicznych.

Dalsze informacje można otrzymać korespondencyjnie od sekretarza generalnego kongresu dr S. A. Gordona, adresując listy:

Dr S. A. Gordon, Secretary-General, Fifth International Photobiology Congress, Argonne National Laboratory — 202, Argonne, Illinois, 60439, USA.

SPIS TREŚCI

K. L. Wierzchowski — Fotochemiczne przemiany kwasów nukleinowych	127
S. Paszyc — Fotochemia związków flawinowych	161
I. Pietrzykowska — Biologiczne skutki promieni UV u mikroorganizmów	171
J. Sławiński — Chemiluminescencja w biologii	191
A. Zurzycka — Lumisynteza	217
J. Zurzycki — Wpływ światła na strukturę aparatu fotosyntetycznego	233
S. Więckowski — Formy chlorofilu in vivo i ich rola w fotosyntezie	261
J. W. Szarkowski, T. Gołaszewski — Molekularna struktura chloroplastów a światło	275
W. Ostrowski — Leon Marchlewski: Jedność świata roślin i zwierząt (w 20-lecie śmierci)	293
Recenzje książek (S. Lewak, M. Sarnecka-Keller)	299
Komunikaty	305

W 3-cim zeszycie tego tomu ukażą się:

1. Struktura chloroplastów a biochemia fotosyntezy, *W. Hendrich*
2. Fizyczne badanie procesu fotosyntezy, *D. Frąckowiak*
3. Kwasy nukleinowe i biosynteza ǰiałka w mitochondriach, *W. Turski, M. Gross*
4. Wewnątrzkomórkowe rybonukleazy zwierzęce i ich naturalny inhibitor, *A. Bardoń*
5. Zastosowanie warstw jednomolekularnych w badaniu kwasów nukleinowych, *M. Kamieńska-Żyła*
6. Oznaczanie ciężaru cząsteczkowego białek za pomocą sączenia molekularnego, *M. Stahl*
7. Metabolizm trójglicerydów tkanki tłuszczowej, *L. Korniszewski, A. Krotkiewski*
8. Reakcje katalizowane przez fosforan pirydoksalu, *L. Jaroszewicz*
9. Biologiczny rozkład ligniny, *A. Leonowicz, J. Trojanowski*

SPIS TREŚCI

K. L. Wierzchowski — Fotochemiczne przemiany kwasów nukleinowych	127
S. Paszyc — Fotochemia związków flawinowych	161
I. Pietrzykowska — Biologiczne skutki promieni UV u mikroorganizmów	171
J. Sławiński — Chemiluminescencja w biologii	191
A. Zurzycka — Lumisynteza	217
J. Zurzycki — Wpływ światła na strukturę aparatu fotosyntetycznego	233
S. Więckowski — Formy chlorofilu in vivo i ich rola w fotosyntezie	261
J. W. Szarkowski, T. Gołaszewski — Molekularna struktura chloroplastów a światło	275
W. Ostrowski — Leon Marchlewski: Jedność świata roślin i zwierząt (w 20-lecie śmierci)	293
Recenzje książek (S. Lewak, M. Sarnecka-Keller)	299
Komunikaty	305

W 3-cim zeszycie tego tomu ukażą się:

1. Struktura chloroplastów a biochemia fotosyntezy, *W. Hendrich*
2. Fizyczne badanie procesu fotosyntezy, *D. Frąckowiak*
3. Kwasy nukleinowe i biosynteza białka w mitochondriach, *W. Turski, M. Gross*
4. Wewnątrzkomórkowe rybonukleazy zwierzęce i ich naturalny inhibitor, *A. Bardoń*
5. Zastosowanie warstw jednomolekularnych w badaniu kwasów nukleinowych, *M. Kamieńska-Zyła*
6. Oznaczanie ciężaru cząsteczkowego białek za pomocą sączenia molekularnego, *Korniszewski, A. Krotkiewski*

*L. Jaroszewicz
janowski*

Errata do Post. Biochem. 13, (1967).

Na str. 87 pod rys. 2 zamiast (61) winno być (27).

Postępy biochemii

March 1967

ARTICLES IN POLISH

Volume 13

Number 2

K. L. Wierzchowski — Photochemistry of Nucleic Acids (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci. Warszawa)	127
S. Paszyc — Photochemistry of Flavins (Dep. Photochem. Univ. Poznań) . .	161
I. Pietrzykowska — Biological Effects of UV-Radiation in Microorganisms (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci. Warszawa)	171
J. Sławiński — Chemiluminescence in Biology (Dep. Gen. Chem. School Agricult. Szczecin)	191
A. Zurzycka — Lumisynthesis (Dep. Plant Physiol. Pol. Acad. Sci. Kraków)	217
J. Zurzycki — The Influence of Light on The Structure of Photosynthetic Apparatus (Dep. Plant Physiol. Univ. Kraków)	233
S. Więckowski — Chlorophyll Forms in vivo and Their Function in Photosynthesis (Dep. Plant Physiol. Univ. Kraków)	261
J. W. Szarkowski, T. Gołaszewski — The Molecular Structure of Chloroplasts and The Light (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci. Warszawa) :	276
W. Ostrowski — Leon Marchlewski	293
Chronicle	299

Należy podawać kolejno: L. p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginalnej), 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

K. L. Wierzchowski — Fotochemiczne przemiany kwasów nukleinowych	127
S. Paszyc — Fotochemia związków flawinowych	161
I. Pietrzykowska — Biologiczne skutki promieni UV u mikroorganizmów	171
J. Sławiński — Chemiluminescencja w biologii	191
A. Zurzycka — Lumisynteza	217
J. Zurzycki — Wpływ światła na strukturę aparatu fotosyntetycznego . .	233
S. Więckowski — Formy chlorofilu in vivo i ich rola w fotosyntezie . .	261
J. W. Szarkowski, T. Gołaszewski — Molekularna struktura chloroplastów a światło	275
W. Ostrowski — Leon Marchlewski: Jedność świata roślin i zwierząt (w 20-lecie śmierci)	293
Recenzje książek (S. Lewak, M. Sarnecka-Keller)	299
Komunikaty	305