

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1969
tom 15
nr 3

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 *Postępkach 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 tytuły naukowe wraz z nazwami placówek naukowych, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz omówienie tematu pracy w języku angielskim (najwyżej 5 wierszy maszynopisu).

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

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

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

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

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

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

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

H. Rodé

PPOLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1969
tom XV
zeszyt 3

KWARTALNIK

PPAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: B. Filipowicz (Łódź)

*Członkowie: J. Chmiel (Poznań), W. Gajewski (Warszawa),
Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen
(Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), T. Szczepkowski (Kra-
ków), J. Trojanowski (Lublin), K. L. Wierzchowski (War-
szawa)*

Komitet Redakcyjny

Redaktor — Zofia Lassota

Sekretarz — Marią Monika Jeżewska

Adres Redakcji

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

PANSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1969

Nakład 2050 (1923 + 127)	Oddano do składania 29.IV.1969 r.
Ark. wyd. 11,0, ark. druk. 10,25	Podpisano do druku we wrześniu 1969 r.
Papier druk. sat. kl. V, 70×100	Druk ukończono w październiku 1969 r.
Cena zł 29.--	Zam. nr 903/69. P-79

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

TOMASZ GOŁASZEWSKI *, JAN W. SZARKOWSKI **,
MARTA RYTEL ***

Biochemia powstawania i rozwoju mitochondriów

Biochemistry of Genesis and Development of Mitochondria

Review of biochemical data on biogenesis and development of mitochondria is presented

Mitochondria nie są wąsko wyspecjalizowaną organellą przeprowadzającą jedynie procesy utlenień komórkowych. Obok pełnienia tej podstawowej funkcji są one zdolne do syntezy białek, kwasów nukleinowych i przynajmniej niektórych tłuszczowców. Nie ulega też wątpliwości udział mitochondriów w procesach dziedziczenia pozachromosomalnego. W związku z tym uważa się mitochondria za twory półautonomiczne, podobnie jak chloroplasty (26, 28, 94). Mimo dość wszechstronnych zdolności metabolicznych, mitochondria najprawdopodobniej nie są w stanie zaspokoić własnych potrzeb na większość anabolitów niezbędnych do wykształcenia struktury mitochondrium, warunkującej jego prawidłowe działanie w komórce. Rozwój mitochondrium byłby zatem zależny od metabolizmu całej komórki. Punktem wyjścia w badaniach nad genezą i rozwojem mitochondriów jest poznanie miejsca syntezy ich składników. Głównym celem natomiast jest wyjaśnienie sposobu powstawania mitochondrium. Rozpatrywano trzy możliwości: genezę mitochondriów na drodze autoreplikacji — poprzez podziały organelli, rozwój z innych struktur komórkowych w procesie nazwanym przez André (1) neoformowaniem i wreszcie genezę *de novo*.

Pochodzenie błon mitochondrialnych jest stosunkowo mało znane. Wynika to, między innymi, z faktu, że mitochondria charakteryzują się dość daleko posuniętym polimorfizmem (1), co sprzyjało wysuwaniu poglądów (opartych na obserwacjach cytologicznych) o bezpośrednim związku błon mitochondrialnych na przykład z błoną jądra komórkowego

* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

** Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

*** Mgr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

(6), czy z błonami aparatu Golgiego (62). Przegląd hipotez na ten temat można znaleźć w artykułach Roulliera (73), Novikoffa (62) Tragera (90) i André (1).

W procesie powstawania mitochondrium najistotniejsze jest miejsce łączenia się podstawowych składników organelli: lipidów i białek, w wyniku czego powstają określone systemy błon czyli zawiązki strukturalne mitochondriów. Jak podkreśla Yotsuyanagi (107), liczne dane świadczą, że w czasie rozwoju embrionalnego organizmów roślinnych i zwierzęcych wzrostowi aktywności oddechowej komórek towarzyszy zawsze równoległy wzrost masy mitochondriów — komórki embrionalne wykazują słabe oddychanie i mają słabo rozwinięte mitochondria. Dlatego też powstawanie związków mitochondrialnych musi być ściśle związane z formowaniem się wieloskładnikowego łańcucha oddechowego i jego zespoleniem z aparatem fosforylującym. Według opinii Borsta i wsp. (9), najprostsze byłoby założenie, że łańcuch oddechowy powstaje w samorzutnym procesie łączenia się jednostek monometrycznych, których własności określałyby zarówno kolejność etapów tego procesu, jak też regulowałyby określoną stechiometrię układu.

Dane cytologiczne uzyskane za pomocą mikroskopu elektronowego wskazują, że mitochondria, podobnie jak plastydy, rozwijają się z kulistych tworów o średnicy około 1000 Å, odszczepiających się od organelli macierzystej (24, 26, 45). Twory te, otoczone podwójną błoną, wypełnione są szczelnie stromą. Błona wewnętrzna tworzy — na drodze inwaginacji — uchyłki skierowane ku wnętrzu promitochondrium, które stanowią zaczątki grzebieni mitochondrialnych (łacińskie *cristae mitochondriales*). Wtedy właśnie promitochondrium zaczyna ulegać morfogenezie doprowadzającej do powstania dojrzałego mitochondrium. W czasie wzrostu mitochondrium i różnicowania się jego struktury zmieniają się stosunki ilościowe między poszczególnymi składnikami organelli wchodzącymi też w skład błon mitochondrialnych. Goldhor (27) zauważył na przykład, że we wczesnych stadiach rozwojowych zarodków kurczenia mitochondria wątroby wykazują nietypowy dla mitochondriów dojrzałych stosunek ilościowy tłuszczów do białek. Zdaniem Lucka (51) zmiany tego stosunku podczas rozwoju organelli są odzwierciedleniem zmiany natężenia procesów syntezy tych składników w różnych stadiach rozwojowych mitochondrium.

Istotne jest również filogenetyczne pochodzenie błon mitochondrialnych. Według Frey-Wysslinga (24), wewnętrzne błony mitochondrialne reprezentują sobą — w aspekcie filogenezy — struktury homologiczne z plazmolemmą czyli błoną komórkową. Błony te byłyby otaczane w czasie rozwoju mitochondrium przez błony gładkie endoplazmatycznego reticulum. Na podobieństwo zewnętrznych błon mitochondrium do błon reticulum endoplazmatycznego zwracali uwagę Sottocasa i wsp. (79) oraz Beattie (4). Błony reticulum prawdopodobnie nie mają

związku genetycznego z plazmolemmą (24). Mitochondria występują, jak wiadomo, u posiadających jądro komórkowe organizmów eukariotycznych. Organizmy prokariotyczne, w tym bakterie, nie wykształcają struktur mitochondrialnych. Układ oddechowy u bakterii tlenowych zlokalizowany jest w błonach plazmatycznych. Szerszy opis tego układu można znaleźć w artykule przeglądowym Zagórskiego (108). Zespoły błon grupujących enzymy oddechowe u bakterii nazwano mezosomami (23). Byłyby one układami pochodzącymi również z plazmolemmy. Jest więc prawdopodobne, że mezosomy organizmów prokariotycznych stanowią filogenetycznie pierwotniejsze stadium rozwojowe wewnętrznych błon mitochondrialnych.

Najnowsze wyniki wskazują, że w procesie rozwoju mitochondrium synteza błony zewnętrznej organelli, a także synteza nierozpuszczalnych białek jej błon wewnętrznych są niezbędnymi etapami dla zapoczątkowania procesu wypełniania zawiązków mitochondrialnych białkami rozpuszczalnymi (4).

Zagadnienie zestawu enzymów w zawiązkach mitochondrialnych nie jest dotychczas wyjaśnione. Zgodnie z danymi Schatza (75), zawiązki te u drożdży hodowanych w warunkach beztlenowych wykazują obecność jedynie dehydrogenazy bursztynianowej. Cytochromy natomiast pojawiają się dopiero w warunkach dostępu tlenu, kiedy zawiązki mitochondrialne przekształcają się w mitochondria. Według Hensona i Mahlera (31), niedojrzałe mitochondria drożdży hodowanych w warunkach tzw. represji glukozowej (tzn. w obecności glukozy w pożywce wzrostowej, gdy głównym szlakiem metabolicznym staje się fermentacja, co doprowadza do zahamowania syntezy enzymów oddechowych i wstrzymania rozwoju mitochondriów (107)) zawierają oksydazę cytochromową. Jednakże nawet dojrzałe mitochondria mogą zawierać niekompletny zestaw enzymów. Zgodnie bowiem z wynikami Evansa i Lloyda (22) możliwa jest indukcja enzymów utleniających propioniany w rozwiniętych mitochondriach wiciowca *Polytomella caeca*.

Niezwykle interesującym obiektem badań nad rozwojem mitochondriów okazał się glon *Euglena gracilis*. Lefort (45) przeprowadziła niedawno badania enzymatyczne i cytologiczne nad wpływem warunków oświetlenia hodowli tego glonu (szczepu Z) na mitochondria i plastydy. Okazało się, że podczas długotrwałej etiolacji (6 tygodni zaciemnienia) komórek, kiedy następuje zahamowanie procesów fotosyntezy i zanikanie struktury chloroplastów, zwiększa się parokrotnie aktywność oddechowa komórek i równocześnie zachodzi niezwykle wzrost objętości i masy mitochondriów. Po powtórnym oświetleniu kolonii glonu procesy te przebiegają w odwrotnym kierunku. Obserwacje dokonane przez Lefort (45) zarówno metodami biochemicznymi, jak też przy użyciu mikroskopu elektronowego, wykazały po raz pierwszy, że w komórce *E. gracilis* istnieje pewna zależność metaboliczna między plastydami i mitochon-

driami. Wydaje się, że ma ona charakter kompensacyjny zarówno pod względem strukturalnym jak i metabolicznym. Niewyjaśniony mechanizm regulacyjny działający zapewne na poziomie ponadorganelowym nadawałby właściwy w danych warunkach kierunek przemian. Rolę tę mogłyby pełnić geny chromosomalne, które — zgodnie z opinią wyrażoną przez Borsta i wsp. (9) — warunkują w dużej mierze rozwój struktur mitochondrialnych, między innymi dostarczając informacyjnego RNA. Translacja tego RNA mogłaby się dokonywać bądź w mitochondriach, bądź też poza nimi (9). Ilość DNA obecnego w tych organellach jest bowiem zbyt mała, aby informacja genetyczna w nich zawarta mogła dotyczyć wszystkich białek mitochondrialnych (9, 106).

I. Aktywność metaboliczna mitochondriów i miejsce syntezy ich składników

Wiadomo dziś, że mitochondria uczestniczą w syntezie białek (18, 40, 41, 42, 50, 66, 68, 70, 71, 87, 106), RNA (7, 47, 60, 74, 101, 103), DNA (38), porfiryn (86) oraz niektórych tłuszczowców (11, 21, 99), przede wszystkim kwasów tłuszczowych (2) i lecytyn (11, 99).

Badania wielu autorów wykazały (5, 40, 41, 42, 43, 69, 72, 91, 102, 106), że izolowane mitochondria włączają znakowane aminokwasy przede wszystkim do białek nierozpuszczalnych, względnie lipoproteidów, związanych najprawdopodobniej z błonami mitochondrialnymi. W porównaniu z nimi białka rozpuszczalne, w tym również niektóre enzymy, znakują się aminokwasami znacznie słabiej (43, 72). Wskazywałoby to na istnienie w mitochondriach dwóch odmiennych puli białkowych. Przeprowadzane próby rozdziału i oczyszczania poszczególnych podfrakcji strukturalnych mitochondrium oraz ich enzymatyczna charakterystyka (12, 63, 79, 92, 95) wskazują, że najintensywniej włącza aminokwasy frakcja błon wewnętrznych mitochondrium (61, 79, 105). W podfrakcji tej zlokalizowane są — obok białek strukturalnych — nierozpuszczalne enzymy łańcucha oddechowego (79).

Dodatkowe informacje o syntezie określonych białek enzymatycznych w mitochondriach uzyskano w doświadczeniach na tzw. małym mutancie drożdży, odkrytym i opisanym przez Ephrussiego (19, 20). Mitochondria tego mutantu charakteryzują się niewydolnością oddechową. Nie stwierdzono w nich obecności niektórych nierozpuszczalnych białek enzymatycznych, na przykład cytochromów *a*, *a*₃ i *b*; zawierają one natomiast rozpuszczalne enzymy cyklu kwasów trójkarboksylowych i cytochrom *c*. Ponieważ mitochondria „małego mutantu” charakteryzują się niedoborem, a być może zupełnym brakiem DNA (16), bądź też mają DNA odmienny niż mitochondria szczepu dzikiego drożdży (57), można

wnioskować o tym, które enzymy są syntetyzowane pod kontrolą DNA mitochondrialnego. Podobne wnioski można wyciągnąć również z doświadczeń Clark - Walkera i Linnane'go (14). Zaobserwowali oni, że w obecności chloramfenikolu, hamującego u drożdży syntezę białek jedynie w mitochondriach, znakowane aminokwasy nie włączały się do cytochromów *a*, *a₃* i *b*. Spostrzeżenie to odnośnie oksydazy cytochromowej potwierdzili też Henson i Mahler (31). Ich zdaniem, w wyniku mutacji cytoplazmatycznej uniemożliwiona jest transkrypcja mitochondrialnego DNA. Działanie chloramfenikolu polegałoby na hamowaniu translacji materiału genetycznego na rybosomach mitochondrialnych.

Kadenbach (34) stwierdził preferencyjne włączanie znakowanych aminokwasów do białek strukturalnych organelli i próbował wykazać doświadczalnie transport pewnych białek z mikrosomów do mitochondriów. Kiedy włączano znakowane aminokwasy do mitochondriów *in vitro*, wówczas we frakcji białek rozpuszczalnych (organelli) wykrywano jedynie około 10% piętna. Natomiast mitochondria izolowane ze skrawków wątroby szczura, inkubowanych uprzednio ze znakowanymi aminokwasami, zawierały we frakcji białek rozpuszczalnych niemal połowę włączanego piętna. Radioaktywność wykazywały, między innymi, dehydrogenaza jabłczanowa i glutaminianowa, kinaza adenylanowa oraz aminotransferaza asparaginianowa; enzymy związane z błonami mitochondrialnymi, jak cytochrom *a* i dehydrogenaza bursztynianowa, nie ulegały znakowaniu. Po inkubacji mitochondriów wraz z mikrosomami w środowisku zawierającym znakowane aminokwasy, piętno znajdowało się w białkach mitochondrialnych, występujących w przestrzeniach międzygrzebieniowych (między innymi w cytochromie *c* i kinazie nukleozydodwufosforanowej). Po takiej inkubacji Kadenbach (35) stwierdzał znacznie mniejszą radioaktywność białek mikrosomów, w porównaniu z radioaktywnością wykrywaną po inkubacji samych mikrosomów. Jednakże znakowane białka rozpuszczalne wyizolowane z mikrosomów nie wbudowywały się do wyizolowanych mitochondriów. Sugerowałoby to, że obecność nienaruszonych mikrosomów jest niezbędną dla prawidłowego transportu.

Tak więc Kadenbach wykazał po raz pierwszy, że możliwy jest transport niektórych białek z mikrosomów do mitochondriów. Do wyjaśnienia pozostawałaby jednak kwestia samego mechanizmu takiego transportu (33). Nie wiadomo, czy odbywa się on w każdym stadium rozwojowym mitochondrium. Wiadomo jednak, że do jego przebiegu niezbędny jest GTP. Zdaniem Kadenbacha (34), podczas przemieszczania się białek w komórce, dochodzi do przejściowego wiązania się rybosomów z błonami mitochondrium. Autor ten w innej pracy (35) wspominał o możliwości transportu poprzez błony mitochondrialne łańcuchów polipeptydowych cytochromu *c* zsyntetyzowanych uprzednio na rybosomach hialoplazmatycznych.

Wyniki Kadembacha (34) znalazły potwierdzenie w pracy Beattie (4). Autorka badała rozmieszczenie piętna znakowanych aminokwasów w trzech frakcjach białkowych mitochondrium — rozpuszczalnej w wodzie, rozpuszczalnej w roztworze chlorku potasu oraz we frakcji białek nierozpuszczalnych. Białka te autorka wyodrębniała z mitochondriów znakowanych uprzednio ^{14}C -leucyną *in situ* w skrawkach wątroby szczura. Rozpuszczalne w wodzie białka mitochondriów znakowały się po 30 minutowym opóźnieniu (ang. *lag period*), czego nie obserwowano w przypadku białek rozpuszczalnych w roztworze soli. Po dodatkowej inkubacji skrawków z nieznakowaną leucyną, autorka zaobserwowała spadek radioaktywności we frakcji białek nierozpuszczalnych a wzrost aktywności właściwej białek rozpuszczalnych, czemu towarzyszył spadek aktywności białek mikrosomalnych. Zdaniem autorki (4) przemawiałoby to za możliwością transportu białek rozpuszczalnych z mikrosomów do mitochondriów.

Beattie (4) wykorzystała w swych badaniach właściwość różnicowego działania chloramfenikolu (5, 48, 49) i cykloheksimidu (5, 50) na procesy włączania aminokwasów do białek mitochondriów i mikrosomów. Chloramfenikol hamuje, mianowicie, włączanie aminokwasów do białek syntetyzowanych w mitochondriach u organizmów wyższych, nie wpływa natomiast na proces syntezy białek w mikrosomach. Odwrotnie — cykloheksimid nie hamuje syntezy białek w mitochondriach, blokuje natomiast tę syntezę w mikrosomach. W ten sposób można odróżnić obydwie procesy. Gdy po wstępnej inkubacji skrawków wątroby z chloramfenikolem (w niskim stężeniu) inkubowano je ze znakowaną leucyną bez dodatku antybiotyku, następowało silne zahamowanie włączania leucyny do mitochondrialnych białek nierozpuszczalnych a jedynie nieznaczne obniżenie włączania do białek rozpuszczalnych tej organelli i do białek mikrosomów. Autorka zwróciła uwagę na zależność włączania aminokwasów do białek nierozpuszczalnych mitochondrium od jego aktywności oddechowej. Wyniki te wskazywały, że białka rozpuszczalne mitochondriów i białka mikrosomalne syntetyzują się we wspólnym układzie, najprawdopodobniej w hialoplazmie. Podobny wniosek nasuwa się z doświadczeń prowadzonych przez Beattie (4) z użyciem cykloheksimidu. Kiedy do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej znakowaną leucynę dodano cykloheksimid, wówczas obserwowano jednakowo silne zahamowanie (około 90%) włączania piętna do białek mikrosomalnych i rozpuszczalnych białek mitochondrialnych, znacznie słabsze natomiast — do białek mitochondrialnych nierozpuszczalnych w soli.

Coraz więcej danych przemawia więc za słusznością przypuszczenia, że białka mitochondrialne pochodzą częściowo z puli białek syntetyzowanych na rybosomach hialoplazmatycznych, a częściowo — syntetyzowane są wewnątrz mitochondrium, być może przy udziale własnego RNA informacyjnego (15, 104).

Zdaniem W o r k a i wsp. (106), około $2/3$ ogólnej ilości białek zawartych w mitochondriach syntetyzuje się poza mitochondriami, a pozostała część — wewnątrz organelli, choć nie jest wykluczone, że te ostatnie białka mogą być syntetyzowane częściowo przy udziale informacyjnego RNA pochodzącego z jądra komórkowego*.

II. Podziały mitochondriów

Potwierdzeniem hipotezy o powstawaniu mitochondriów na drodze podziałów preegzystujących organelli są wyniki prac L u c k a (51, 52, 53, 54). Hodując wymagającego choliny mutanta grzyba *Neurospora crassa* na pożywce zawierającej radioaktywną cholinę, L u c k stwierdził (53), że piętno wbudowuje się do lipidów mitochondrialnych i pozostaje tam przez długi okres czasu. Stosunek radioaktywności lipidów do ilości białek mitochondrialnych oznaczany w różnych okresach wzrostu hodowli *Neurospora crassa* może być wskaźnikiem prędkości przyrostu masy mitochondriów. L u c k (53) zaobserwował ścisłą korelację między spadkiem tego stosunku spowodowanym przyrostem białka mitochondrialnego a wzrostem masy kolonii tego organizmu.

Gęstość mitochondrium u *Neurospora crassa*, uwarunkowana wielkością organelli, jest zależna od stężenia choliny w pożywce. Przy małej zawartości choliny (np. $1 \mu\text{g/ml}$) w pożywce wykształcają się mitochondria „gęste”, przy dużej ($10 \mu\text{g/ml}$) — mitochondria „lekkie”. Mitochondria o różnej gęstości można rozdzielić na drodze wirowania całej populacji mitochondriów w ciągłym gradiencie sacharozy (51, 54). L u c k (54) zmieniając stężenie znakowanej choliny w pożywce śledził zmiany gęstości mitochondriów i badał rozmieszczenie piętna w poszczególnych typach mitochondriów. Równomierne rozmieszczenie piętna choliny w całej populacji mitochondriów u organizmów pozostających w logarytmicznej fazie wzrostu (kiedy zachodzi intensywne namnażanie mitochondriów) nasuwa przypuszczenie o replikacji preegzystujących organelli; w przypadku syntezy mitochondriów *de novo* musiałoby bowiem dochodzić do nagromadzenia się piętna w określonej części populacji mitochondriów. W doświadczeniach L u c k a (54), zwiększeniu stężenia choliny w pożywce towarzyszyło stopniowe zmniejszanie się gęstości całej populacji mitochondriów, co było odbiciem wzrostu wielkości poszczególnych mitochondriów. W komórkach zanikały wówczas mitochondria „gęste”, wykształcające się przy niskim stężeniu choliny. Świadczyłoby to, zdaniem L u c k a (54), że mitochondria ulegają podziałom. Jeśli bowiem mitochondria miałyby powstawać *de novo* z niskocząsteczkowych prekursorów, wówczas po zwiększeniu stężenia choliny w pożywce należałoby oczekiwać w komórkach grzyba *Neurospora crassa* obecności zarówno mitochondriów „gęstych” jak i „lekkich”. Usunięcie znakowanej

* Patrz addendum na końcu artykułu.

choliny z pożywki doprowadzało do równomiernego spadku radioaktywności we wszystkich mitochondriach, co było wyrazem tzw. niekonserwatywnego rozproszania piętna w coraz większej liczbie powstających organelli. Gdyby dochodziło do tzw. konserwatywnego rozproszania piętna w populacji mitochondriów, wyjściową radioaktywność wykazywałyby jedynie nieliczne mitochondria stanowiące coraz mniejszą część populacji mitochondriów komórki, w miarę powstawania *de novo* organelli pozbawionych piętna.

Przedstawione prace Lucka (51, 52, 53, 54) pozostają w zgodzie z obserwacjami dokonanyimi za pomocą mikroskopu elektronowego (3) potwierdzającymi podziały mitochondriów. Jednak pewne dane wskazują na możliwość powstawania mitochondriów ze struktur pozamitochondrialnych lub nawet *de novo*. Greenawalt i Hall (30) obserwowali na przykład zjawisko wykształcenia się mitochondriów z prostych struktur plazmatycznych w kielkujących konidiach grzyba *Neurospora crassa*. Podobne obserwacje poczynili Wallace i Linnane (97) oraz Linnane i wsp. (48, 49), którzy badając biogenezę mitochondriów u drożdży stwierdzili, że w warunkach beztlenowych komórki tego organizmu nie wykazują obecności struktur mitochondrialnych. Typowe mitochondria rozwijałyby się, według tych badaczy, z prostych kanalików cytoplazmatycznych po udostępnieniu tlenu komórkom. W tlenowych warunkach zaobserwowano zwiększoną syntezę enzymów oddechowych i RNA (25). Zgodnie jednak z opinią wyrażoną niedawno przez Wallace'a i wsp. (96) na podstawie badań własnych i innych autorów, obecność tlenu nie jest jedynym czynnikiem określającym zdolność komórek drożdży do tworzenia mitochondriów. Na zdolność tę wpływa bowiem również skład pożywki: glukoza doprowadza do zahamowania rozwoju mitochondriów (tzw. represja kataboliczna (107)), natomiast nienasycone kwasy tłuszczowe i ergosterol umożliwiają komórkom wykształcenie struktur mitochondrialnych a także innych struktur błonowych, nawet w warunkach beztlenowych**.

Wydaje się, że pogląd o genezie mitochondriów ze struktur pozamitochondrialnych wymaga rewizji. Nie jest bowiem wykluczone występowanie jakichś zawiązków organellowych zawierających informację genetyczną, której realizacja rozpoczynałaby się w odpowiednich warunkach fizjologicznych bądź ekologicznych. Teoretycznie można nawet założyć, że najbardziej pierwotną formą zawiązków organellowych byłyby odpowiednie nici informacyjnego kwasu dezoksyrybonukleinowego.

III. Podziały mitochondriów a cykl podziałowy komórek

Zagadnienie to jest istotnym punktem w badaniach nad biogenezą mitochondriów. Wiadomo już dzisiaj, że DNA mitochondriów stanowi

** Patrz addendum na końcu tego artykułu.

odmienną niż DNA jądrowy pulę kwasu dezoksyrybonukleinowego w komórce. Wskazywałyby na to odmienne własności fizyko-chemiczne tego DNA (16, 17, 57, 98), a także kształt jego cząsteczek: wykrywano mitochondrialny DNA o kuliście zamkniętych łańcuchach (8, 77), jak też replikacyjne formy rozwidlonych nici DNA (39). Stwierdzono (38), że w mitochondriach występuje polimeraza DNA wymagająca obecności mitochondrialnej matrycy do optymalnego działania. Wysunięto nawet przypuszczenie, że możliwy jest transport DNA z mitochondriów do jądra w fibroblastach kurczęcia (13).

Jeśli udałooby się wykazać, że synteza mitochondrialnego DNA nie jest ściśle skorelowana z syntezą DNA jądrowego, uzyskalibyśmy dodatkowy dowód przemawiający za hipotezą o autonomii metabolicznej mitochondriów i o ich genetycznej ciągłości. To z kolei sugerowałoby możliwość autoreplikacji mitochondriów.

Synteza DNA chromosomalnego nie jest równomierna w czasie całego cyklu podziałowego komórki. Odbywa się ona jedynie w określonym momencie interfazy, w tzw. fazie S (81). Synteza mitochondrialnego DNA w tym względzie nie jest jeszcze wyjaśniona. Neubert i wsp. (59) oraz Nass (58) uważają, że metabolizm DNA mitochondriów *in vivo* jest znacznie intensywniejszy niż DNA jądrowego. Parsons (64) stwierdzał włączanie znakowanej tymidyny do DNA mitochondriów w ciągu całego cyklu podziałowego komórki *Tetrahymena pyriformis*, czego nie obserwuje się w przypadku DNA jądrowego. Badania Parsonsa i Rustada (65) nad włączaniem znakowanej tymidyny do DNA mitochondriów wykazały ponadto, że wszystkie mitochondria pozostają znakowane przynajmniej przez kilka generacji komórek. Wskazywałoby to na dużą stabilność DNA mitochondrialnego i jego ciągłość genetyczną, co przemawia z kolei za replikacją mitochondriów.

Scopes i Williamson (76) zaobserwowali gwałtowne zwiększenie zużycia tlenu przez drożdże bezpośrednio po okresie podziałów komórkowych. Zdaniem tych autorów (76) mogłoby to świadczyć, że zwiększenie ilości mitochondriów — a co za tym idzie również replikacja ich DNA — ma miejsce właśnie w tej fazie rozwoju komórek (u których przyrost masy jest równomierny w czasie).

James (32) badał intensywność pobierania tlenu przez tzw. zsynchronizowane kolonie pierwotniaka z rodzaju *Astasia*. Kolonie zsynchronizowane zawierają dużą ilość komórek znajdujących się w tej samej fazie podziałowej; stan taki osiąga się sztucznie poprzez odpowiednie zmiany temperatury hodowli. Autor zaobserwował gwałtowny wzrost zużycia tlenu na początku tzw. okresu ciepłego odpowiadającego profazie (okres przedpodziałowy) większości komórek w kolonii, jednak powolne zwiększanie intensywności pobierania tlenu dało się zauważyć również i w ciągu okresu zimnego (okres podziałowy) Kahn i Blum (36, 37) stwierdzili, że w okresie ciepłym rozwoju hodowli *Astasia* zwiększa

sza się synteza białek mitochondrialnych. Miarą tej syntezy była intensywność włączania znakowanego ^{35}S -siarczanu do reszt cysteiny. Autorzy są zdania, że istnieje ścisła zależność między natężeniem syntezy białek w całej komórce i w mitochondriach. A zatem istniałaby współzależność cyklu podziałowego komórki i mitochondrium. Tezę taką popierają obserwacje Manton (55) oraz Manton i Parke (56), którzy stwierdzili, że wielkość pojedynczego mitochondrium w komórce wiciowca *Micromonas* podwaja się z taką prędkością, że w okresie cytokinezy może on ulec podziałowi. Badania Kroona (43) wskazują na zależność między syntezą białek mitochondrialnych regenerującej wątroby szczura i aktywnością mitotyczną komórek tego narządu po częściowej hepatektomii: najwięcej aminokwasów wbudowywało się do białek mitochondrialnych między 30 i 45 godziną po operacji, a więc wtedy, gdy obserwuje się również najwyższą aktywność mitotyczną komórek. Podobne wnioski nasuwają obserwacje Breidenbacha i wsp. (10), którzy stwierdzili zwiększoną aktywność oddechową, co można uważać za odzwierciedlenie zwiększonej syntezy mitochondriów, w okresie kiełkowania nasion, kiedy podziały komórek odbywają się również intensywnie.

Ostatnie doświadczenie Parsonsa i Rustada (65) potwierdzają poprzednie wyniki uzyskane na *Tetrahymena pyriformis* (64); DNA mitochondrialny tego organizmu znakuje się tymidyną bez względu na fazę cyklu podziałowego komórki; wbudowywanie tymidyny zachodzi nawet wtedy, gdy synteza DNA jądrowego jest wstrzymana, to znaczy w czasie podziałów komórkowych. Jednakże włączanie tymidyny do DNA mitochondriów jest znacznie intensywniejsze wówczas, gdy zachodzi synteza DNA jądrowego, to znaczy w okresie interfazy. Świadczyłoby to o istnieniu wspólnego dla mitochondriów i jądra komórkowego mechanizmu regulującego syntezę DNA.

Z badań Smitha i wsp. (78) wynika, że synteza DNA mitochondrialnego, podobnie jak DNA jądrowego, odbywa się w sposób cykliczny. Porównanie stosunków ilości DNA mitochondrialnego do ilości DNA w całej komórce w różnych stadiach jej życia wskazuje, że intensywna synteza DNA mitochondrialnego nie zachodzi jednocześnie z najintensywniejszą syntezą DNA jądrowego. Autorom udało się bowiem uchwycić moment, gdy powyższy stosunek ulegał gwałtownemu wzrostowi. Obserwowali oni również momenty w cyklu podziałowym komórki, w których synteza kwasów dezoksyrybonukleinowych obu puli była wstrzymana, lub zahamowana była jedynie synteza DNA mitochondrialnego. W tym ostatnim przypadku następował spadek stosunku ilości DNA mitochondrialnego do DNA całej komórki. Dane Smitha i wsp. (78) wskazywałyby również na pewną niezależność replikacji DNA mitochondrialnego.

Interesujące badania przeprowadzono nad metabolizmem DNA w tak zwanych kinetoplastach pierwotniaka z rodzaju *Leishmania*. Kinetopla-

sty — organelle typowe dla wiciowców z rzędu *Kinetoplastida* — mogą być uważane za mitochondria bogate w DNA (82, 83, 84). Za pomocą niektórych barwników, na przykład akryflawiny, można otrzymać populację kinetoplastów pozbawionych DNA, nie posiadających grzebieni mitochondrialnych (84). W obecności akryflawiny następuje selektywne wstrzymanie replikacji DNA w kinetoplastach, bez wstrzymania syntezy DNA jądrowego. Po kilku pokoleniach uzyskuje się tzw. komórki dyskinetoplastowe, zawierające kinetoplasty pozbawione DNA. Właśnie w tych komórkach zaobserwowano nie tylko podziały jąder, ale również podziały zmutowanych kinetoplastów (82, 83, 84), co mogłoby wskazywać na istnienie wspólnego mechanizmu regulującego podziały obu organeli.

Bez względu na zakres autonomii procesów replikacji DNA w mitochondriach, a zatem i innych szlaków metabolicznych, organelom tym przypisuje się pewną rolę w przekazywaniu informacji genetycznej. Zagadnienie to szeroko omówił Wilkie (100). Tutaj przytoczymy wyniki Tuppy'ego i Wildnera (93), którzy za pomocą akryflawiny pozbawiali drożdże aktywności oddechowej i następnie próbowali aktywność tę przywracać. Gdy sferoplasty uzyskane z tak uszkodzonych komórek inkubowano w odpowiednich warunkach z mitochondriami pochodzącymi z komórek drożdży normalnie oddychających, wówczas około 30% sferoplastów uzyskiwało aktywność oddechową. Transformacja ta była dziedziczna, a zatem mitochondria nie tylko przenosiły informację genetyczną, ale również przekazywały ją innym komórkom. Podobny wniosek nasuwają wyniki Thomasa i Wilkie'go (88); zaobserwowali oni, że w warunkach ściśle beztlenowych w krzyżowanych komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* dochodzi do wymiany segmentów DNA między zawiązkami mitochondrialnymi, dzięki czemu pewne zawiązki uzyskują cechę odporności na niektóre antybiotyki.

IV. Uwagi końcowe

Hipoteza o powstawaniu mitochondriów na drodze podziałów preegzystujących organeli i przekazywaniu ich następnie komórkom potomnym w czasie mitozy, znajduje coraz większe uznanie. Coraz więcej danych przemawia za słusznością przypuszczenia, że procesy syntezy składników mitochondrium znajdują się pod kontrolą zarówno genomu jądrowego jak i genomu mitochondrialnego.

Obok ontogenezy mitochondriów duże zainteresowanie budzi ich filogeneza. Przypuszczano, że wiele światła na to zagadnienie rzuci zbadanie wzajemnego stosunku mitochondriów i plastydów. Guilliermond sądził, że niektóre formy mitochondriów przekształcają się w plastydy. Mitochondria stanowiąc zasadniczo inną niż plastydy linię roz-

wojową chondriomu roślinnego zachowywałyby swoją indywidualność w ontogenezie komórek, pozostawałyby jednak w pewnych związkach filogenetycznych z plastydami. Można nawet sądzić, że brak chloroplastów u roślin nie zawierających chlorofilu byłby wyrazem *sui generis* degradacji rozwojowej komórek wynikającej z przystosowania się tych organizmów do heterotrofizmu (29).

Istnieje wiele istotnych podobieństw między mitochondriami a chloroplastami. Na przykład promitochondria i proplastydy występujące w merystemie zawiązków liścia u *Bryophyllum* są morfotycznie niemal identyczne (45). Podobieństwo uorganizowania błon, czy nawet pewna analogia między cząstkami elementarnymi mitochondriów (czyli jednostkami oddechowymi) i kwantasomami chloroplastów (morfotycznymi jednostkami fotosyntezy), jako integralnymi składnikami kryst mitochondrialnych i lamelli plastydialnych, nie zamyka rejestru zbieżności między tymi organellami. Mitochondria, podobnie jak plastydy zielone, są najprawdopodobniej wyposażone w rybosomy podobne do rybosomów bakteryjnych a zarazem odmienne od rybosomów cytoplazmatycznych komórek organizmów wyższych. O ile rybosomy cytoplazmatyczne o stałej sedymentacji 80S zawierają 16S i 25S RNA (u roślin) lub 18S i 29S RNA (u zwierząt), o tyle rybosomy organelli, mitochondriów i plastydów, a także rybosomy bakteryjne, wykazujące stałą sedymentacji 70S, zawierają RNA o stałej sedymentacji 16S i 23S. (44, 49, 80, 85).

Wrażliwość mitochondrialnego i plastydialnego systemu syntezy białek na chloramfenikol (26, 44), czy też kolisty kształt cząsteczek DNA (17, 77) upodabniają również te organelle do bakterii. Należy tu dodać, że już pół wieku temu Portier (67) wysunął hipotezę popartą później przez Lehningera (46), w myśl której mitochondria wywodziłyby się genetycznie z prymitywnych bakterii zespolonych endosymbiotycznie z komórką. W analogicznym ujęciu chloroplasty pochodziłyby raczej od prekambryjskich sinic (89). Jak przypomina Górski (29), hipotezę o wykształceniu się chloroplastów z endosymbiotycznie zespolonych z komórką organizmów egzogennych, wysunął rosyjski botanik Merezkowski w roku 1905.

Interesujące rozważania na temat pojawienia się mitochondriów jako tworów komórkowych opublikowali niedawno Work i wsp. (106). Zgodnie z ich poglądem, bakterie tlenowe, posiadające układ przenośników elektronowych powiązany z błonami plazmatycznymi, nie wymagały mitochondriów. W miarę wzrostu rozmiarów komórki w czasie jej rozwoju ewolucyjnego oraz strukturowo-funkcjonalnego komplikowania się organizmów zwiększało się równocześnie zapotrzebowanie na tlen. Jednakże znacznemu zwiększeniu objętości komórek towarzyszył stosunkowo mały wzrost powierzchni błon niezbędnych dla prawidłowego działania przenośników elektronowych. Powierzchnia istniejących błon plazmatycznych stała się niewystarczająca dla wykształcenia odpowiednio

wydajnego systemu enzymatycznego odpowiedzialnego za procesy utlenień. Stąd konieczność pojawienia się nowego jakościowo systemu błon — prekursora dzisiejszych mitochondriów. Autorzy hipotezy nie wykluczają (106), że tymi prekursorami mogły być bakterie.

Trudno przyjmować takie poglądy bez zastrzeżeń. Zdaniem Tragera (90) pochodzenie i rozwój mitochondriów można będzie lepiej wyjaśnić, gdy zostaną dobrane warunki umożliwiające prowadzenie procesów replikacji organelli komórkowych *in vitro*. Jak podkreślał Kroon (43), nie należy wykluczać możliwości, że mitochondria i organizmy prokariotyczne są systemami homologicznymi, pochodzącymi filogenetycznie ze wspólnych prastruktur. W takim ujęciu mitochondria byłyby strukturami filogenetycznie starszymi niż komórki organizmów eukariotycznych.

LITERATURA

1. André J., *J. Ultrastruct. Res. Suppl.* 3 (1962).
2. Aas M., Bremer J., *Biochim. Biophys. Acta* 164, 157 (1968).
3. Bahr G. F., Zeitler E., *J. Cell. Biol.* 15, 489 (1962).
4. Beattie D. S., *J. Biol. Chem.* 243, 4027 (1968).
5. Beattie D. S., Basford S. E., Koritz S. B., *Biochemistry* 5, 926 (1966).
6. Bell P. R., Mühlethaler K., *J. Cell. Biol.* 20, 235 (1964).
7. Borkowski T., Borkowska J., Sikorska K., Kulesza S., *Bull. Acad. Polon. Sci. Sér. Sci. Biol.* 15, 511 (1967).
8. Borst P., *Biochem. J.* 105, 37 P (1967).
9. Borst P., Kroon A. M., Ruttenberg G.J.C.M., w *Genetic Elements, Properties and Functions*, red. D. Shugar, Academic Press London-New York i PWN Warszawa, 1967, str. 81.
10. Breidenbach R. W., Castelfranco P., Criddle R. S., *Plant Physiol.* 42, 1035 (1967).
11. Bygrave F. L., Bücher T., *FEBS Letters* 1, 42 (1968).
12. Caplan A. I., Greenwalt J. W., *J. Cell Biol.* 31, 455 (1966).
13. Chevremont M., w *Cell Growth and Cell Division*, red. R.J.E. Harris, Academic Press Inc. New York 1963, str. 323 (cyt. wg 43).
14. Clark-Walker G. D., Linnane A. W., *J. Cell Biol.* 34, 1 (1967).
15. Comorosan S., Gaspar A., Sandru D., *Biochim. Biophys. Acta* 166, 394 (1968).
16. Corneo G., Moore C., Raosanadi D., Grossman L. I., Marmur J., *Science* 151, 687 (1966).
17. Cummins J. E., Rusch H. P., Evans T. E., *J. Mol. Biol.* 23, 281 (1967).
18. Das H. K., Chatterjee S. K., Roy S. C., *Biochim. Biophys. Acta* 87, 478 (1964).
19. Ephrussi B., *Nucleocytoplasmic Relations in Micro-organisms*, Clarendon Press, Oxford 1953, cyt. wg 43.
20. Ephrussi B., Slonimski P. P., *Nature* 176, 1207 (1955).
21. Erecińska M., Chojnacki T., *Post. Biochem.* 12, 535 (1966).
22. Evans D. A., Lloyd D., *Biochem. J.* 103, 21 P (1967).
23. Fitz-James P. C., *J. Biochem. Biophys. Cytol.* 8, 507 (1960).

24. Frey-Wyssling A., *Austral. J. Science* **29**, 458 (1967).
25. Fukuhara H., *Biochim. Biophys. Acta* **134**, 143 (1967).
26. Gibor A., Granick S., *Science* **145**, 890 (1964).
27. Goldhor S., *J. Cell Biol.* **37**, 823 (1968).
28. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* **10**, 491 (1964).
29. Górski F., *Fizjologia roślin*, tom I PWN Warszawa 1962, str. 593.
30. Greenawalt J. W., Hall D. O., *J. Cell Biol.* **23**, 38 A (1964).
31. Henson C. P., Mahler H. R., *Federation. Proc.* **26**, 604 (1967).
32. James T. W., *Exptl. Cell Res.* **38**, 439 (1965).
33. Kadenbach B., Abstracts of 4th FEBS Meeting, Oslo 1967.
34. Kadenbach B., *Biochim. Biophys. Acta* **134**, 430 (1967).
35. Kadenbach B., *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 651 (1967).
36. Kahn V., Blum J. J., *J. Cell Biol.* **31**, 147 A (1966).
37. Kahn V., Blum J. J., *Biochemistry* **6**, 817 (1967).
38. Kalf G. F., Ch'ih J. J., *J. Biol. Chem.* **243**, 4904 (1968).
39. Kirschner R. H., Wolstenholme D. R., Cross N. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **60**, 1466 (1968).
40. Kroon A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 184 (1963).
41. Kroon A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 391 (1963).
42. Kroon A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 165 (1963).
43. Kroon A. M., w *Protein in Mitochondria*, Academisch Proefschrift, Universiteit van Amsterdam 1966, Drukkerij Noordholland, N. V. Hoorn, str. 39.
44. Küntzel H., Noll H., *Nature* **215**, 1340 (1967).
45. Lefort M., w *Biogenèse*, red. J. A. Thomas, Masson et Cie Paris 1967, rozdz. XXI, str. 341.
46. Lehninger A. L., *The Mitochondrion, Molecular Basis of Structure and Function*, W. A. Benjamin Inc., N. York-Amsterdam 1964.
47. Leon S. A., Mahler H. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 305 (1968).
48. Linnane A. W., Lamb A. J., Christodoulou C., Lukins H. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 1288 (1968).
49. Linnane A. W., Vitols E., Nowland P. G., *J. Cell Biol.* **13**, 345 (1962).
50. Loeb J. N., Hubby B. G., *Biochim. Biophys. Acta* **166**, 745 (1968).
51. Luck D. J. L., *J. Cell Biol.* **16**, 483 (1963).
52. Luck D. J. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **49**, 233 (1963).
53. Luck D. J. L., *J. Cell Biol.* **24**, 445 (1965).
54. Luck D. J. L., *J. Cell Biol.* **24**, 461 (1965).
55. Manton I., *J. Marine Biol. Ass. U. K.* **38**, 319 (1959), cyt. wg 26.
56. Manton I., Parke M., *J. Marine Biol. Ass. U. K.*, **39**, 275 (1960), cyt. wg 90.
57. Mounolou J. C., Jacob H., Slonimski P. P. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 218 (1966).
58. Nass S., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 60 (1967).
59. Neubert D., Bass R., Oberdisse E., w *Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria*, red.: E. C. Slater., J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, Adriatica Editrice, Bari 1968, str. 103.
60. Neubert D., Helge H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 600 (1965).
61. Neupert W., Brdiczka D., Bücher T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **27**, 488 (1967).
62. Novikoff A. B., w *The Cell*, tom 2, red. J. Brachet, A. E. Mirsky, Academic Press, New York 1961, str. 299.
63. Parsons D. F., Williams G. R., Chance B., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **137**, 643 (1966), cyt. wg 106.

64. Parsons J. A., *J. Cell. Biol.* **25**, 641 (1964).
65. Parsons J. A., Rustad R. C., *J. Cell Biol.* **37**, 683 (1968).
66. Parthier B., *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 565 (1963).
67. Portier P., w *Les Symbiotes*, Masson, Paris 1918, cyt. wg 43.
68. Roodyn D. B., *Biochem. J.* **83**, 29 (1962).
69. Roodyn D. B., *Biochem. J.* **85**, 177 (1962).
70. Roodyn D. B., *Biochem. J.* **97**, 782 (1965).
71. Roodyn D. B., Reis P. J., Work T. S., *Biochem. J.* **80**, 9 (1961).
72. Roodyn D. B., Suttie J. W., Work T. S., *Biochem. J.* **85**, 177 (1962).
73. Rouiller C., *Internat. Rev. Cytol.* **9**, 227 (1960).
74. Rytel M., Gołaszewski T., Szarkowski J. W., Streszczenia, VI zjazd PTB, Sympozjum Międzynarodowe „Biosynteza Białek”, Olsztyn 1968, str. 49.
75. Schatz G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **12**, 448 (1963).
76. Scopes A. W., Williamson D. H., *Exptl. Cell Res.* **35**, 361 (1964).
77. Sinclair J. H., Stevens B. J., *J. Cell Biol.* **31**, 108 A (1966).
78. Smith D., Tauro P., Schweizer E., Halvórson H. O., *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **60**, 936 (1968).
79. Sottocasa G. L., Kuylenstierna B., Ernster L., Bergstrand A., *J. Cell Biol.* **32**, 415 (1967).
80. Spencer D., *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 381 (1965).
81. Stanners C. P., Till J. E., *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 406 (1960).
82. Steinert M., *J. Biochem. Biophys. Cytol.* **8**, 542 (1960).
83. Steinert M., *J. Cell Biol.* **20**, 192 (1964).
84. Steinert M., *Exptl. Cell Res.* **39**, 69 (1965).
85. Stutz E., Noll H., *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **57**, 774 (1967).
86. Sugimura T., Okabe K., Nagao M., Gunge N., *Biochim. Biophys. Acta* **115**, 267 (1966).
87. Szarkowski J. W., Gołaszewski T., Rytel M., Abstracts of 6th FEBS Meeting, Madrid 1969.
88. Thomas D. Y., Wilkie D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **30**, 368 (1968).
89. Thomas J. A., w *Biogenèse*, red. J. A. Thomas, Masson & Cie, Paris 1967, str. 355.
90. Trager W., w *The Cell*, tom VI, red. J. Brachet, A. Mirsky, Academic Press, New York-London 1964, str. 81.
91. Truman D. E. S., *Exptl. Cell Res.* **31**, 313 (1963).
92. Truman D. E. S., *Biochem. J.* **91**, 59 (1964).
93. Tuppy H., Wildner G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 733 (1963).
94. Turski W., Gross M., *Post. Biochem.* **13**, 359 (1967).
95. Vignais P. M., Nachbaur J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**, 307 (1968).
96. Wallace P. G., Huang M., Linnane A. W., *J. Cell Biol.* **37**, 207 (1968).
97. Wallace P. G., Linnane A. W., *Nature* **201**, 1191 (1964).
98. Wierzbicki R., Bartkowiak J., *Post. Biochem.* **12**, 577 (1966).
99. Wilgram G. F., Kennedy E. P., *J. Biol. Chem.* **238**, 2615 (1963).
100. Wilkie D., Rola cytoplazmy w dziedziczeniu, PWRiL, Warszawa 1966, rozdz. 2, str. 21.
101. Wintersberger E., *Z. Physiol. Chem.* **336**, 285 (1964).
102. Wintersberger E., *Biochem. Z.* **341**, 409 (1965).
103. Wintersberger E., Tuppy H., *Biochem. Z.* **341**, 339 (1965).
104. Wollgiehn R., Rüss M., *Z. Naturforsch. sect. B*, **23**, 1198 (1968).
105. Work T. S., *Biochem. J.* **105**, 38 P (1967).

106. Work T. S., Coote J. L., Ashwell M., *Federation Proc.* 27, 1174 (1968).
107. Yotsuyanagi Y., *J. Ultrastruct. Res.* 7, 121 (1962).
108. Zagórski W., *Post. Biochem.* 12, 491 (1966).

Addendum

* Niedawno wyrażono pogląd (Henson C. P., Weber C. N., Mahler H. R., *Biochemistry* 7, 4431 (1968) oraz Henson C. P., Perlman P., Weber C. N., Mahler H. R., *Biochemistry* 7, 4445 (1968)), że białka powstające wewnątrz mitochondriów pełnią rolę regulacyjną w procesie właściwego zespalania białek mitochondrialnych syntetyzowanych poza tą organellą.

** Zgodnie z najnowszymi danymi grupy Schatza (*Biochemistry* 8, 322, 335, 339 (1969)), nawet w warunkach skrajnie niekorzystnych u drożdży (w obecności glukozy i nieobecności tłuszczowców oraz tlenu) stwierdza się promitochondria, tzn. kuliste twory o średnicy 0,2—0,6 μ wykazujące aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i ATP-azy, pozbawione jednak kompletnego łańcucha oddechowo-fosforylacyjnego. W czasie adaptacji tlenowej drożdży następuje zespalanie istniejących błon z nowosyntetyzowanymi w cytoplazmie białkami — wykształcają się dojrzałe mitochondria.

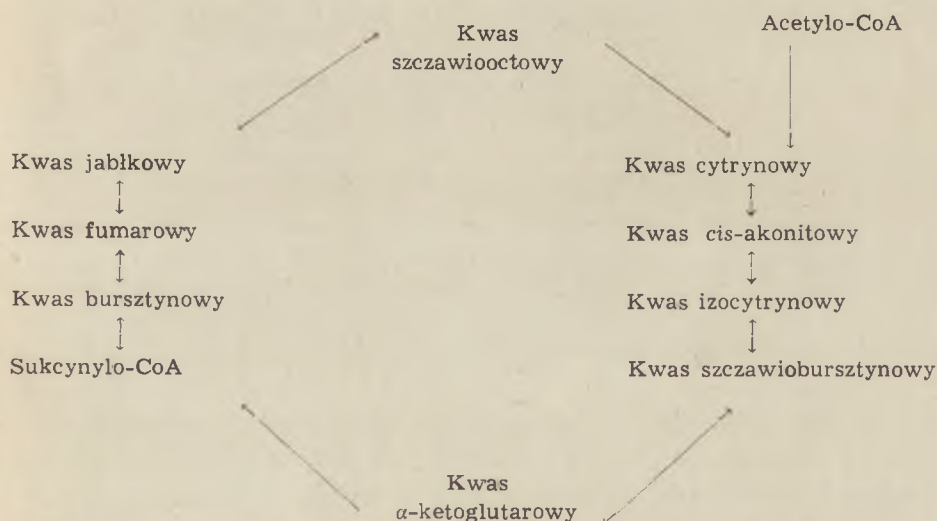
ANNA B. WOJTCZAK *

Utlenianie bursztynianu w mitochondriach

Succinate Oxidation in Mitochondria

Investigations on the oxidation of succinate in mitochondria from various mammalian tissues are reviewed. The effect of oxaloacetate as a controlling factor of this oxidation is described. Properties of the soluble succinate dehydrogenase and the effect of oxaloacetate on this enzyme are presented. The regulatory action of oxaloacetate on mitochondrial metabolism is discussed.

Cykl kwasów trójkarboksylowych, zwany również cyklem Krebsa odgrywa kluczową rolę w procesach energetycznych w żywych organizmach. Obecnie wiemy, że wszelkie substancje pokarmowe, a więc



Schemat 1. Uproszczony schemat cyklu Krebsa

* Dr, Zakład Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: DNP — 2,4-dwunitrofenol, FCCP — karbonylocyjanek *p*-trójfluoro-metoksyfenylohydrazonu, EDTA — czteroocetan etylenodwuaminy, FAD — dwunukleotyd adenino-flawinowy, PMS — metosiarczan fenazyny, FMN — mononukleotyd flawinowy, PCMB — *p*-chlorortęciobenzoesan.

węglowodany, tłuszcze i białka, po kolejnych etapach degradacji zachodzącej w organizmie utleniają się ostatecznie w cyklu Krebsa. Uproszczoną formę tego cyklu przedstawia schemat 1.

Produkty rozpadu węglowodanów, tłuszczów i białek mogą być włączane w cykl utleniania na różnych jego etapach, w czym bierze udział szereg enzymów, które nie są oksydoreduktazami. Są to tzw. enzymy pomocnicze w cyklu Krebsa: transaminazy, enzymy aktywujące kwasy tłuszczowe oraz różnego rodzaju transferazy. Właśnie dlatego, że cykl Krebsa jest tak ściśle powiązany z innymi procesami przemiany materii, mechanizmy kontrolujące ten cykl odgrywają pierwszorzędą rolę w całym metabolizmie. Utlenianie bursztynianu jako jeden z etapów cyklu Krebsa było od dawna obiektem badań. Szczególnie ciekawe i szeroko opracowane jest zagadnienie hamowania tego utleniania przez szczawiooctan *in vitro* (43), chociaż znaczenie tego hamowania jako mechanizmu regulującego cykl Krebsa *in vivo* jest dotychczas sprawą dyskusyjną. Ponieważ szczawiooctan nie jest bezpośrednim produktem utleniania bursztynianu, lecz produktem dalszych reakcji cyklu, uważa się, że hamowanie to może być typowym przykładem regulacji na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Badania na izolowanej dehydrogenazie bursztynianowej wykazały kompetycyjny charakter hamowania przez szczawiooctan, ujawniając jednocześnie szczególne właściwości szczawiooctanu jako inhibitora.

I. Badania na izolowanych mitochondriach

Mitochondria wątroby szczura utleniają bursztynian w obecności ADP i fosforanu ze stałą szybkością przez okres co najmniej 20—30 minut. Natomiast w warunkach rozprężenia oksydacyjnej fosforylacji utlenianie bursztynianu już po kilku minutach ulega zahamowaniu (1). Utlenianie to można reaktywować dodając ATP (2). Przypuszczenie, że przyczyną zahamowania utleniania bursztynianu w mitochondriach jest gromadzenie się szczawiooctanu, potwierdziła następująca obserwacja: w obecności substancji hamujących powstawanie szczawiooctanu (na przykład amytału lub rotenonu) utlenianie bursztynianu przebiega ze stałą szybkością niezależnie od tego, czy obecny jest ADP, czy też substancja rozprzegająca. Najczęściej używanymi substancjami rozprzegającymi były: 2,4-dwunitrofenol (DNP), dwukumarol, arsenian i karbonylocyjanek *p*-trójfluoro-metoksyfenylohydrazonu (FCCP).

Omówione wyniki sugerują, że w warunkach, w których utlenianiu bursztynianu towarzyszy wytwarzanie ATP, powstający szczawiooctan ulega bądź usunięciu z mitochondriów bądź dalszemu przekształceniu, natomiast w obecności substancji rozprzegających gromadzi się on w mitochondriach. Pomiarы wykonane różnymi metodami wykazały bardzo niską zawartość szczawiooctanu — około 0,01 μ mola na mg białka mi-

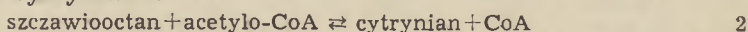
tochondriów (49, 55). Zawartość szczawiooctanu w mitochondriach serca szczura preinkubowanych z bursztynianem była przy tym około 5 razy mniejsza niż po preinkubacji z bursztynianem i DNP (49).

Rola ATP jako aktywatora utleniania bursztynianu była do niedawna nie wyjaśniona. Przypisywano ATP bliżej nie sprecyzowane działanie aktywujące (2, 16), lub też częściej sprowadzano wpływ ATP do udziału w reakcjach zużywających szczawiooctan. Teoretycznie w mitochondriach zachodzić może kilka reakcji enzymatycznych przekształcających szczawiooctan:

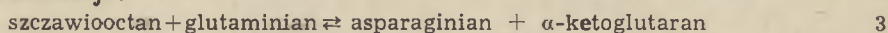
redukcja do jabłczanu:



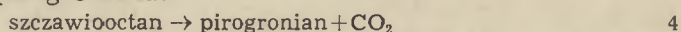
kondensacja do cytrynianu:



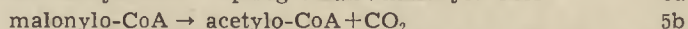
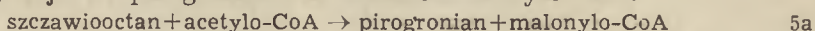
transaminacja:



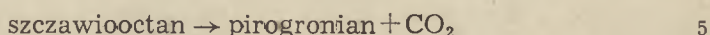
dekarboksylacja do pirogronianu:



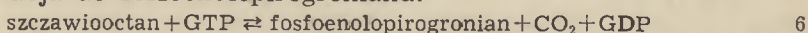
dekarboksylacja do pirogronianu z udziałem acetylo-CoA:



sumarycznie:



dekarboksylacja do fosfoenolpirogronianu:



Tylko reakcja 6 jest zależna bezpośrednio od trójfosfonukleotydu GTP, a reakcje 2 i 5 są zależne pośrednio od ATP, względnie GTP. Ponadto tylko w pewnych warunkach poszczególne z tych reakcji mogą zachodzić z tak dużą szybkością, aby efektywnie usuwać powstający podczas utleniania bursztynianu szczawiooctan. Mitochondria pochodzące z różnych narządów różnią się bowiem aktywnością poszczególnych, biorących tu udział enzymów oraz, co także jest istotne, ilością i skadem endogennych substratów. Wydaje się więc, że dopiero biorąc pod uwagę wszystkie te czynniki można zrozumieć i wytłumaczyć sprzeczne dane, które nagromadziły się w ostatnich latach w związku z udziałem ATP w utlenianiu bursztynianu.

Schollmeyer i Klingenberg (45) oznaczali poziom szczawiooctanu i ATP oraz zużycie tlenu podczas utleniania bursztynianu w zawieszynie mitochondriów mięśni piersiowych gołębia. Nie stwierdzili oni zależności między stężeniem szczawiooctanu w mieszaninie a szybkością utleniania bursztynianu. Na przykład w obecności glutaminianu zawartość szczawiooctanu była mała a aktywność utleniania bursztynianu znaczna. Natomiast w obecności ATP lub ketoglutaranu szybkość utleniania była taka sama jak w obecności glutaminianu, ale poziom szcza-

wiooctanu — o wiele wyższy. Autorzy wywnioskowali, że bardziej istotnym czynnikiem dla utleniania bursztynianu jest utrzymanie pewnego poziomu ATP niż obecność szczawiooctanu. Jednakże duże zastrzeżenia budzi fakt, że oznaczano szczawiooctan tylko w całej zawieszynie, a nie również w samych mitochondriach. Podobny brak zależności między stężeniem szczawiooctanu w mieszaninie inkubacyjnej a aktywnością oddechową względem bursztynianu stwierdził K u n z w mitochondriach wątroby szczura (37).

Mitochondria serca szczura wykazują spadek szybkości utleniania bursztynianu nie tylko w obecności DNP ale także, choć po dłuższym czasie, w obecności ADP (49). Mitochondria mięśni szkieletowych szczura otrzymane przez S u r a n y i i E r s t e r a (50) pozbawione były prawie zupełnie zdolności utleniania bursztynianu w obecności DNP. Mitochondria wątroby szczura po preinkubacji z fosforanem wykazywały znacznie większą wrażliwość na szczawiooctan — całkowite zahamowanie utleniania zachodziło już przy około 10 razy mniejszym stężeniu szczawiooctanu niż w przypadku mitochondriów nie preinkubowanych (3). Aby przywrócić aktywność w mitochondriach z mięśni czy wątroby, preinkubowanych z fosforanem i zahamowanych małą ilością szczawiooctanu, należało dodać nie tylko ATP, ale i NAD oraz substratów utleniających się przy udziale NAD. Najlepiej reaktywującymi substratami były długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Autorzy (3, 50) przypuszczali na tej podstawie, że do reaktywacji dehydrogenazy bursztynianowej potrzebny jest jakiś produkt utleniania kwasów tłuszczowych.

Różny przebieg utleniania bursztynianu w mitochondriach mięśni i wątroby C h a n c e i H a g i h a r a (13) oraz C h a p p e l l (14) tłumaczyli różną aktywnością systemu fosforylacyjnego w tych narządach. W mitochondriach wątroby system ten jest mniej aktywny niż w mitochondriach mięśni i dlatego w stanie rozprężonym szybkość utleniania bursztynianu wzrasta 2—4-krotnie w stosunku do szybkości osiąganey w obecności ADP. Tym samym szczawiooctan powstaje szybko i obserwuje się szybkie hamowanie. Wydaje się jednak, że nie jest to jedyna przyczyna różnej aktywności oddechowej względem bursztynianu mitochondriów mięśni, serca i wątroby. Prawdopodobnie ważną rolę odgrywają także endogenne substraty tych mitochondriów. Przypuszczano, że mitochondria serca zawierają więcej endogennych substratów niż mitochondria wątroby czy nerki ponieważ wykazują wysokie endogenne zużycie tlenu. Jednakże zawartość endogennych wolnych kwasów tłuszczowych i glutaminianu (tablica 1) jest znaczna zarówno w mitochondriach serca, jak i nerki, a mała w mitochondriach wątroby, a zatem pogląd K u n a i V o l f i n a (36) o niskiej zawartości endogennych substratów w mitochondriach nerki nie jest słuszny. Inna sprawa, że utlenianie endogennych substratów w tych mitochondriach nie zachodzi, dopóki

nie doda się ATP (względnie ADP i fosforanu) i któregoś ze związków pośrednich cyklu Krebsa. Utlenianie kwasów tłuszczowych poprzedzone musi być bowiem ich aktywacją, a utlenianie glutaminianu zachodzi w dużej mierze poprzez jego transaminację ze szczawiooctanem i dalsze utlenianie powstającego α -ketoglutaranu (35). Mitochondria serca, oprócz glutaminianu i kwasów tłuszczowych, zawierają znaczne ilości jabłczanu i cytrynianu (5, 7), ich wysokie endogenne oddychanie można przeto wytłumaczyć obecnością substratów zasilających pełny cykl Krebsa oraz dużą zawartością kwasów tłuszczowych. Endogennymi substratami oddechowymi mitochondriów wątroby wobec małej zawartości glutaminianu są natomiast głównie kwasy tłuszczowe (10,58). Z tego względu dodanie szczawiooctanu podwyższa znacznie endogenne oddychanie w mitochondriach nerki, a w małym stopniu w mitochondriach wątroby (36, 58).

Tablica 1

Zawartość glutaminianu i wolnych kwasów tłuszczowych w mitochondriach z różnych narządów szczura i królika

Narząd	Glutaminian mitochondria świeżo izolowa- ne	Wolne kwasy tłuszczowe			
		mitochondria świeżo izolowa- ne	po inkubacji przez 30 min. w 25°		
			bez do- datków	+KCN	+ bur- sztynian + DNP
Serce szczura*	6,9	88*	57	98	52
Nerka szczura*	6,0	49	123	125	69
Wątroba szczura**	2,3	30**	48	50	29
Serce królika*	14,0	75			
Nerka królika**	9,2	61***	97	97	46

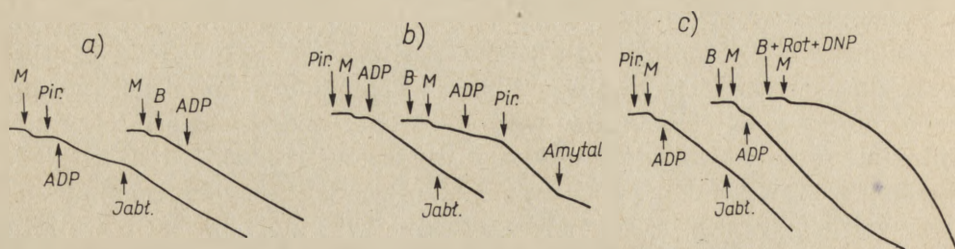
Liczby wyrażają μ mole na gram białka mitochondrialnego. Wartości dla glutaminianu stanowią średnie dla dwóch lub trzech preparatów mitochondrialnych. Zmiany zawartości wolnych kwasów tłuszczowych dotyczą oznaczeń w jednym preparacie dla każdego narządu; zawartość w różnych preparatach wahała się w granicach: * 60—90, ** 15—30 *** 60—120.

* Wojtczak, dane nie publikowane (58),** Wojtczak (57).

Z wartości początkowej szybkości utleniania bursztynianu wywnioskowano, że aktywność dehydrogenazy bursztynianowej jest o wiele niższa w sercu niż w wątrobie (36). Jednak porównanie utleniania bursztynianu przez mitochondria serca szczura otrzymane przy użyciu różnych środowisk izolacyjnych (rysunek 1) (58) wykazuje, że wniosek ten nie jest słuszny.

Mitochondria izolowane w obecności sacharozy i ATP (rysunek 1a) utleniają bursztynian od początku z dużą szybkością prawdopodobnie dlatego, że dzięki degradacji kwasów tłuszczowych do acetylo-CoA nie gromadzi się w nich szczawiooctan. Potwierdza to fakt, że utlenianie pirogronianu w tych mitochondriach jest całkowicie zależne od dodanego jabłczanu.

Intensywność utleniania pirogronianu może być w mitochondriach serca uważana za miarę zawartości w nich szczawiooctanu i jabłczanu. Jak wiadomo bowiem, mitochondria serca nie wytwarzają acetoctanu, a zatem utlenianie pirogronianu i kwasów tłuszczowych uzależnione jest całkowicie od obecności szczawiooctanu lub jego prekursora.



Rys. 1. Utlenianie bursztynianu i pirogronianu przez mitochondria serca szczura izolowane w różnych roztworach (wg Wojtczak (58))

Krzywe przedstawiają polarograficzny pomiar zużycia tlenu

Środowiska izolacyjne: a) 0,25 M sacharozy + 5 mM ATP (20), b) 0,18 M KCl + 1% albuminy surowiczej + 2 mM EDTA (33), c) 0,25 M sacharozy + 10 mM EDTA (48)

Środowisko inkubacyjne: 120mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 7,4), 2mM bufor fosforanowy (pH 7,4), 3mM MgCl₂; ponadto 5mM pirogronian (Pir), 5mM bursztynian (B), 5mM jabłczan (Jabt), 2mM ADP, 2mM amytal, 1μM rotenon (Rot), 0,1mM 2,4-dwunitrofenol (DNP); mitochondria (M) w ilości około 1mg białka/ml

W środowisku zawierającym KCl i albuminę surowiczą (rysunek 1b) endogenne kwasy tłuszczowe ulegają usunięciu przez związanie z albuminą. W tych warunkach obserwuje się bardzo niską aktywność utleniania bursztynianu, co można przypisać nagromadzeniu się szczawiooctanu. Potwierdzeniem słuszności tego przypuszczenia jest stwierdzenie, że pirogronian utlenia się bez dodatku jabłczanu. Trzeba tu jednak podkreślić, że preinkubacja tych mitochondriów z ATP i kwasami tłuszczowymi nie reaktywuje utleniania bursztynianu. Przyczyny tej nieodwracalnej inhibicji nie są na razie wyjaśnione.

W obecności sacharozy i EDTA (rysunek 1c) otrzymuje się mitochondria w stanie, który można by nazwać pośrednim między dwoma wyżej wymienionymi. Utlenianie pirogronianu jest częściowo zależne od dodanego jabłczanu. EDTA wiążąc Mg²⁺ uniemożliwia utlenianie kwasów tłuszczowych, ale ich nie usuwa. Po umieszczeniu mitochondriów w zawierającym magnez i ADP środowisku kwasy tłuszczowe mogą się utleniać i zużywać szczawiooctan. Nagromadzenie szczawiooctanu nie jest jednak tak duże jak w przypadku usunięcia kwasów tłuszczowych ze środowiska, bowiem dodany jabłczan zwiększa nieco utlenianie pirogronianu. W obecności DNP początkowa szybkość utleniania bursztynianu jest bardzo mała, zwiększa się jednak w miarę przedłużania czasu inkubacji, zwłaszcza gdy w środowisku znajduje się rotenon (rysunek 1c, ostatnia krzywa). Wytlumaczyć to można w następujący sposób. Już

podczas izolowania w mitochondriach zachodzi utlenianie endogenego cytrynianu, jabłczanu i glutaminianu. Prowadzi to do nagromadzenia się szczawiooctanu, ponieważ EDTA, hamując utlenianie endogennych kwasów tłuszczowych, uniemożliwia powstawanie acetylo-CoA. W związku z tym w mitochondriach izolowanych w obecności EDTA dehydrogenaza bursztynianowa jest częściowo zahamowana endogennym szczawiooctanem. Następnie, w warunkach umożliwiających utlenianie endogennych kwasów tłuszczowych, następuje wzmożone zużycie szczawiooctanu (włączanie w cykl Krebsa) i, co za tym idzie, odblokowanie dehydrogenazy bursztynianowej. W obecności rotenonu dochodzi jeszcze dodatkowa możliwość usuwania szczawiooctanu drogą redukcji do jabłczanu (reakcja 1). W tych warunkach reaktywacja jest szczególnie efektywna, gdyż rotenon uniemożliwia całkowicie powstawanie szczawiooctanu z jabłczanu.

Niedostatecznie wyjaśnione było zagadnienie, za pomocą jakich reakcji enzymatycznych usuwany jest szczawiooctan. Ochroniające działanie rotenonu na dodany szczawiooctan (60) oraz wpływ substratów utlenianych przy udziale NAD (3, 57) sugerują, że szczawiooctan usuwany jest najskuteczniej drogą redukcji do jabłczanu. Reakcja katalizowana przez dehydrogenazę jabłczanową jest przesunięta w stanie równowagi znacznie w stronę jabłczanu tak, że przy zahamowaniu łańcucha oddechowego przez rotenon utlenianie zredukowanego NAD (powstającego podczas utleniania endogennych kwasów tłuszczowych lub innych substratów) zachodzi całkowicie kosztem szczawiooctanu (57). Wydaje się zatem, że postulowanie udziału jakiegoś produktu utleniania kwasów tłuszczowych w reaktywacji utleniania bursztynianu (3) nie jest słuszne, zwłaszcza, że w mitochondriach wątroby działanie to wykazują także inne substraty, na przykład izocytrynian lub pirogronian (57) i że aktywacji tej towarzyszy wzrost redukcji NAD wewnątrz mitochondriów. Jednakże kwasy tłuszczowe zarówno endogenne jak i dodane oraz ich pochodne karnitynowe są lepszymi aktywatorami niż inne substraty (3, 57). Różnica efektywności działania różnych substratów polega chyba głównie na tym, że transport pirogronianu, izocytrynianu i innych pośredników cyklu Krebsa do mitochondriów jest upośledzony w obecności substancji rozprzegających (17, 44). Nie dotyczy to kwasów tłuszczowych i ich pochodnych karnitynowych, które wykazują duże powinowactwo do błony mitochondrialnej i są wiązane przez mitochondria, podobnie jak przez albuminę surowiczą (59).

O udziale endogennych kwasów tłuszczowych w usuwaniu szczawiooctanu z mitochondriów świadczy także pobudzające działanie karnityny i arsenianu w obecności ATP (57). Jak wiadomo, karnityna bierze udział w transporcie zaktywowanych kwasów tłuszczowych przez błonę mitochondrialną i w ten sposób ułatwia ich utlenianie. Arsenian natomiast uwalnia CoA z innych połączeń acylowych, głównie z sukcynylo-CoA, czyniąc go dostępniejszym dla utleniania kwasów tłuszczowych. W nie-

obecności ATP arsenian silnie wzmagą hamowanie utleniania bursztynianu przez dodany szczawiooctan. W tym wypadku działanie arsenianu polega na całkowitym pozabawieniu mitochondriów endogennego ATP, gdyż arsenian hamuje zarówno fosforylację oksydacyjną jak i substratową. W mitochondriach, w których zachodzi reaktywacja utleniania bursztynianu, zawartość kwasów tłuszczowych maleje znacznie (tablica 2). Aktywujący wpływ ATP i karnityny na utlenianie bursztynianu w stanie rozprężonym obserwuje się zarówno w obecności rotenonu i dodanego szczawiooctanu, jak i bez rotenonu, wtedy gdy przyczyną zahamowania jest wytwarzany endogennie szczawiooctan. W tym ostatnim przypadku usuwanie szczawiooctanu nie może odbywać się wskutek redukcji do jabłczanu, ponieważ zredukowany NAD jest utleniany bardzo szybko w łańcuchu oddechowym. W tych warunkach szczawiooctan może ulegać albo kondensacji z acetylo-CoA dając cytrynian, albo dekarboksylacji.

Tablica 2

Zmiany zawartości wolnych kwasów tłuszczowych w mitochondriach wątroby szczura w czasie utleniania bursztynianu (wg Wojtczak (57))

Warunki	Wolne kwasy tłuszczowe μmole w próbie *)
Próba nie inkubowana	0,92
Próba inkubowana	1,31
„ „ + KCN	1,47
„ „ + bursztynian + DNP	0,90
„ „ + bursztynian + DNP + ATP	0,72
„ „ + bursztynian + DNP + arsenian	1,82
„ „ + bursztynian + DNP + ATP + + arsenian	0,66

*) 30,6 mg białka mitochondrialnego

Jak wymieniono na wstępie, istnieje kilka procesów enzymatycznych, których wynikiem jest dekarboksylacja szczawiooctanu. Są to reakcje 4, 5 i 6. Bardzo trudno ocenić na podstawie dotychczasowych danych czy reakcje te pełnią rolę w reaktywacji utleniania bursztynianu. Wydaje się, że reakcja 4 nie ma większego znaczenia, ponieważ jest niezależna od energii, a reaktywacja w mitochondriach wymaga ATP. Reakcja 5 jest pośrednio zależna od energii, gdyż dostarczanie acetylo-CoA musi być poprzedzone aktywacją kwasów tłuszczowych. Wyniki pracy Wojtczak (57) wskazują, że reaktywacja utleniania bursztynianu w mitochondriach wątroby szczura pod wpływem ATP zachodzi głównie na drodze redukcji do jabłczanu i kondensacji z acetylo-CoA do cytrynianu. Wniosek ten oparto na obserwacji, że najlepiej reaktywują substraty, które dostarczają zarówno zredukowanego NAD jak i acetylo-CoA. Cytrynian i pirogronian nie były jednak w tych doświadczeniach oznacza-

ne, tak że alternatywny udział reakcji 5 pozostaje do dalszego wyświe-
tlenia.

Mitochondria wątroby szczura wykazują bardzo niską aktywność kar-
boksykinazy (reakcja 6). Pod tym względem wątroba szczura jest wy-
jątkiem, bo u większości zwierząt enzym ten jest głównie zlokalizowany
właśnie w mitochondriach (38). Chociaż więc dekarboksylacja zależna
od GTP zachodzi w mitochondriach wątroby szczura (46), to proces ten
jest bardzo powolny i wydaje się wątpliwe, aby miał on znaczenie w usu-
waniu szczawiooctanu (40). Aktywność karboksykinazy w mitochondriach
serca jest również bardzo niska, aktywność zaś enzymów cyklu Krebsa
i zawartość endogennych substratów są znaczne w porównaniu z mito-
chondriami wątroby. Wydaje się więc, że usuwanie szczawiooctanu
w mitochondriach serca kontrolowane jest głównie przez syntezę cytry-
nianu i redukcję do jabłczanu podobnie jak w mitochondriach wątroby
szczura.

Mitochondria nerki, podobnie jak mitochondria wątroby (z wyjątkiem
wątroby szczura) mają bardzo aktywną karboksykinazę. Obecność tego
enzymu związana jest z procesem glukoneogenezy, który przebiega głów-
nie w tych właśnie narządach. Powstawanie fosfoenolopirogronianu
w mitochondriach nerki utleniających bursztynian wykazali bezpośre-
dnie Papa i wsp. (41). Dodanie ATP powodowało szybsze utlenianie
bursztynianu, jednocześnie zaś wzrastał poziom fosfoenolopirogronianu,
a spadał poziom endogennego szczawiooctanu. Autorzy wysnuli wniosek,
że w mitochondriach nerki głównie karboksykinaza kontroluje utlenia-
nie bursztynianu. Ciekawy jest jednak fakt, że dodanie ATP i rotenonu
dużo bardziej obniżało zawartość endogennego szczawiooctanu niż sam
ATP. Wydaje się, że właśnie ten wpływ rotenonu może świadczyć o usu-
waniu szczawiooctanu przez redukcję, przy czym endogenne kwasy

Tablica 3

Zużycie tlenu i produkcja szczawiooctanu oraz fosfoenolopirogronianu w czasie utleniania bur-
sztynianu przez mitochondria nerki królika (wg Papa, Lofrumento i Quagliariello (41))

Substancje dodane	Zużycie tlenu ($\mu\text{g atom}$)	Produkcja szczawiooc- tanu (μmole)	Produkcja fosfoenolopiro- gronianu (μmole)
—	2,8	29,6	5,6
ATP + oligomycyna	5,2	20,0	71,1
ATP + oligomycyna + rotenon	5,0	0	5,0

tłuszczowe, których ilość w mitochondriach nerki jest duża, dostarczają
zredukowanego NAD (tablica 3). Wprawdzie w nieobecności rotenonu
zużycie tlenu jest w przybliżeniu takie samo jak w jego obecności, jed-

nakże w drugim przypadku odpowiada ono wyłącznie utlenianiu bursztynianu, natomiast w pierwszym — utlenianiu bursztynianu i endogenych substratów. Można więc sądzić, że w mitochondriach nerki oprócz fosfoenolopirogronianu istotną rolę w usuwaniu szczawiooctanu odgrywa zarówno jego redukcja do jabłczanu jak i włączanie do cyklu Krebsa.

W ostatnich latach zwrócono uwagę, że transport substratów oddechowych do mitochondriów również jest procesem wymagającym energii (17, 44). W związku z tym w warunkach rozprężenia fosforylacji transport ten zmniejsza się, co może przyczyniać się do zmniejszania utleniania. W przypadku utleniania bursztynianu efekt ten sumuje się z hamującym wpływem szczawiooctanu (18, 42). Jednak przy stężeniach bursztynianu rzędu kilku mM i wyższych hamowanie transportu bursztynianu przez substancje rozprzegające nie ma już istotnego wpływu na szybkość jego utleniania.

II. Badania na rozpuszczalnej dehydrogenazie bursztynianowej

Dehydrogenaza bursztynianowa (EC 1.3.99.1) jest flawoproteidem, zawierającym oprócz FAD także niehemowe żelazo i labilną siarkę (22, 47, 53, 54). Na jedną cząsteczkę enzymu o ciężarze 150 000—200 000 przypada jedna grupa FAD, osiem atomów Fe i cztery (65) lub osiem (27) atomów siarki. FAD połączony jest z białkiem poprzez pierścień izoalloksazynowy i tworzy trwałą, nie ulegającą rozszczepieniu w kwasie związek. Dopiero trawienie enzymu trypsyną uwalnia FAD połączony jeszcze z krótkimi peptydami (22, 30). Od dawna uważano FAD za jedyną grupę prostetyczną dehydrogenazy bursztynianowej. Ostatnio jednak badania spektralne i badania techniką rezonansu elektromagnetycznego udowodniły, że w przenoszeniu elektronów bierze udział, oprócz FAD, również żelazo niehemowe połączone z siarką (6, 29, 52). Mimo, że udział żelaza podczas przenoszenia elektronów z bursztynianu na łańcuch oddechowy jest dość dobrze udowodniony, to jednak stale wysuwane są wątpliwości co do roli żelaza w dehydrogenazie współdziałającej ze sztucznymi akceptorami. Nie jest ona bowiem hamowana przez związki chelatujące żelazo, na przykład 2-tenoilotrójfluoroaceton (67).

W mitochondriach dehydrogenaza znajduje się w wewnętrznej błonie. Ani działanie na mitochondria ultradźwiękami, digitoniną, ani też mechaniczna dezintegracja nie uwalniają dehydrogenazy ze struktur. nierozpuszczalne preparaty błon mitochondrialnych zawierają oprócz dehydrogenazy bursztynianowej wszystkie komponenty łańcucha oddechowego. Przykładem cząstek zawierających zarówno dehydrogenazę, jak i oksydazę bursztynianową jest tzw. preparat Keilina-Hartree otrzymany z serca wołu. Preparat ten utlenia intensywnie bursztynian, zużywając tlen jako akceptor elektronów (po dodaniu cytochromu c) lub redukując

sztuczne akceptory elektronów, jak metosiarczan fenazy (PMS) czy żelazocyjanek. Reakcja ze sztucznymi akceptorami przebiega bez udziału systemu cytochromowego. Reakcja katalizowana przez dehydrogenazę bursztynianową jest odwracalna; donatorem wodoru dla redukcji fumaranu jest zredukowany FMN.

Prace Singera i wsp. (47) oraz Wang i wsp. (53, 54) dotyczące metod dalszego oczyszczania rozpuszczalnej dehydrogenazy dostarczyły wiadomości o poszczególnych komponentach enzymu. Dehydrogenazę bursztynianową można odszczepić od reszty łańcucha oddechowego działając na fragmenty błon lub całe mitochondria alkaliami. Przy pH około 9–10 enzym odszczepia się w formie rozpuszczalnej i można go oddzielić od cząstek przez wirowanie (23, 53). Kearney (21) stwierdziła, że enzym przeprowadzony w postać rozpuszczalną jest mało aktywny i dopiero preinkubacja z bursztynianem zwiększa kilkakrotnie jego aktywność. Zauważono również (21), że poza substratem enzym może być reaktywowany przez fosforan, a także przez inhibitory kompetycyjne jak fumaran lub malonian (usuwane następnie przez dializę). Proces ten jest niezależny od pH w zakresie 6,0–8,9. W temperaturze 0° reaktywacja praktycznie nie zachodzi; około 38° jest prawie natychmiastowa, a w zakresie 18° – 22° można badać jej kinetykę. Energia aktywacji tego procesu jest wysoka i wynosi 35 kcal/mol. Szybkość reaktywacji dehydrogenazy bursztynianowej zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia aktywatora, ale osiągnięta po pewnym czasie maksymalna aktywność enzymu (V_{max}) jest dla różnych stężeń aktywatora taka sama. Charakterystycznym zjawiskiem towarzyszącym reaktywacji są zmiany w widmie enzymu. Zarówno pod wpływem substratu, jak i inhibitorów następuje obniżenie absorpcji przy 460 nm i wzrost przy 510 nm. Zmiany te wynoszą tylko około 10%, ale są powtarzalne (21). Der Vartanian i Veeger (15) stwierdzili, że szereg związków będących analogami strukturalnymi bursztynianu tworzy kompleksy z enzymem, a towarzyszące temu zmiany absorpcji są zależne od powinowactwa tych związków do enzymu. Na przykład malonian, jako silniejszy inhibitor (stała inhibicji $K_i = 0,018$ mM), wywołuje większą zmianę widma niż α -ketoglutaran ($K_i = 70$ mM). Posługując się metodą spektralnego miareczkowania enzymu wyznaczono stałe dysocjacji enzym-inhibitor (K_D) i okazało się, że ich wartości równają się w przybliżeniu wartościom K_i , oznaczonym dla tych samych inhibitorów metodą kinetyczną (tablica 4).

Na tej podstawie autorzy wysnuli wniosek, że charakterystyczne zmiany w widmach odpowiadają powstawaniu kompleksu enzym-inhibitor, względnie enzym-substrat, ale nie świadczą o reaktywacji. Wprawdzie warunkiem reaktywacji jest wytworzenie połączenia enzym-substrat lub enzym-inhibitor, ale nie w każdym przypadku powstanie takiego połączenia jest równoznaczne z reaktywacją enzymu. Przykładem może być szczawiooctan, najsilniejszy, kompetycyjny inhibitor

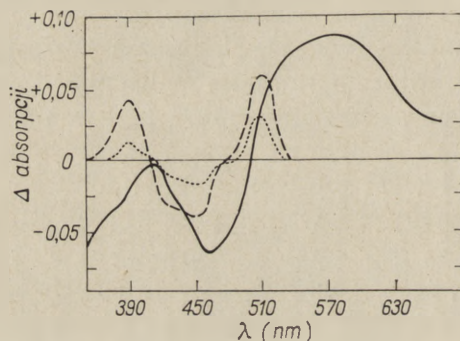
dehydrogenazy bursztynianowej, który wywołuje zmiany widma (15), ale nie reaktywuje enzymu (61). Należy jednak podkreślić, że zmiana widma enzymu wywołana przez szczawiooctan różni się od zmian

Tablica 4

Stałe inhibitorowe (K_i) oznaczone kinetycznie i stałe dysocjacji (K_D) oznaczone spektrofotometrycznie dla dehydrogenazy bursztynianowej (wg DerVartaniana i Veegeera (15))

Inhibitor	K_D (mM)	K_i (mM)
Malonian	0,028	0,018
Fumaran	2,6	1,3
Metylenobursztynian	6,3	1,8
Maleinian	7,0	6,2
Acetooctan	80	40
Szczawiooctan	0,0040	0,0015

spowodowanych przez inne inhibitory: minimum absorpcji jest nieco przesunięte, a maksimum obejmuje bardzo szeroki pas w zakresie 500—600 nm (rysunek 2).

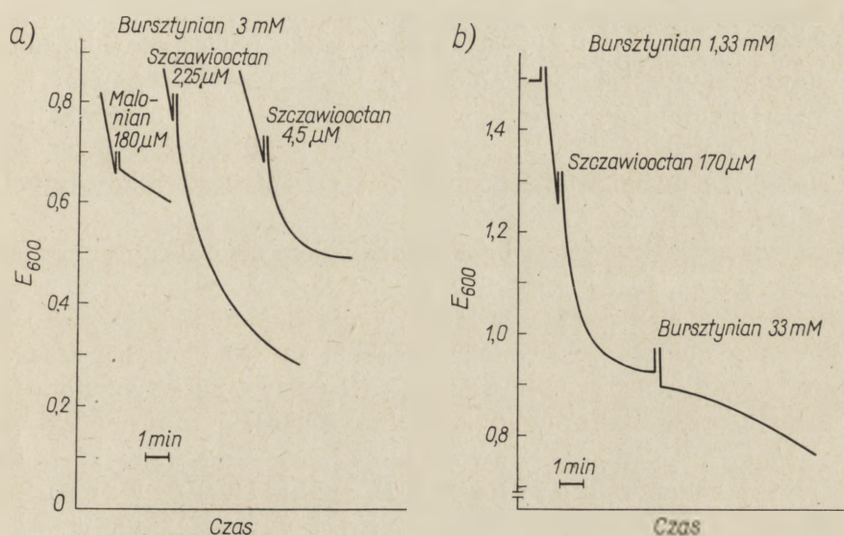


Rys. 2. Wpływ inhibitorów kompetycyjnych na widmo absorpcyjne dehydrogenazy bursztynianowej (wg DerVartaniana i Veegeera (15))

Krzywe przedstawiają widmo różnicowe enzymu traktowanego inhibitorem względem enzymu bez inhibitora. Oznaczenia: — — — — — szczawiooctan, - - - - - malonian, albo maleinian, acetooctan, albo metylenobursztynian, albo fumaran, acetooctan

Badania kinetyki hamowania dehydrogenazy bursztynianowej przez szczawiooctan wykazały też różnice w stosunku do innych kompetycyjnych inhibitorów. Hamowanie dehydrogenazy nie zachodzi natychmiast, ale jest opóźnione o $1/2$ —1 minuty i zwiększa się w miarę upływu czasu (61). Szybkość utleniania bursztynianu ustala się dopiero po 10—15 minutach, zależnie od stężenia szczawiooctanu (rysunek 3a). K_i obliczona po ustaleniu się szybkości reakcji wynosi 0,12—0,35 mM. Jeśli enzym jest całkowicie zahamowany przez szczawiooctan, jego reaktywacja bursztynianem także nie zachodzi natychmiast. W pierwszej minucie nie ma

efektu, następnie aktywność enzymu zwiększa się i po kilku minutach osiąga stałą wartość (rysunek 3b). Obserwacje te potwierdzili Zeylemaker i Slater (66). Oznaczyli oni dwie wartości stałej inhibitoryjnej wobec szczawiooctanu: K_i' (dla szybkości początkowej) zawartą w granicach $1,7-6,3 \mu\text{M}$ i K_i'' (dla szybkości po ustaleniu się) wynoszącą około $0,6 \mu\text{M}$. Ta ostatnia wartość zbliżona jest do wyników Wojtczaka i wsp. (61). Wartość K_i' zbliżona jest do wartości K_D oznaczonej spektralnie (15), co dowodziłoby, że pierwszy etap hamowania związany jest z wytworzeniem kompleksu enzym-inhibitor, natomiast drugi etap, w którym hamowanie zwiększa się, spowodowany jest jakimś innym wpływem szczawiooctanu na enzym.



Rys. 3. a) Porównanie hamowania dehydrogenazy bursztynianowej przez malonian i szczawiooctan i b) reaktywacja enzymu przez bursztynian (wg Wojtczaka, Wojtczak i Ernster (61))

Reakcję mierzono spektrofotometrycznie wobec metosiarczanu fenazyny i dwuchlorofenainodofenu jako akceptorów elektronów

King i wsp. (25, 26, 27, 28, 29, 30) wykazali, że dehydrogenaza bursztynianowa odszczepiona od łańcucha oddechowego ma zdolność do rekonstrukcji, to znaczy, może być spowrotem włączona do fragmentów błon pozbawionych dehydrogenazy, przy czym cały kompleks odzyskuje własności oksydazy bursztynianowej. Aby jednak otrzymać enzym zdolny do rekonstrukcji, odszczepianie enzymu należy przeprowadzić w obecności bursztynianu, możliwie bez dostępu tlenu. W przeciwnym przypadku otrzymuje się enzym, który wykazuje aktywność dehydrogenazy względem sztucznych akceptorów, ale nie jest zdolny do rekonstrukcji. Reaktywacja za pomocą bursztynianu, malonianu, fosforanu i innych związków zwiększa wprawdzie aktywność dehydrogenazy względem

sztucznych akceptorów, ale nie przywraca zdolności do rekonstytucji. Utratę zdolności do rekonstytucji powoduje również potraktowanie enzymu szczawiooctanem (61).

Wiadomo, że aktywność dehydrogenazy bursztynianowej uzależniona jest od obecności wolnych grup -SH, gdyż substancje blokujące te grupy, jak PCMB oraz utleniające, jak utleniony glutation, hamują utlenianie bursztynianu. Hamujące działanie cyjanku na dehydrogenazę bursztynianową zaobserwował po raz pierwszy Tsou (51) w 1951 r. W kilka lat później Keilin i King (23) stwierdzili, że preparat Keilina-Hartree traktowany cyjankiem traci całkowicie aktywność oksydazy bursztynianowej i częściowo aktywność dehydrogenazy. Pierwszy efekt wywołany był hamowaniem oksydazy cytochromowej. Cyjanek hamował także częściowo rozpuszczalną dehydrogenazę bursztynianową oraz zniósł jej zdolność do rekonstytucji. Działanie cyjanku polega prawdopodobnie na nieodwracalnym rozszczepieniu grupy -S-S- z utworzeniem jednej grupy -SH i jednej grupy -CNS. Na podstawie dalszych obserwacji Wu i King (62) wywnioskowali, że w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę biorą udział wolne grupy -SH, a w procesie rekonstytucji — grupy -S-S-.

Szczawiooctan, który jest bliskim analogiem strukturalnym bursztynianu, zawiera grupę karbonylową. Grupa ta może w pewnych warunkach reagować z grupą -SH z wytworzeniem układu tioketolowego (11). Można by przypuszczać, że podobna reakcja zachodzi między szczawiooctanem i reaktywną grupą -SH dehydrogenazy bursztynianowej, co uniemożliwia przekształcenie strukturalne cząsteczki w formę aktywną. O tym, że enzym występuje w dwóch lub więcej formach, świadczą omawiane wyżej badania Kearney (21), Keilina i Kinga (23), Kimury i wsp. (24) oraz Wojtczaka i wsp. (61), których wyniki sprzeczają się głównie do stwierdzenia, że do uzyskania pełnej aktywności enzymu nie wystarcza usunięcie szczawiooctanu, ale konieczna jest preinkubacja enzymu z bursztynianem lub innym aktywatorem. Prawdopodobnie obecność substratu czy aktywatora stabilizuje aktywną formę enzymu. Można przypuszczać, że proces reaktywacji polega na osiągnięciu przez enzym określonego stanu konformacyjnego.

Rolę fosfolipidów w mechanizmie działania dehydrogenazy bursztynianowej badali Cerletti i wsp. (12). Stwierdzili oni, że rozpuszczalną dehydrogenazę aktywują tylko fosfolipidy kwaśne, przy czym proces ten jest różny od aktywacji powodowanej przez substrat. Fosfolipidy nie mogą zastąpić bursztynianu, ale dodane wraz z bursztynianem zwiększają aktywność enzymu.

Ostatnio Brun i Racker (9) zrekonstruowali oksydoreduktazę bursztynian-ubichinon z izolowanych elementów łańcucha oddechowego. W skład kompleksu wchodzi: rozpuszczalna dehydrogenaza, cytochrom b, czynnik F_4 (jeden z czynników białkowych Rackera) i lecytyna albo

mieszanina fosfolipidów mitochondrialnych. Udało się również (63) zrekonstruować system oksydazy bursztynianowej składający się z elementów wymienionych wyżej i cytochromów *c* i *c*₁, ubichinonu i oksydazy cytochromowej. Badania te udokumentowały ostatecznie wysuwane dawniej przypuszczenia, że naturalnym akceptorem elektronów dla dehydrogenazy bursztynianowej w łańcuchu oddechowym jest ubichinon (31).

III. Uwagi końcowe

Nasuwa się pytanie, czy *in vivo* w nerce, wątrobie lub sercu hamowanie dehydrogenazy bursztynianowej przez szczawiooctan odgrywa znaczącą rolę. Utlenianie bursztynianem w izolowanych mitochondriach wątroby i nerki jest bardzo intensywne i przekracza około dziesięciokrotnie utlenianie innych substratów (36). Można by więc przypuszczać, że nawet częściowe zahamowanie dehydrogenazy bursztynianowej nie spowoduje zablokowania utleniania bursztynianu *in vivo*. Potwierdza to brak bursztynianu w świeżo izolowanych mitochondriach i podczas utleniania innych substratów. Jedynie w przypadku, gdy inkubowano mitochondria wątroby z jabłczanem i kwasami tłuszczowymi w stosunku 30 : 1, zaobserwowano nagromadzenie się bursztynianu, co świadczyłoby o zahamowaniu cyklu Krebsa właśnie na poziomie dehydrogenazy bursztynianowej (8). Taka sytuacja mogłaby zaistnieć *in vivo* tylko wtedy, gdyby organizm otrzymywał w pożywieniu prawie wyłącznie kwas jabłkowy lub szczawiooctan z minimalnym dodatkiem tłuszczów lub węglowodanów.

Wspomniano poprzednio (część I), że mitochondria serca izolowane w sacharozie wykazują aktywność dehydrogenazy mniejszą niż aktywność, jaką można uzyskać w innych środowisku. Prawdopodobnie *in vivo* w mitochondriach serca ujawnia się pełna aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, co pozwala na intensywne funkcjonowanie cyklu Krebsa. Cykl ten bowiem zarówno w sercu jak i w nerce spełnia funkcję głównego generatora energii, gdyż, jak wiadomo, w tych narządach nie występuje alternatywna droga utleniania kwasów tłuszczowych do acetoctanu. Istnieje jednak pewna trudność w interpretacji danych doświadczalnych, na którą zwrócili uwagę już Chance i Hagihara (13). Oznaczana przez wielu autorów wartość K_i dla dehydrogenazy bursztynianowej względem szczawiooctanu waha się w granicach 0,2—0,7 μM (61, 66). Natomiast K_m syntetazy cytrynianowej wobec szczawiooctanu wynosi 15 μM (55). Jak możliwe jest więc pełne operowanie cyklu Krebsa, skoro przy maksymalnym wysyceniu syntetazy cytrynianowej szczawiooctanem, dehydrogenaza bursztynianowa powinna być całkowicie zahamowana? Jednak w normalnych warunkach zarówno w sercu jak i w nerce cykl ten doskonale funkcjonuje. Próbuje

się zatem tłumaczyć sytuację istniejącą w tych narządach następująco: 1) Szybkość reakcji syntezy cytrynianu zależy nie tylko od stężenia szczawiooctanu, ale i od stężenia drugiego substratu, to jest acetylo-CoA. Z tego względu można uzyskać znaczną szybkość reakcji syntezy cytrynianu nawet przy małym stężeniu szczawiooctanu przez zwiększenie dopływu acetylo-CoA. 2) Częściowe zahamowanie dehydrogenazy bursztynianowej w mitochondriach serca i nerki nie ogranicza szybkości całego cyklu ze względu na wysoką aktywność tego enzymu w tych narządach. Z drugiej strony utrzymanie pewnego stężenia bursztynianu jest korzystne, gdyż sukcynylo-CoA (przy udziale transferazy sukcynylo-CoA:acetoocetan) potrzebny jest do aktywacji acetoocetan. Acetoocetan zaś jest dla nerki i serca jednym z głównych substratów oddechowych dostarczanych przez krew.

Stężenie szczawiooctanu w mitochondriach wątroby kontrolowane jest przez poziom zredukowanego NAD (patrz część I). Z kolei stosunek zredu. NAD/NAD w mitochondriach zależy od rodzaju utlenianego substratu. W przypadku utleniania kwasów tłuszczowych stosunek ten jest wysoki, co nie sprzyja szybkiemu wytwarzaniu szczawiooctanu. Następstwem tego jest częściowe zahamowanie cyklu Krebsa z powodu obniżonej syntezy cytrynianu. Utlenianie kwasów tłuszczowych przebiega wtedy głównie do acetoocetan (56). Natomiast dehydrogenaza bursztynianowa, jak o tym była już mowa w części I, zachowuje w obecności utlenianych kwasów tłuszczowych pełną aktywność. Podczas utleniania pirogronianu ustala się niższy stosunek zredu. NAD/NAD niż przy utlenianiu kwasów tłuszczowych skutkiem czego tworzy się więcej szczawiooctanu. Ponadto część pirogronianu ulega karboksylacji, dostarczając jeszcze dodatkowo szczawiooctanu (19, 32). W rezultacie cykl Krebsa funkcjonuje o wiele intensywniej niż podczas utleniania kwasów tłuszczowych. I w tym przypadku dehydrogenaza bursztynianowa zachowuje swoją pełną aktywność (57). Trudniej natomiast zrozumieć, że nawet w warunkach wielokrotnie podwyższonej produkcji szczawiooctanu z pirogronianu, jak ma to miejsce przy cukrzycy alloxanowej u szczurów, także nie stwierdzono hamowania utleniania bursztynianu (34). Widocznie jednak i w tym przypadku stosunek zredu. NAD/NAD, zbliżony do występującego przy utlenianiu pirogronianu u zdrowych szczurów, sprawia, że w mitochondriach nie gromadzi się szczawioocetan lecz jabłczan. W odróżnieniu jednak od stanu normalnego, przy cukrzycy obserwuje się znaczne zahamowanie cyklu Krebsa i występuje silna ketoza. Przyczyny występowania ketozy są w tej chwili obiektem usilnych badań, ale interpretacje są na razie bardzo kontrowersyjne (4, 39).

Badania nad konformacyjnymi zmianami dehydrogenazy bursztynianowej są w zupełnie początkowej fazie. Ostatnie badania kinetyczne sugerują występowanie enzymu w kilku formach (64).

LITERATURA

1. Azzone G. F., Ernster L., *Nature* **187**, 65 (1960).
2. Azzone G. F., Ernster L., *J. Biol. Chem.* **236**, 1518 (1961).
3. Åkerblom A., Ernster L., Lindberg O., Weinbach E. C., Abstracts of 6th Internat. Congress Biochem., New York, 1964, X-1.
4. Baird G. D., Habbitt K. G., Hunter G. D., Lund P., Stubbs M., Krebs H. A., *Biochem. J.* **107**, 683 (1968).
5. Bauer C., von Korf R. W., *Biochim. Biophys. Acta* **131**, 280 (1967).
6. Beinert H., DerVartanian D. V., Hemmerich P., Veeger C., van Voorst J. D. W., *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 530 (1965).
7. Bellamy D., *Biochem. J.* **82**, 218 (1962).
8. Björntorp P., *J. Biol. Chem.* **241**, 1537 (1966).
9. Bruni A., Racker E., *J. Biol. Chem.* **243**, 962 (1968).
10. Bryła J., Kaniuga Z., Frackowiak B., *Biochim. Biophys. Acta* **143**, 285 (1967).
11. Calvin M., w *The Glutathione*, red. S. Colowick, H. Lazarow, E. Racker, D. R. Schwartz, E. Stadtman, H. Waelsch, Academic Press New York, 1954, str. 3.
12. Cerletti P., Giovenco M. A., Giordano M. G., Giovenco S., Strom R., *Biochim. Biophys. Acta* **146**, 380 (1967).
13. Chance B., Hagihara B., *J. Biol. Chem.* **237**, 3540 (1962).
14. Chappell J. B., *Biochem. J.* **90**, 237 (1964).
15. DerVartanian D. V., Veeger C., *Biochim. Biophys. Acta* **92**, 233 (1964).
16. Gregolin C., Scaletta P., *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 185 (1965).
17. Harris E. J., Manger J. R., *Biochem. J.* **109**, 239 (1968).
18. Harris E. J., Van Dam K., Pressman B. C., *Nature* **213**, 1126 (1967).
19. Haslam R. J., Krebs H. A., *Biochem. J.* **86**, 432 (1963).
20. Holton F. A., Hülsmann W. C., Myers D. K., Slater E. C., *Biochem. J.* **67**, 579 (1957).
21. Kearney E. B., *J. Biol. Chem.* **229**, 363 (1957).
22. Kearney E. B., *J. Biol. Chem.* **235**, 865 (1960).
23. Keilin D., King T. E., *Proc. Roy. Soc. London. Ser. B*, **152**, 163 (1960).
24. Kimura T., Hauber J., Singer T. P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **11**, 83 (1963).
25. King T. E., *J. Biol. Chem.* **238**, 4032 (1963).
26. King T. E., *J. Biol. Chem.* **238**, 4037 (1963).
27. King T. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 511 (1964).
28. King T. E., *Advan. Enzymol.* **28**, 155 (1966).
29. King T. E., Howard R. L., Mason H. S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 329 (1961).
30. King T. E., Howard R. L., Wilson D. F., Li J. C. R., *J. Biol. Chem.* **237**, 2941 (1962).
31. Klingenberg M., Kröger A., w *Biochemistry of Mitochondria*, red. E. C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak, Academic Press i P.W.N., Londyn i Warszawa 1967, str. 11.
32. König T., Marosvari J., Lipcsey A., *Acta Physiol. Acad. Sci. Hungar.* **24**, 391 (1964).
33. Korf von R. W., *J. Biol. Chem.* **240**, 1351 (1965).
34. Krebs H. A., *Advan. Enzyme Regul.* **4**, 339 (1966).
35. Kun E., Loh H. H., Volfin P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 702 (1966).

36. Kun E., Volfín P., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**, 696 (1966).
37. Kunz W., *Z. Physiol. Chem.* **334**, 128 (1963).
38. Lardy H. A., Nordlie R. C., *J. Biol. Chem.* **238**, 2259 (1963).
39. Menahan L. A., Ross B. D., Wieland O., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **30**, 38 (1968).
40. Oestreicher A. B., 5th FEBS Meeting, Praha 1968, Abstract No. 199.
41. Papa S., Lofrumento N. E., Quagliariello E., w *Mitochondrial Structure and Compartmentation*, red. E. Quagliariello, S. Papa, E. C. Slater, J. M. Tager, Adriatica Editrice, Bari 1967, str. 418.
42. Papa S., Lofrumento N. E., Paradies G., Quagliariello E., *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 306 (1968).
43. Pardee A. B., Potter V. R., *J. Biol. Chem.* **176**, 1085 (1948).
44. Quagliariello E., Palmieri F., *European J. Biochem.* **4**, 20 (1968).
45. Schollmeyer P., Klingenberg M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 43 (1961).
46. Scholte H. R., Tager J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **110**, 252 (1965).
47. Singer T. P., Kearney E. B., Bernath P., *J. Biol. Chem.* **223**, 599 (1956).
48. Slater E. C., Cleland K. W., *Biochem. J.* **53**, 547 (1953).
49. Slater E. C., Hülsmann W. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **47**, 1109 (1961).
50. Suranyi E. M., Ernster L., 1st FEBS Meeting, Londyn 1964, Abstracts A 86.
51. Tsou C. L., *Biochem. J.* **49**, 512 (1951).
52. Van Voorst J. D., Veeger C., DerVartanian D. V., *Biochim. Biophys. Acta* **146**, 367 (1967).
53. Wang T. Y., Tsou C. L., Wang Y. L., *Sci. Sinica, Peking*, **5**, 73 (1956).
54. Wang T. Y., Tsou C. L., Wang Y. L., *Sci. Sinica, Peking*, **7**, 65 (1958).
55. Wieland O., Weiss L., Eger-Neufeldt I., *Advan. Enzyme Regul.* **2**, 35 (1964).
56. Wojtczak A. B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 634 (1968).
57. Wojtczak A. B., *Biochim. Biophys. Acta* **172**, 52 (1969).
58. Wojtczak A. B., dane niepublikowane.
59. Wojtczak A. B., Łągwińska E., Wojtczak L., *Acta Biochim. Polon.* **15**, 15 (1968).
60. Wojtczak A. B., Wojtczak L., *Biochim. Biophys. Acta* **89**, 560 (1964).
61. Wojtczak L., Wojtczak A. B., Ernster L., *Biochim. Biophys. Acta*, w druku.
62. Wu I. T. Y., King T. E., *Federation Proc.* **26**, 732 (1967).
63. Yamashita S., Racker E., *J. Biol. Chem.* **243**, 2446 (1968).
64. Zeylemaker W. P., 5th FEBS Meeting, Praha 1968, Abstract No. 197.
65. Zeylemaker W. P., DerVartanian D. V., Veeger C., *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 183 (1965).
66. Zeylemaker W. P., Slater E. C., *Biochim. Biophys. Acta* **132**, 210 (1967).
67. Ziegler D. M., w *Biological Structure and Function*, red. T. W. Goodwin, O. Lindberg, Academic Press, New York 1961, str. 253.

ALEKSANDER KOJ *

Mechanizm utleniania tiosiarczanu w tkankach zwierzęcych

The Mechanism of Thiosulphate Oxidation in Animal Tissues

Oxidation of thiosulphate is probably initiated by the enzymic reductive breakdown of its molecule in the presence of a thiol compound with subsequent oxidation of sulphite to sulphate

Początek zainteresowania metabolizmem tiosiarczanu w organizmie zwierzęcym związany jest z wykryciem tego związku w moczu psów i kotów przez Schmieberg a (38) dokładnie 100 lat temu. Później (18, 19) tiosiarczan znaleziono w moczu różnych gatunków zwierząt i zdrowych ludzi oraz zaobserwowano wahania jego ilości zależne od diety. Losy tiosiarczanu w organizmie są interesujące z tej przyczyny, że związek ten stosowany jest w medycynie w celach leczniczych i diagnostycznych: stanowi on odtrutkę przeciw cyjankowi (9), iperytowi azotowemu (1) i iperytowi siarkowemu (5), używany bywa do badania funkcji nerek (4, 20), a także do pomiaru przestrzeni pozakomórkowej ustroju (10).

I. Powstawanie tiosiarczanu w organizmie zwierzęcym

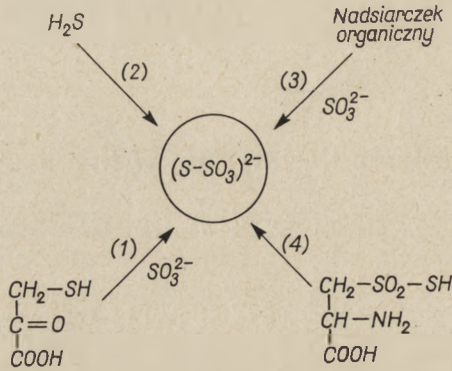
Pochodzenie endogennego tiosiarczanu wydalanego z moczem nie jest jednoznacznie wyjaśnione. Wielu autorów (18, 37) dyskutowało nad możliwością tworzenia tego związku przez florę jelitową, obecnie znamy jednak szereg reakcji enzymatycznych, zachodzących w tkankach zwierzęcych, które prowadzą do wytworzenia tiosiarczanu (schemat 1).

Powstawanie tiosiarczanu z β -merkaptopirogronianu i siarczynu (reakcja 1) wykazano w wątrobie, nerce i krwinkach czerwonych szczura

* Dr med., Katedra Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Jagielloński, Kraków.

(43), przy czym pośrednikiem w powyższej reakcji są niedyfundujące wielosiarczki (23).

Siarkowodór lub siarczek może być utleniany do tiosiarczuanu (reakcja 2) pod wpływem oksydazy obecnej w mitochondriach wątroby szczura (2) oraz kompleksów białka z metalami (3), a także w obecności hema-



Schemat 1. Główne drogi tworzenia tiosiarczuanu w tkankach zwierzęcych

1 — Transsulfuracja; 2 — Utlenianie; 3 — Transsulfuracja; 4 — Transaminacja i hydroliza

tyny i sulfhemoglobiny (44) przy czym pośrednikiem są wielosiarczki nieorganiczne (45).

Udział rodanazy w powstawaniu tiosiarczuanu (reakcja 3) był badany przez Szczepkowskiego (48), który wykazał, że enzym ten katalizuje transsulfurację między nadsiarczkiem organicznym oraz siarczynem. Koj i Frendo (27) zwrócili przed kilku laty uwagę na przypuszczalne powiązanie metaboliczne cystationazy i rodanazy, a ostatnio Szczepkowski i Wood (50) opisali sprzężony układ enzymatyczny, w którym nadsiarczek cystyny (tiocystyna) powstający pod wpływem cystationazy stanowi doskonały substrat dla transsulfuracji katalizowanej przez rodanazę.

Nadsiarczki organiczne mogą powstawać pod działaniem siarkowodoru na dwusiarczek organiczny: cystynę, cystaminę, kwas liponowy, lub utleniony glutation (48, 53), w reakcji siarki elementarnej z tiolem (23), przy rozkładzie cystyny w obecności fosfopirydoksalu i jonów miedzi (6) lub pod wpływem cystationazy (7), a także podczas kwaśnej hydrolizy białek (16). Nadsiarczki ulegają łatwo transsulfuracji na sulfoniany z wytworzeniem tiosulfonianów (13). Kwas alaninotiosulfonowy jest prekursorem tiosiarczuanu (reakcja 4), gdyż łatwo ulega transaminacji i dalszej hydrolizie (12). Przedstawione na schemacie 1 reakcje z pewnością nie wyczerpują wszystkich możliwości powstawania tiosiarczuanu w organizmie zwierzęcym, jak to zresztą podkreśla wielu autorów (11, 14).

II. Teorie utleniania tiosiarczanu przez tkanki zwierzęce i samożywne bakterie

Dorosły człowiek wydalą z moczem na dobę od 2 do 17 mg siarki tiosiarczanu, co stanowi 1—2% całkowitej ilości siarki zawartej w moczu (19). Liczby te przypuszczalnie nie odzwierciedlają rozmiarów syntezy tiosiarczanu w ustroju, gdyż od dawna wiadomo, iż w organizmie zwierzęcym tiosiarczan może utleniać się do siarczanu (34). Utlenianie tiosiarczanu zaobserwowano także podczas inkubacji skrawków wątroby w atmosferze tlenowej (37), jednakże próby homogenizacji tkanki i wyodrębnienia enzymów prowadziły do zaniku aktywności.

Nowe światło na metabolizm tiosiarczanu w ustroju zwierzęcym rzuciły badania Skarżyńskiego, Szczepkowskiego i Weber (41, 49). Autorzy ci wykazali, że po wstrzyknięciu szczurom tiosiarczanu znakowanego ^{35}S w pozycji zewnętrznej ($^{35}\text{S-SO}_3$) $^{2-}$ lub wewnętrznej ($\text{S-}^{35}\text{SO}_3$) $^{2-}$, siarka wewnętrzna jest szybko wydalana w moczu jako siarczan. Siarczan jest także ostatecznym produktem przemiany siarki zewnętrznej, która zostaje jednak zatrzymana przez dłuższy czas w organizmie szczura, co przemawia za tym, że wchodzi w jakieś procesy metaboliczne. Analizując związki siarki wydalane w moczu po jednoczesnym wstrzyknięciu szczurom cystyny znakowanej ^{35}S i nieaktywnego tiosiarczanu, autorzy ci doszli do wniosku, że pula metaboliczna tiosiarczanu w ustroju jest znacznie większa niż dotychczas przypuszczano, a szybki metabolizm tego związku w ustroju powoduje, że tylko niewielkie ilości tiosiarczanu występują w normalnym moczu. Jakkolwiek teorię przypisującą tiosiarczanowi rolę głównego prekursora siarczanów w moczu krytykowano później na podstawie obserwacji o enzymatycznej wymianie izotopowej (46), nie ulega wątpliwości, że doświadczenia Skarżyńskiego, Szczepkowskiego i Weber (41, 49) podkreśliły dynamiczny stan tiosiarczanu i jego istotną rolę w przemianach siarkowych ustroju.

Mechanizm utleniania tiosiarczanu w tkankach zwierzęcych próbowano wyjaśnić szukając pewnych analogii do przemian tego związku obserwowanych u samożywnych bakterii siarkowych z rodzaju *Thiobacillus*. Badania nad bakteriami doprowadziły do wysunięcia dwóch, częściowo przeciwstawnych poglądów: według pierwszego z nich tiosiarczan utleniany jest najpierw do czterotlionianu lub politionianów (32, 54, 55), według drugiego — ulega rozbiciu w błonie bakteryjnej z wytworzeniem siarczanu i aktywnej siarki zewnętrznej, która ulega dalszym procesom metabolicznym (40). Ten drugi pogląd potwierdzili Peck i Fisher (35, 36), którzy wykazali, że w ekstraktach bakteryjnych tiosiarczan pod wpływem glutationu i swoistego enzymu rozpada się na siarczek i siarczyn ulegający następnie utlenieniu do siarczanu w obecności AMP i nieorganicznego fosforanu. Ostatnio Charles i Suzuki (8) za-

obserwowali, że preparaty *Thiobacillus novellus* katalizują rozbitcie cząsteczki tiosiarczanu na siarczyn i siarkę elementarną, przy czym glutation jest niezbędny jedynie dla dalszego utleniania siarki. Mechanizm utleniania tiosiarczanu przez samożywne bakterie jest jednak nadal niecałkowicie wyjaśniony (25, 51, 52).

Prawdopodobnie w organizmach zwierzęcych politioniany nie odgrywają roli głównego pośrednika przemiany tiosiarczanu. Czterotionianu nie znaleziono nigdy w moczu czy preparatach tkankowych, a po wprowadzeniu do organizmu wykazuje on działanie toksyczne, zwłaszcza wobec nerek (21). Różne, obecne w tkankach związki -SH redukują łatwo czterotionian do tiosiarczanu z wytworzeniem organicznych dwusiarczków. Goffart i Fischer (22) zaobserwowali, że zatrucie czterotionianem prowadzi do spadku zawartości zredukowanego glutationu w tkankach, a zwłaszcza w nerkach.

Z drugiej strony w ostatnich latach uzyskano pewne dane zgodne z teorią zakładającą, że rozbitcie cząsteczki tiosiarczanu poprzedza jego utlenienie w tkankach zwierzęcych. Sörbo (47) potwierdził obserwacje Piriego (37) dotyczące tworzenia siarczanu z tiosiarczanu podczas inkubacji skrawków wątroby szczura w atmosferze tlenowej. Przy inkubacji skrawków w atmosferze powietrza reakcja była znacznie mniej wydajna, a rozbitcie struktury komórkowej przez homogenizację prowadziło do całkowitego zahamowania utleniania tiosiarczanu. Aktywność homogenatu można było przywrócić przez dodanie pewnych związków -SH: glutationu, kwasu dwuhydroliponowego, cysteiny czy merkaptopetanolu. Na podstawie tych spostrzeżeń Sörbo (47) sugerował, że redukcja tiosiarczanu w preparatach wątroby szczura jest przypuszczalnie katalizowana przez dwa enzymy: rodanazę i reduktazę tiosiarczanu; ten drugi enzym opisano poprzednio w drożdżach (24). Siarczyn powstający przez rozbitcie cząsteczki tiosiarczanu może być dalej utleniany samorzutnie lub pod działaniem swoistej oksydazy, którą wyosobniono z wątrób rozmaitych gatunków ssaków (33). Zaproponowany przez Sörbo mechanizm utleniania tiosiarczanu okazał się słuszny i w następstwie badań prowadzonych w ostatnich latach zidentyfikowano i wyodrębniono enzymy katalizujące ciąg reakcji metabolicznych przemiany tiosiarczanu w tkankach zwierzęcych.

III. Porównanie zdolności utleniania tiosiarczanu przez preparaty tkankowe

Inkubując skrawki rozmaitych tkanek szczura z tiosiarczanem w warunkach tlenowych Pirie (37) stwierdził powstawanie siarczanu w wątrobie oraz, w mniejszych ilościach, w nerce i łożysku.

W naszych badaniach (30) porównaliśmy szybkość utleniania tiosiarczanu do siarczanu w homogenatach ośmiu tkanek szczura po wzbogaceniu ich w glutation (tablica 1). Jednocześnie oznaczano aktywność rodanazy, reduktazy tiosiarczanu i oksydazy siarczynowej.

Tablica 1

Utlenianie tiosiarczanu do siarczanu oraz aktywność pewnych enzymów w homogenatach tkanek szczura (30)

Tkanka	Przyrost siarcza- nu μ mole/g białka/godz.	Rodanaza μ mole SCN^- /g białka /5 min.	Reduktaza tio- siarczanu μ mole SO_3^{2-} /g biał- ka/15 min	Oksydaza siarczyno- wa μ mole SO_3^{2-} /g białka/godz.
Wątroba	56,5	3620	48	154
Nerka	20,6	3700	26	235
Śledziona	3,4	170	poniżej 4	poniżej 10
Płuco	10,2	680	5	25
Mózg	poniżej 1	770	17	20
Mięsień	4,5	280	5	45
Jelito	poniżej 1	100	poniżej 4	68
Jądra	6,9	920	6	41

Homogenaty tkanek w roztworze 0,05 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ inkubowano przez 60 min. w atmosferze tlenu z 5 μ molami tiosiarczanu i 5 μ molami glutationu, a następnie oznaczono przyrost ilości siarczanu kolorymetryczną metodą z chloranilanem baru. Równocześnie w osobnych próbkach homogenatów oznaczono aktywność rodanazy, reduktazy tiosiarczanu i oksydazy siarczynowej

Najbogatszym źródłem tych enzymów okazała się wątroba i nerka, inne tkanki wykazują na ogół niewielką aktywność. Należy zwrócić uwagę, że nerka wykazuje najwyższą aktywność rodanazy i oksydazy siarczynowej, a mniejszą zdolność utleniania tiosiarczanu w porównaniu z wątrobą, gdzie stwierdza się więcej reduktazy tiosiarczanu. Przemawia to za teorią przypisującą temu ostatniemu enzymowi zasadnicze znaczenie dla zapoczątkowania procesu utleniania tiosiarczanu.

Powszechnie wiadomo, że rodanaza jest typowym enzymem mitochondrialnym (15). Według naszych obserwacji także pozostałe dwa enzymy zawarte są głównie w mitochondriach, co zgadza się z obserwacją, że utlenianie tiosiarczanu do siarczanu jest około dwudziestokrotnie większe w mitochondriach niż w nadsączu. Należy jednakże zwrócić uwagę na fakt, że rozmieszczenie rodanazy i reduktazy tiosiarczanu we frakcjach subkomórkowych nie jest identyczne. Wyższą aktywność reduktazy tiosiarczanu w nadsączu można tłumaczyć łatwiejszym uwalnianiem tego enzymu z mitochondriów lub istnieniem dwóch izozymów.

We frakcjach mitochondrialnych uzyskanych z wątrób ośmiu gatunków zwierząt badano utlenianie tiosiarczanu i aktywność trzech enzymów (tablica 2). Obserwuje się ogromną zmienność badanych parametrów nie tylko między głównymi typami — ssakami, ptakami, płazami i ryba-

mi — ale także między dość spokrewnionymi gatunkami (szczur i chomik). Może to przemawiać za przypuszczeniem, że enzymy metabolizujące tiosiarczan należą do grupy enzymów indukowanych pod wpływem diety czy warunków środowiska.

Tablica 2

Utlenianie tiosiarczanu do siarczanu i aktywność pewnych enzymów we frakcjach mitochondrialnych z wątrób różnych gatunków zwierząt (30)

Gatunek	Przyrost siarcza- nu $\mu\text{mole/g}$ biał- ka/godz.	Rodanaza $\mu\text{mole SCN}^-/\text{g}$ białka/5 min.	Reduktaza tiosiarc- czanu $\mu\text{mole SO}_3^{2-}/$ g białka/15 min.	Oksydaza siarczyno- wa $\mu\text{mole SO}_3^{2-}/\text{g}$ białka/godz.
Szczur	242	11600	93	410
Chomik	69	7300	74	276
Wół	52	10400	58	180
Gołąb	38	800	56	84
Żaba	5	6400	7	55
Aksolotl	5	720	16	37
Pstrąg	205	poniżej 100	92	205
Karp	65	poniżej 100	65	161

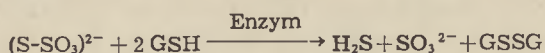
Mitochondria żaby i aksolotla nie wykazują praktycznie zdolności do utleniania tiosiarczanu, podczas gdy mitochondria szczura czy pstrąga mogą wytworzyć ponad 200 $\mu\text{mole SO}_4^{2-}/\text{g}$ białka/godz. Wyniki te są wyraźnie skorelowane z zawartością reduktazy tiosiarczanu i oksydazy siarczynowej. Natomiast nie ma korelacji między zawartością rodanazy i reduktazy tiosiarczanu u pewnych gatunków zwierząt: mitochondria żaby są bardzo bogate w rodanazę, a ubogie w reduktazę tiosiarczanu, a mitochondria karpia zawierają mało rodanazy, a dużo reduktazy. Uzyskane wyniki należy jednak traktować z pewnym zastrzeżeniem wynikającym z faktu, że specyficzność substratowa rodanazy zależy w dużej mierze od gatunku zwierzęcia.

IV. Rola związków -SH w inicjowaniu utleniania tiosiarczanu

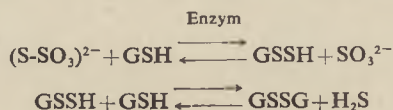
Proces utleniania tiosiarczanu do siarczanu przez preparaty tkankowe ulega wybitnemu przyspieszeniu po dodaniu glutationu lub innych związków -SH. Względna aktywność różnych tioli w reakcji utleniania tiosiarczanu przez pełny homogenat wątroby szczura wynosiła według S ö r b o (47): glutation — 100, dwuhydroliponian — 101, cysteina — 31, merkaptoetanol — 63. Dla mitochondriów wątroby szczura K o j i F r e n d o (30) podali nieco inne wartości: glutation — 100, cysteina — 9, dwuhydroliponian — 45.

Rola tioli polega przypuszczalnie na rozbięciu cząsteczki tiosiarczanu w obecności odpowiedniego enzymu (rodanaza, reduktaza tiosiarczanu). Podczas inkubacji homogenatu wątroby wzbogaconego w tiosiarczan i glutation S ö r b o (47) wykazał powstawanie znacznych ilości siarczynu. Podobne obserwacje przy użyciu frakcji mitochondrialnych oraz cysteiny, dwuhydroliponianu i glutationu przeprowadzili K o j i F r e n d o (30). Udało się im także wykazać, że z tiosiarczanu znakowanego ^{35}S w zewnętrznym atomie siarki podczas inkubacji z tiolami i mitochondriami wytwarzał się radioaktywny H_2S . Aktywność właściwa siarkowodoru powstającego po dodaniu glutationu i dwuhydroliponianu była zbliżona do aktywności właściwej tiosiarczanu, co wskazuje, że związek ten był jedynym prekursorem H_2S . W przypadku cysteiny aktywność właściwa siarkowodoru była wyraźnie niższa, przypuszczalnie wskutek działania cystationazy obecnej w wątrobie szczura i mającej zdolność odszczepiania H_2S z tego aminokwasu (27).

Funkcja glutationu lub innego związku $-\text{SH}$ w inicjowaniu utleniania tiosiarczanu polega przypuszczalnie na dostarczeniu elektronów w reakcji rozpadu cząsteczki tiosiarczanu (36, 53):



Według niektórych autorów (46, 53) pośrednim etapem opisanej reakcji jest tworzenie ugrupowania nadsiarczowego:



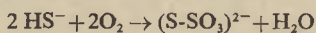
Ugrupowania nadsiarczowe są bardzo reaktywne (48) i nie udało się wykazać ich nagromadzenia podczas utleniania tiosiarczanu (30). Należy wspomnieć, że przy użyciu tiosiarczanu znakowanego w atomie zewnętrznym i po zastosowaniu elektroforezy bibułowej stwierdzono występowanie drobnych ilości związku zachowującego się jak tiocysteina (28).

Udowodniono ponadto, że utlenianiu tiosiarczanu w opisanych doświadczeniach towarzyszy ubytek zredukowanego glutationu. Jeśli oba atomy siarki po rozbięciu cząsteczki tiosiarczanu utleniały się ostatecznie do siarczynu, to ubytek GSH powinien być równoważny przyrostowi siarczynu. W rzeczywistości stwierdzono, że na każdy μmol wytworzonego siarczynu ulegało utlenieniu około $1,3 \mu\text{mola}$ GSH. Obserwacja ta przypuszczalnie wiąże się z faktem, że utlenienie siarczynu do siarczynu jest procesem wielostopniowym, w którym mogą brać udział dalsze cząsteczki zredukowanego glutationu.

V. Losy zewnętrznego atomu tiosiarczanu podczas utleniania

Dalsze informacje o mechanizmie utleniania tiosiarczanu przez mitochondria wątroby szczura uzyskano dzięki zastosowaniu izotopów (31). Izotopowe oznaczenia nie pokrywają się z chemicznymi i wskazują, że wewnętrzny atom tiosiarczanu przekształcany jest w siarczan znacznie łatwiej niż zewnętrzny. Ponadto istnieje oczywista rozbieżność między ilością znakowanego siarczanu wytworzonego z $(S-^{35}SO_3)^{2-}$ a ilością tiosiarczanu zużytego podczas inkubacji (jeden wewnętrzny znakowany atom siarki tiosiarczanu może dać tylko jedną cząsteczkę znakowanego siarczanu). Wyniki takie uzyskiwano zawsze gdy próbka inkubowana zawierała dużą ilość tiosiarczanu (15 μ moli). Natomiast gdy warunki doświadczenia pozwalały na praktycznie całkowite utlenienie tiosiarczanu podczas inkubacji (3 μ mole tiosiarczanu i 10 μ moli glutationu w próbce) różnice między tiosiarczanem znakowanym w atomie zewnętrznym i wewnętrznym zanikały. W takim przypadku ilość wytworzonego siarczanu obliczona metodą izotopową stanowiła około połowę całkowitej ilości powstającego siarczanu i była bliska ilości zużytkowanego tiosiarczanu.

Wyniki te można wytłumaczyć zakładając, że w pierwszym etapie zachodzi w obecności glutationu rozpad reduktywny cząsteczki tiosiarczanu. W dalszym etapie siarczyny utlenia się do siarczanu, a siarczek do nowej cząsteczki $(S-SO_3)^{2-}$:



Zatem w przypadku, gdy tylko drobna część tiosiarczanu obecnego w próbce ulega przemianie, siarczan powstaje głównie z wewnętrznego atomu siarki, a ilość tworzonego znakowanego siarczanu przekracza zużytkowywanie tiosiarczanu, który regeneruje się z atomów zewnętrznych. Jeśli założenie to jest słuszne, można oczekiwać, że przy utlenianiu tio-

Tablica 3

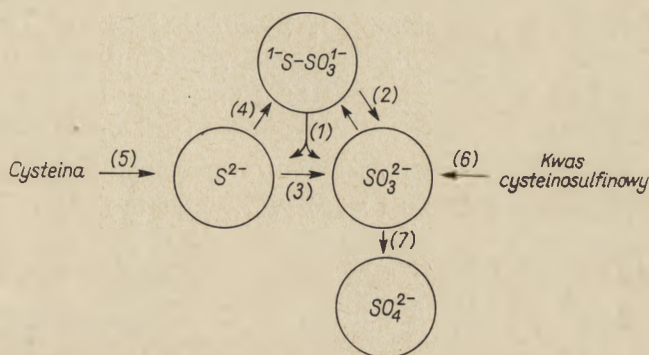
Tworzenie siarczanu z tiosiarczanu znakowanego w zewnętrznym atomie siarki (31)

Czas inkubacji (min.)	Zużycie tiosiarczanu (μ mole)	Przyrost tiosiarczanu (μ mole)		Akt. wł. (imp/min/ μ mol)	
		Metoda chemiczna	Metoda izotopowa	Siarczan	Wewnętrzny atom tiosiarczanu
0	0	0	0,01	—	480
0—20	1,2	2,3	0,15	2340	5300
20—40	0,8	1,4	0,25	6420	9080
40—60	0,5	0,6	0,17	10900	12500

Zawiesinę mitochondriów (19 mg białka) inkubowano w atmosferze tlenowej przez 20, 40 i 60 min. w obecności 10 μ moli GSH i 10 μ moli $(^{35}S-SO_3)^{2-}$ (akt. wł. 43.000 imp/min/ μ mol). Znakowany siarczan izolowano na kolumnie Dowex 2, radioaktywny tiosiarczan analizowano pod względem rozmieszczenia znakowanych atomów po cyjanolizie w obecności jonów Cu^{2+}

siarczanu znakowanego w atomie zewnętrznym przejściowo będzie się pojawiać tiosiarczan znakowany w obu atomach siarki. Przemawia za tym doświadczenie przedstawione w tablicy 3.

Szybkość rozkładu tiosiarczanu i produkcja siarczanu mierzone metodami chemicznymi zmniejszają się stopniowo w ciągu inkubacji, podczas gdy aktywność właściwa powstającego siarczanu oraz aktywność właściwa wewnętrznego atomu tiosiarczanu ciągle wzrastają. Stosunek tych aktywności właściwych nasuwa wniosek, że wewnętrzny atom tiosiarczanu zachowuje się jak prekursor siarczanu. Nie przeczy to oczywiście założeniu, że bezpośrednim prekursorem siarczanu jest siarczyn, gdyż w badanym układzie doświadczalnym pula siarczynu jest względnie mała, a sam siarczyn może pozostawać w stanie równowagi z wewnętrznym atomem tiosiarczanu wskutek reakcji wymiany katalizowanej przez rodanazę (46). Przypuszczalne zależności między tiosiarczanem, siarczkiem, siarczynem i siarczanem przedstawia schemat 2.



Schemat 2. Cykl tiosiarczanowy w procesie tworzenia siarczanu w tkankach zwierzęcych

(1) Reduktywny rozpad cząsteczki tiosiarczanu w obecności tiolu (rodanaza, reduktaza tiosiarczanu), (2) Wymiana siarczynu z wewnętrznym atomem tiosiarczanu (rodanaza), (3) Utlenianie siarczku do siarczynu (nieenzymatyczne, oksydaza siarczkowa), (4) Utlenianie siarczku do tiosiarczanu (pochodne hematyny, oksydaza siarczkowa, metaloproteidy, nieenzymatyczne), (5) Powstawanie siarczku z cysteiny (cystationaza), (6) Tworzenie siarczynu z kwasu cysteinosulfonowego (transaminaza, desulfinaza), (7) Utlenianie siarczynu do siarczanu (oksydaza siarczynowa)

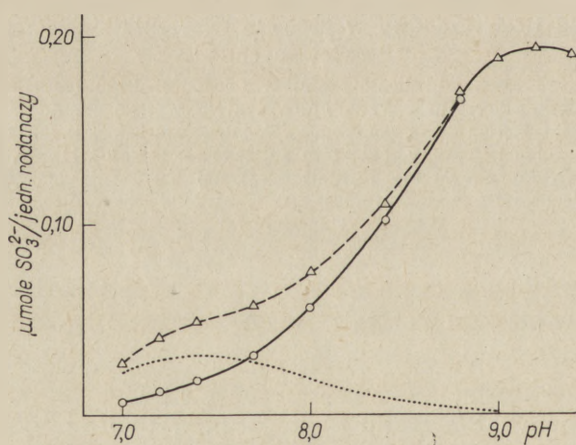
Trudno obecnie zdecydować czy zewnętrzny atom tiosiarczanu wbudowywany jest w pozycję wewnętrzną tylko przez bezpośrednie utlenianie siarczku do tiosiarczanu (reakcja 4, schemat 2), czy też siarczek utlenia się najpierw do siarczynu (reakcja 3), a potem ulega wymianie z wewnętrznym atomem tiosiarczanu (reakcja 2). W takim przypadku siarczyn mógłby być traktowany jako prekursor zarówno siarczanu jak i wewnętrznego atomu tiosiarczanu.

Sposób przedstawiania metabolizmu siarki na schemacie 2 podkreśla hipotetyczną centralną pozycję tiosiarczanu w procesie tworzenia siarcza-

nu w tkankach zwierzęcych. Rozmaite reakcje wiodące do powstania tiosiarczanu przedyskutowano na wstępie artykułu. Tutaj należy dodać, że siarczek może być wytwarzany z cystyny lub cysteiny przez cystatio-
nazę (desulfhydrazę) (27), natomiast transaminacja kwasu cysteinosulfi-
nowego prowadzi ostatecznie do uwolnienia się siarczynu (39). Biologiczne
znaczenie przedstawionego na schemacie 2 cyklu tiosiarczanowego może
polegać na opóźnieniu procesów nieodwracalnego utlenienia siarczku
i siarczynu do siarczanu.

VI. Enzymatyczna redukcja tiosiarczanu w preparatach wątroby

Nie ulega już wątpliwości, że utlenienie tiosiarczanu poprzedzone jest
przez jego enzymatyczny rozkład w obecności związków -SH. Reakcja
ta może być katalizowana przez rodanażę lub reduktazę tiosiarczanu.
Rozróżnienie obu enzymów było przez długi czas niezbyt ściśle. S o r b o
(47) oparł ten podział na założeniu, że rodanażę rozkłada tiosiarczan
w obecności cyjanku lub dwuhydroliponianu, natomiast jest nieaktywna
z cysteiną lub glutationem (46, 53). Ostatnio przebadano ponownie spe-
cyfikność substratową rodanaży (26); uzyskane wyniki wskazują, że
enzym ten jest mało swoistą transferazą atomu siarki, którego akcepto-
rami mogą być oprócz cyjanku i siarczynu rozmaite związki -SH, a więc
także glutation i cysteina. Szybkość redukcji tiosiarczanu przez roda-
nażę w obecności glutationu zależy wybitnie od wartości *pH*; maksimum
aktywności przypada około *pH* 9 (rysunek 1).



Rys. 1. Redukcja tiosiarczanu w obecności glutationu katalizowana przez krystaliczną rodanażę lub świeży homogenat wątroby wołu (26)

Δ — — — Δ pełny homogenat (a), O — — — O krystaliczna rodanaż (b), różnica między (a) i (b)

W świeżym homogenacie wątroby wołowej krzywa zależności szybkości redukcji tiosiarczanu od *pH* wygląda odmiennie, a różnica ta wynika z obecności drugiego enzymu — reduktazy tiosiarczanu. W przeciwieństwie do rodanazy optymalne warunki działania tego enzymu są bliskie odczynowi obojętnemu. Podczas inkubacji homogenatu wątroby wołowej z tiosiarczanem i glutationem w *pH* 7,4 tylko około 35% ilości siarczynu powstaje wskutek działania rodanazy, a resztę wytwarza reduktaza tiosiarczanu. W toku zabiegów preparatywnych enzym ten ulega stosunkowo łatwo inaktywacji i dotychczas nie udało się go otrzymać w stanie znacznego oczyszczenia.

VII. Enzymatyczny model utleniania tiosiarczanu

Fracjonowanie świeżego homogenatu wątroby wołu lub szczura w celu wyodrębnienia rodanazy prowadzi rychło do utraty zdolności utleniania tiosiarczanu do siarczanu podczas inkubacji z glutationem w atmosferze tlenowej (29). Okazało się jednak, że aktywność tę można przywrócić przez dodanie do rodanazy oczyszczonego preparatu oksydazy siarczynowej, który sam nie wykazuje zdolności utleniania tiosiarczanu (tablica 4).

Tablica 4

Utlenianie tiosiarczanu do siarczanu przez sprzężony układ enzymatyczny (26a)

Nr próbki	Skład próbki				Zużycie tiosiarczanu (μmole)	Przyrost siarczanu (μmole)
	Rodanaza (jedn. akt.)	Oksydaza siarczynowa (jedn. akt.)	Tiosiarczan (μmole)	Glutation (μmole)		
1	0	200	10	10	0	0
2	630	0	10	10	0,10	0
3	630	200	10	10	0,95	2,09

Krystaliczną rodanazę otrzymano z wątroby wołu według metody Sørbo (42), a preparat oksydazy siarczynowej z wątroby szczura według metody McLeod i wsp. (33). Końcowa objętość próbki 2 ml, *pH* 8,0. Inkubacja 60 min. w atmosferze tlenu.

W ten sposób udało się doświadczalnie odtworzyć model utleniania tiosiarczanu w tkankach zwierzęcych. W naturze układ ten jest bezwątpienia bardziej skomplikowany, gdyż wiemy, że conajmniej dwa enzymy mogą katalizować redukcyjny rozpad cząsteczki tiosiarczanu. Również utlenianie siarczynu do siarczanu przyspiesza nie tylko oksydaza siarczynowa, ale także nieswoiście rozmaite enzymy, pod których działaniem powstaje nadtlenek wodoru (17). Nie ulega wątpliwości, że pełny model enzymatyczny powinien zawierać także odpowiedni czynnik przyspieszający utlenianie siarkowodoru powstającego z rozpadu tiosiarczanu. Za-

obserwowano bowiem, że zarówno siarczyny jak i siarczki nagromadzające się w środowisku reakcyjnym hamują dalszy rozpad tiosiarczczanu (26a).

Jakkolwiek dla uzyskania pełnego obrazu kinetyki utleniania tiosiarczczanu niezbędne są dalsze badania zarówno przy użyciu preparatów tkankowych jak i oczyszczonych enzymów w obecności rozmaitych związków -SH, przemiana tiosiarczczanu w tkankach zwierzęcych jest w zasadzie wyjaśniona.

LITERATURA

1. Anderson J. M., *Cancer* **16**, 1281 (1963).
2. Baxter C. F., van Reen R., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 567 (1958).
3. Baxter C. F., van Reen R., *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 573 (1958).
4. Brun C., *Acta Med. Scand. Suppl.* **234**, 63 (1949).
5. Callaway S., Pierce K. A., *Brit. J. Pharmacol.* **13**, 395 (1958).
6. Cavallini D., de Marco C., Mondovi B., *Arch. Biochem. Biophys.* **87**, 281 (1960).
7. Cavallini D., Mondovi B., De Marco C., Scioscia-Santoro A., *Arch. Biochem. Biophys.* **96**, 456 (1962).
8. Charles A. M., Suzuki I., *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 510 (1966).
9. Chen K. K., Rose C. L., *J. Am. Med. Assoc.* **149**, 113 (1952).
10. Cordozo R. H., Edelman I. S., *J. Clin. Invest.* **31**, 280 (1952).
11. De Marco C., Bognolo D., Coletta M., *Ital. J. Biochem.* **11**, 221 (1962).
12. De Marco C., Coletta M., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 257 (1961).
13. De Marco C., Coletta M., Cavallini D., *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 178 (1961).
14. De Marco C., Coletta M., Mondovi B., Cavallini D., *Ital. J. Biochem.* **9**, 3 (1960).
15. Dixon M., Webb E. C., *Enzymes*, Longmans, Londyn 1964.
16. Fletcher J. C., Robson A., *Biochem. J.* **87**, 553 (1963).
17. Fridovich I., Handler P., *J. Biol. Chem.* **236**, 1836 (1961).
18. Fromageot C., Royer A., *Enzymologia* **11**, 361 (1945).
19. Gast J. H., Arai K., Aldrich F. L., *J. Biol. Chem.* **196**, 875 (1952).
20. Gilman A., Philips F. S., Koelle E. S., *Am. J. Physiol.* **146**, 348 (1946).
21. Gilman A., Philips F. S., Koelle E. S., Allen R. P., John E. S., *Am. J. Physiol.* **147**, 115 (1946).
22. Goffart M., Fischer P., *Arch. Int. Physiol.* **55**, 528 (1947—48).
23. Hylin J. W., Wood J. L., *J. Biol. Chem.* **234**, 2141 (1959).
24. Kaji A., Mc Elroy W. D., *J. Bacteriol.* **77**, 630 (1959).
25. Kelly D. P., Syrett P. J., *Biochem. J.* **98**, 537 (1966).
26. Koj A., *Acta Biochim. Polon.* **15**, 161 (1968).
- 26a. Koj A., dane nie publikowane.
27. Koj A., Frendo J., *Acta Biochim. Polon.* **9**, 373 (1962).
28. Koj A., Frendo J., Proc. 2nd FEBS Meeting, Vienna 1965, str. 52.
29. Koj A., Frendo J., Proc. 3rd FEBS Meeting, Warsaw 1966, str. 188.
30. Koj A., Frendo J., *Folia Biol. (Kraków)* **15**, 49 (1967).
31. Koj A., Frendo J., Janik Z., *Biochem. J.* **103**, 791 (1967).
32. London J., Rittenberg S. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 1183 (1964).

33. McLeod R. M., Farkas W., Fridovich I., Handler P., *J. Biol. Chem.* **236**, 1841 (1961).
34. Nyiri W., *Biochem. Z.* **141**, 160 (1923).
35. Peck H. D. jr., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 1053 (1960).
36. Peck H. D. jr., Fisher E., *J. Biol. Chem.* **237**, 190 (1962).
37. Pirie N. W., *Biochem. J.* **28**, 1063 (1934).
38. Schmiedeberg O., *Arch. Heilk.* **8**, 422 (1867).
39. Singer T. P., Kearney E. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **61**, 397 (1956).
40. Skarżyński B., Ostrowski W., Krawczyk A., *Bull. Acad. Polon. Sci. (II)* **5**, 159 (1957).
41. Skarżyński B., Szczepkowski T. W., Weber M., *Nature* **184**, 994 (1959).
42. Sörbo B., w *Methods in Enzymology*, tom II, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1955, str. 234.
43. Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 324 (1957).
44. Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 324 (1958).
45. Sörbo B., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 349 (1960).
46. Sörbo B., *Acta Chem. Scand.* **16**, 243 (1962).
47. Sörbo B., *Acta Chem. Scand.* **18**, 821 (1964).
48. Szczepkowski T. W., *Acta Biochim. Polon.* **8**, 251 (1961).
49. Szczepkowski T. W., Skarżyński B., Weber M., *Nature* **189**, 1007 (1961).
50. Szczepkowski T. W., Wood J. L., *Biochim. Biophys. Acta* **139**, 469 (1967).
51. Trudinger P. A., *J. Bacteriol.* **89**, 617 (1965).
52. Trudinger P. A., *Rev. Pure Appl. Chem.* **17**, 1 (1967).
53. Villarejo M., Westley J., *J. Biol. Chem.* **238**, 4016 (1963).
54. Vishniac W., Santer M., *Bacteriol. Rev.* **21**, 195 (1957).
55. Vishniac W., Trudinger P. A., *Bacteriol. Rev.* **26**, 168 (1962).

K o m u n i k a t

Sekretariat Międzynarodowej Unii Biochemicznej zawiadamia, że VIII Międzynarodowy Kongres Biochemii zamiast w Rzymie odbędzie się w Szwajcarii. Sympozja będą miały miejsce w Interlaken, Lucernie i Montreux od dnia 3 do 9 września 1970 roku.

Wszelkich informacji o VIII Kongresie udziela p. *Francis J. Griffin*, 14 Belgrave Square, London SW 1.

ANDRZEJ GARDAS *

Żelazo niehemowo związane w enzymach oksydoredukcyjnych

Non-hem Iron in Red-Ox Enzymes

The properties of electron transfer non-hem iron proteins and the mode of iron binding to the proteins are reviewed.

W 1954 roku *Mahler* i wsp. (33, 35) stwierdzili, że oksydoreduktaza zredukowanego NAD: cytochrom *c* zawiera znaczne ilości żelaza związanego niehemowo. Żelazo niehemowo związane wykryto następnie w dehydrogenazie bursztynianowej (60), dehydrogenazie kwasu orotowego (1), oksydazie ksantynowej (50, 51) i kompleksach I, II i III łańcucha oddechowego (25, 26). Przypuszczano, że bierze ono udział w wiązaniu substratu bądź koenzymu (na przykład flawiny) przez białko enzymatyczne (34) lub udział w transporcie elektronów (25, 35, 68). Ostatnie przypuszczenie uzyskało już w latach 1954—1956 pewną podbudowę doświadczalną: w wielu pracowniach stwierdzono, że forma zredukowana dehydrogenazy zredukowanego NAD zawiera dwa razy więcej żelaza zredukowanego niż forma utleniona. Nie można jednak wykluczyć chemicznej redukcji żelaza przez grupy tiolowe, lub zredukowaną formę flawiny (61). O udziale żelaza w przeniesieniu elektronów jednoznacznie świadczyłaby zmiana jego wartościowości w czasie reakcji zachodząca z szybkością równą szybkości reakcji enzymatycznej.

Równocześnie z wykryciem żelaza niehemowo związanego w wymienionych wyżej enzymach flawoproteidowych *Davenport*, *Hill* i *Whatley* (20) wyodrębnili z chloroplastów szpinaku ferroproteid, niezbędny do przeprowadzenia redukcji methemoglobiny (sztuczny akceptor elektronów) przez naświetlane chloroplasty. Okazał się on identyczny z otrzymaną przez *San Pietro* i *Langa* (57) fotosyntetyczną reduktazą nukleotydów nikotynamidoadeninowych. Podobne właściwości chemiczne do omawianego enzymu wykazywały ferredoksyny z bakterii

* Mgr, Zakład Enzymatyki, Katedra Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: *p-CMB* — *p*-chlorortęciobenzoesan.

beztlenowych (40, 41). Nazwa ferredoksyna początkowo nadana żelazo-proteidom wyodrębnionym z beztlenowych bakterii została następnie rozszerzona i na enzymy z roślin zielonych, zawierające niehemowo związane żelazo o niskim potencjale oksydoredukcyjnym.

W 1965 roku Kimura i Suzuki (28, 64, 69) oraz niezależnie Omura i wsp. (44) otrzymali z kory nadnerczy ferroproteid biorący udział w procesie hydroksylacji hormonów sterydowych nadnerczy w pozycji 11 β i 18 (42, 44). Enzym ten, wykazujący szereg zbliżonych własności chemicznych do ferredoksyny nazwano androdoksyną. Można zatem różnić dwie grupy enzymów zawierających żelazo niehemowo związane: do pierwszej należą ferroflawoproteidy, a do drugiej ferroproteidy nie zawierające flawiny — ferredoksyny i androdoksyna. Wszystkie te enzymy wykazują wiele wspólnych własności fizycznych i chemicznych, dlatego też wysunięto przypuszczenie, że mają one podobnie zbudowaną grupę prostetyczną zawierającą żelazo.

W artykule zostaną omówione niektóre własności wyżej wymienionych enzymów, wynikające z obecności żelaza niehemowo związanego oraz budowa i rola tej nowo poznanej grupy prostetycznej.

I. Niektóre własności ferroproteidów przenoszących elektrony

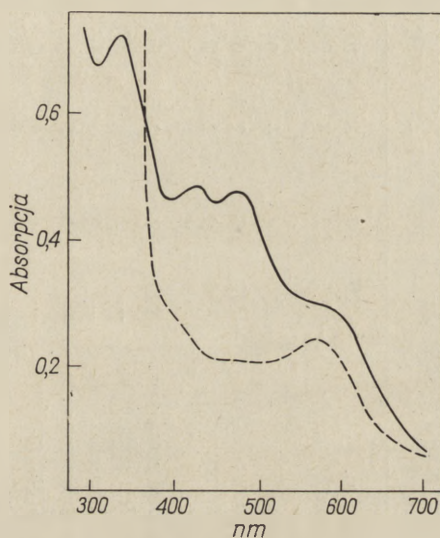
We wszystkich poznanych dotychczas enzymach zawierających żelazo związane niehemowo ulega ono odszczepieniu pod wpływem 1N kwasu solnego lub innych kwasów mineralnych z równoczesnym wydzielaniem równoważnych ilości siarkowodoru (38, 39, 56). Żelazo związane z enzymem nie ulega wymianie z żelazem środowiska i jest konieczne do zachowania aktywności enzymatycznej. Niektóre ferroproteidy, jak na przykład ferredoksyna czy androdoksyna, tracą żelazo w czasie dializy w roztworach zawierających związki chelatujące metale, inne, na przykład dehydrogenaza zredu. NAD, nie uwalniają żelaza nawet w czasie długotrwałej dializy w roztworze o-fenantroliny lub 8-hydroksychinoliny. Przyczyną tych różnic może być różna dostępność centrum zawierającego żelazo.

Widma absorbcyjne enzymów ferroproteidowych ferroflawoproteidowych po wyeliminowaniu udziału absorbcji flawiny są bardzo podobne. W formie utlenionej mają one maksima absorbcji przy 300—330, 390—420, 450—460 i często szerokie pasmo przy 550 nm (36, 65, 66). Po redukcji substratem lub podsiarczynem sodowym część pasm absorbcyjnych zanika lub ulega przesunięciom. Przykładem może tu być widmo zredukowanej i utlenionej formy ferroproteidu otrzymanego z *Azotobacter vinelandii* (rysunek 1).

Potencjał oksydoredukcyjny omawianych enzymów waha się w bardzo szerokich granicach: dla ferredoksyny z liści szpinaku wynosi —432

mV, a dla androdoksyny +164 mV. Wydaje się jednak, że zależy on w znacznej mierze od białka enzymatycznego. Zjawisko to spotyka się i w innej grupie enzymów — wśród nie zawierających żelaza flawoproteidów, które różnią się znacznie wartością potencjału oksydoredukcyjnego, choć zawierają ten sam koenzym. W tablicy 1 zestawiono niektóre własności fizykochemiczne poznanych dotąd ferroproteidów.

Jedną z bardzo ważnych właściwości fizycznych enzymów ferroproteidowych są ich własności paramagnetyczne. Jednak ze względu na małą wartość podatności magnetycznej pomiar jej nie mógł znaleźć zastosowania w charakterystyce tych enzymów. Udało się to dopiero po wprowadzeniu



Rys. 1. Widmo absorpcyjne ferroproteidu otrzymanego z *Azotobacter vinelandii* (58)

dzeniu spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ERP). W 1960 roku w pracowni Beinerta (8, 9, 13, 54) zaobserwowano w widmie ERP dehydrogenazy bursztynianowej nieznaną sygnal złożony z trzech pasm g_x , g_y i g_z , z których główne (g_y) wykazuje współczynnik rozszczepienia $g = 1,94$. Wartość współczynnika niższa od wartości dla wolnego elektronu wykluczała udział wolnych rodników w tworzeniu tego sygnalu. Jak wykazano później dają go wszystkie zawierające związane niehemowo żelazo enzymy po redukcji substratem lub podsiarczkiem sodowym. Sygnal ten zanika po utlenieniu, a w większości przypadków można go obserwować tylko w bardzo niskich temperaturach (20—140°K), gdyż z podwyższeniem temperatury pasmo absorpcji ulega znacznemu poszerzeniu i tym samym spłaszczeniu poza granice czułości obecnie dostępnych spektroskopów (10). Sygnal ten daje się stosunkowo łatwo zaobserwować w enzymach ferroflawoproteidowych i androdoksynie, wiele trudności sprawiało natomiast jego wykrycie w widmie

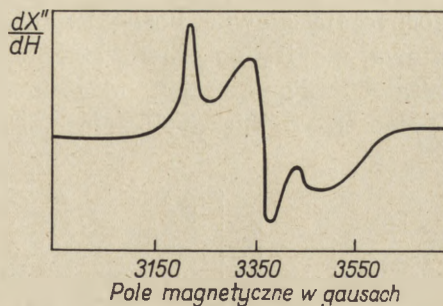
Tablica 1

Niektóre własności ferroproteidów biorących udział w przenoszeniu elektronów

Nazwa	Źródło	E' ₀ mV	Składniki mole/mol białka				Masa cząsteczkowa	Literatura
			Fe	H ₂ S	FMN	FAD		
Ferredoksyna	<i>Clostridium sp.</i>	-420	8	8	0	0	6.000	30, 62
Ferredoksyna	<i>Chromatium</i>	-490	3	3	0	0	5.600	2
Ferroproteid o wysokim potencjale redoks	<i>Chromatium</i>	-350	4	4	0	0	9.500	6
Ferredoksyna	Rośliny zielone	-432	2	2	0	0	13.000	23, 66
Adrenodoksyna	Kora nadnerczy	+150	2	2	0	0	22.000	28, 43, 64, 69
Ferroproteid z oksydoreduktazy koenzym Q-cytochrom c	Mitochondria serca wołu	+220	2	2	0	0	26.000	19, 52
Dehydrogenaza bursztynianu	Mitochondria serca wołu	—	8	4	1*		200.000	71
Dehydrogenaza bursztynianu	Mitochondria serca wołu	—	8	8	1*		200.000	29
Dehydrogenaza zred. NAD	Mitochondria serca wołu	—	18	28	1	0	500.000	59
Dehydrogenaza kwasu orotowego	Zymobacterium oroticum	—	4	4	2	2	120.000	1
Oksydaza ksantyny	Mleko	—	8	8	0	2	280.000	1
Oksydaza aldehydów	Wątroba	—	8	9	0	2	300.000	1

* Flawiną tą nie jest ani FAD ani FMN

ERP ferredoksyny. Jak wykazano niedawno (46) wynikało to z faktu, że forma zredukowana ferredoksyny powstająca w reakcji ze zreduk. NADP ulega szybko utlenieniu przez wytworzony NADP⁺. Dopiero dodanie do układu specyficznej NADP-azy rozkładającej tylko formę utlenioną koenzymu umożliwiło wykrycie w ferredoksynie sygnału $g = 1,94$. Widmo ERP ferredoksyny z *Clostridium pasteurianum* przedstawia rysunek 2.



Rys. 2. Widmo ERP ferredoksyny z liści szpinaku (na osi rzędnych odłożono drugą pochodną absorpcji) (46)

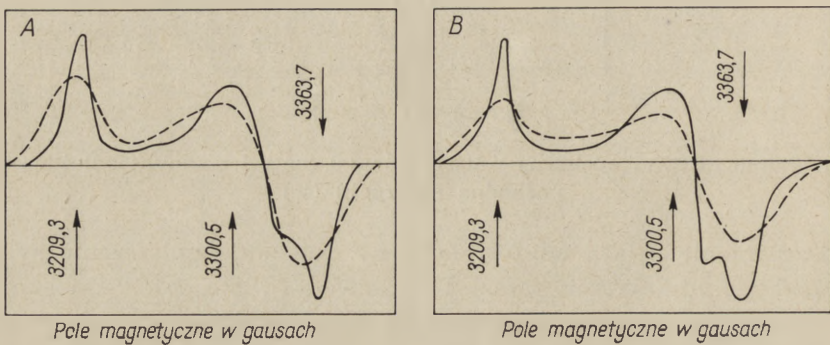
Odszczepienie żelaza od ferredoksyny powoduje zniszczenie sygnału ERP, podczas gdy dodanie żelaza i siarkowodoru do apoferredoksyny nie tylko przywraca aktywność enzymatyczną, lecz również powstawanie sygnału $g = 1,94$. Dalszych dowodów, że sygnał ten związany jest z obecnością żelaza dostarczyły pomysłowe doświadczenia przeprowadzone w pracowni Beinera (58). Około 92% żelaza występującego w naturze stanowi izotop ^{56}Fe , którego jądro ma spin równy zeru i dlatego jest diamagnetyczne. W ilości około 3% występuje izotop żelaza ^{57}Fe , którego jądro ma spin równy $1/2$ i wytwarza jądrowe pole magnetyczne. Gdyby ^{56}Fe zastąpić ^{57}Fe to wówczas podczas otrzymywania widma ERP jądrowe pole magnetyczne ^{57}Fe mogłoby na skutek dwóch możliwych orientacji spinu jądrowego, zwiększać lub zmniejszać zewnętrzne pole magnetyczne i nastąpiłoby rozszczenie lub poszerzenie pasm absorpcji. W pracowni Beinerta otrzymano z hodowanego na pożywce zawierającej ^{57}Fe *Azotobacter vinelandii* metaloproteid wzbogacony w ten izotop żelaza do około 65%. Następnie oznaczoną jego widmo ERP. Z rysunku 3A widać, że pasmo w widmie tak otrzymanego ferroproteidu z ^{57}Fe jest znacznie szersze i bardziej spłaszczone w porównaniu z pasmem widma ferroproteidu zawierającego ^{56}Fe . Widmo ERP ferroproteidu zawierającego ^{56}Fe i ^{57}Fe obliczone teoretycznie przedstawia rysunek 3B. Zgodność ich z widmami otrzymanymi doświadczalnie jest bardzo znaczna. Fakty doświadczalne wskazywały zatem niezbicie, że żelazo warunkuje sygnał $g = 1,94$, nie usuwały jednak trudności natury teoretycznej.

Jak wiadomo, żelazo posiada 26 elektronów, z których 8 położonych na orbitalach 3d i 4s decyduje o jego chemicznych właściwościach. Roz-

mieszanie elektronów we wszystkich możliwych stanach walencyjnych jest następujące:

Fe^0	$1s^2$	$2s^2$	$2p^6$	$3s^2$	$3p^6$	$3d^3$	$4s^2$
Fe^+	$1s^2$	$2s^2$	$2p^6$	$3s^2$	$3p^6$	$3d^6$	$4s^1$
Fe^{2+}	$1s^2$	$2s^2$	$2p^6$	$3s^2$	$3p^6$	$3d^6$	
Fe^{3+}	$1s^2$	$2s^2$	$2p^6$	$3s^2$	$3p^6$	$3d^5$	

Cyfry 1, 2, 3, 4 oznaczają główną liczbę kwantową, litery s, p, d poboczną liczbę kwantową, a cyfry po prawej stronie u góry liczbę elektronów na danym orbitalu. Pionową kreską oddzielono elektrony biorące udział w tworzeniu połączeń chemicznych żelaza. Pięć elektronów ze-



Rys. 3A. Widmo ERP ferroproteidów otrzymanych z *Azotobacter vinelandi* (58)
Linia przerywana — ferroproteid zawierający ^{57}Fe ; Linia ciągła — ^{56}Fe .

Rys. 3B. Widmo ERP obliczone teoretycznie przy założeniu, że żelazo jest atomem centralnym kompleksu dającego sygnał $g = 1,94$ (58)
Linia przerywana — ferroproteid zawierający ^{57}Fe ; Linia ciągła — ^{56}Fe .

laza trójwartościowego i po sześć elektronów w pozostałych formach znajduje się na orbitalu 3s. Orbital ten jest rozszczepiony na pięć równych pod względem energetycznym poziomów, na których może znajdować się łącznie 10 elektronów — na każdym po dwa o przeciwnie skierowanych spinach. Ponieważ na orbitalu 3d atomu żelaza znajduje się tylko 6 lub 5 elektronów, nie wszystkie poziomy mogą być wypełnione. Możliwe rozmieszczenie elektronów na tym orbitalu przedstawia schematycznie tablica 2.

Stan, w którym możliwie największa liczba elektronów ma spiny ustawione równolegle cechuje się maksymalnym spinem wypadkowym, toteż żelazo w tym stanie wykazuje szczególnie duży paramagnetyzm (wysoki stan spinowy). W stanie, w którym największa liczba elektronów ma spiny ustawione antyrównolegle (niski stan spinowy) żelazo może być nawet diamagnetyczne. Powstawanie sygnału ERP $g = 1,94$ nie może być uwarunkowane obecnością żelaza dwuwartościowego w niskim sta-

nie spinowym ze względu na jego diamagnetyzm, ani żelaza trójwartościowego w wysokim stanie spinowym ze względu na kilkakrotnie większą wartość współczynnika rozszczepienia g od obserwowanej w ferroproteidach. Z rozważań teoretycznych wynika, że również żelazo dwu-

	Fe^{2+}		Fe^{3+}	
	Wysoki stan spinowy	Niski stan spinowy	Wysoki stan spinowy	Niski stan spinowy
Wypełnienie orbitalów 3d				
Spin sumaryczny	2	0	2 1/2	1/2
Moment magnetyczny	5,2-5,5	> 0	5,9	2,3-2,5
Sygnat ERP $g =$	2	—	6	~2

Tablica 2. Możliwe wypełnienia orbitalów elektronowych żelaza dwu- i trójwartościowego

wartościowe w wysokim stanie spinowym nie może dawać sygnału $g = 1,94$, daje go natomiast żelazo trójwartościowe w niskim stanie spinowym. Natomiast fakty doświadczalne wykazują wyraźnie, że omawiane ferroproteidy dają sygnał ERP $g = 1,94$ tylko w formie zredukowanej. Sprzeczność tę rozwiązał dopiero model budowy centrum aktywnego ferredoksyny zaproponowany przez Brintzingera i wsp. (18), omawiany w następnym rozdziale.

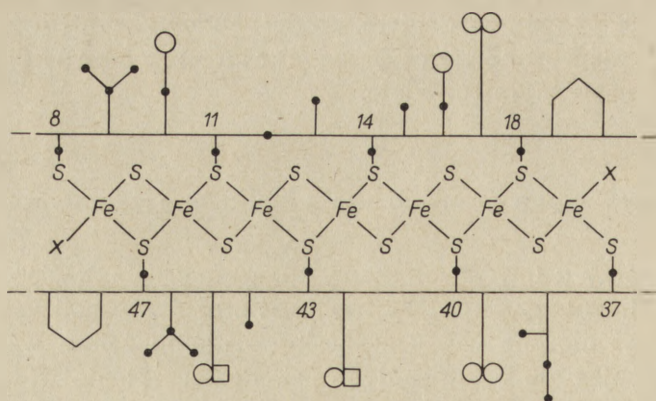
II. Sposób powiązania żelaza z białkiem enzymatycznym

Żelazo tworzy z innymi atomami kompleksy o budowie czworo- lub ośmiościanu, to znaczy, że cztery lub sześć atomów wchodzących w skład kompleksu jest ułożone wokół centralnego atomu żelaza wzdłuż dwóch lub trzech wzajemnie prostopadłych osi. Rozszczepienie widma ERP na trzy pasma g_x , g_y i g_z (rysunek 2) wskazuje na czworościenną budowę kompleksu żelaza z białkiem. Początkowo ugrupowaniami wiążącymi wydawały się grupy tiolowe cysteiny, bowiem ich zablokowanie przez

p-chlorortęciobenzoesan (*p*-CMB) powodowało utratę aktywności enzymatycznej i uwolnienie żelaza. Zwrócono jednak uwagę, że we wszystkich enzymach zawierających żelazo związane niehemowo występują tak zwane labilne grupy tiolowe, które w kwaśnym środowisku ulegają odszczepieniu w postaci siarkowodoru z równoczesnym odłączeniem żelaza (14, 29, 30, 32, 49, 65, 71). Stosunek zawartości żelaza związanego niehemowo do zawartości labilnych grup tiolowych wynosi według większości autorów 1 : 1 (14, 23, 29, 30, 49, 67), chociaż znajdowano stosunek wyższy (71) i niższych (32). Udział siarki w wiązaniu żelaza z białkiem potwierdziło badanie otrzymanych z *Azotobacter vinelandii* i *Pseudomonas putida* ferroproteidów, w których siarkę ^{32}S zastąpiono izotopem ^{33}S drogą hodowli na pożywcę zawierającej cięższy izotop. Badania widm ERP ferroproteidów zawierających siarkę ^{32}S i ^{33}S (spin jądrowy $^{3/2}$) wykazały całkowitą zgodność z widmami obliczonymi teoretycznie przy założeniu, że żelazo tworzy symetryczny kompleks z grupami -SH (21, 27).

Jednak nadal nie była zrozumiała właściwość chemiczna labilnych grup tiolowych, ponieważ nie znano organicznych związków siarki odszczepiających siarkowodor w kwaśnym środowisku. Wysłunięto przeto przypuszczenie, że dwa atomy siarki tworzące kompleks z żelazem pochodzą od dwóch reszt cysteiny, natomiast dwa — od siarki nieorganicznej (30, 31, 47, 67). Kompleks taki w kwaśnym środowisku ulegałby rozbiciu z uwolnieniem siarkowodoru i równoczesnym oderwaniem żelaza. Model budowy centrum aktywnego ferredoksyny przedstawiony na schemacie zaproponowali Blomstrom i wsp. (14).

Na podstawie badań kompleksu estru metylowego cysteiny z solą Mohra Bayer i wsp. (4, 53) wysunęli inną hipotezę. Stwierdzili oni, że kompleks ten daje widmo ERP podobne do widma białek zawierających żelazo niehemowe związane, a uwalnia siarkowodor po zakwaszeniu śro-

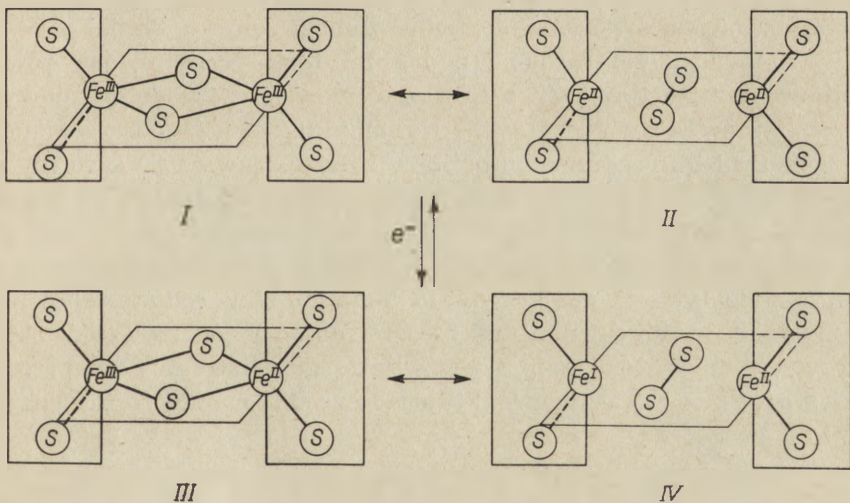


Schemat 1. Model budowy ferredoksyny zaproponowany przez Blomstroma i wsp. (14)

Uzupełniono symbolami aminokwasów używanymi przez Wellnera i Meistera (70)

dowiska. Autorzy uważają, że kompleks ten może być traktowany jako związek modelowy białek zawierających niehemowo związane żelazo i przypuszczają, że żelazo łączy się z białkiem wyłącznie za pomocą grup tiolowych cysteiny. Ich labilność byłaby uwarunkowana, tak jak w kompleksie metylcysteiny z solą Mohra wytworzeniem kompleksu z żelazem. Odszczepienie w kwaśnym środowisku jednej z czterech grup tiolowych tworzących kompleks powodowałoby uwolnienie żelaza i tym samym zapobiegałoby dalszemu odszczepianiu siarkowodoru. Zgodnie z tą hipotezą podczas odszczepiania labilnych grup tiolowych powinna zachodzić przemiana cysteiny w dehydroalaninę. Wymienieni autorzy stwierdzili istotnie w hydrolizacie ferredoksyny, z której odszczepili labilne grupy tiolowe, spadek zawartości cysteiny a przyrost zawartości dehydroalaniny (oznaczanej jako przyrost alaniny w stosunku do kontroli po redukcji hydrolizatu borowodorkiem sodowym) przy niezmienionych stosunkach innych aminokwasów (4).

Jednakże Malkin i Rabinowitz (36) nie mogli stwierdzić zwiększenia zawartości dehydroalaniny w hydrolizacie ferredoksyny po odszczepieniu labilnych grup tiolowych. Wykazali oni, że apoferredoksyna otrzymana w wyniku równoczesnego odszczepienia żelaza i labilnych grup tiolowych daje się reaktywować przez dodanie jonów żelazawych, siarczku sodowego i 2-merkaptioetanolu (37). Uważają oni zatem, że doświadczenie ich przemawia za nieorganicznym pochodzeniem labilnych grup tiolowych. Wniosek ten byłby jednak o tyle słuszny, gdyby prawdziwe było założenie, że usunięcie siarkowodoru z reszt cysteiny jest



Schemat 2. Model budowy centrum aktywnego enzymów oksydo-redukcyjnych zawierających żelazo niehemowo związane, wg Brintzingera i wsp. (18).

I i II — formy utlenione enzymu, III i IV — formy zredukowane enzymu

procesem nieodwracalnym, co ostatnio zostało zakwestionowane przez Gersonde i Druskeita (24).

W świetle przytoczonych faktów wydaje się, że hipoteza Bayera i wsp. (3, 4, 5) o cysteinowym pochodzeniu labilnych grup tiolowych jest obecnie najbardziej prawdopodobna. Za tą hipotezą przemawiają również wyniki doświadczeń Suzuki i Kimury (65), którzy usiłując znaleźć związek modelowy enzymów zawierających niehemowo związane żelazo, inkubowali albuminę surowiczą wołu z solą Mohra w obecności merkaptoetanolu. Otrzymali oni kompleks albumina-żelazo, zawierający równoważne ilości żelaza i labilnych grup tiolowych, o widmie ERP bardzo zbliżonym do widma ferredoksyny. Rysunek 5 przedstawia schematycznie budowę centrum aktywnego omawianych enzymów proponowaną przez Brintzinger'a i wsp. (18).

Schemat ten jest zgodny z założeniem, że tylko trójwartościowe żelazo w niskim stanie spinowym daje sygnał ERP $g = 1,94$, a wszystkie atomy siarki tworzące kompleks pochodzą z reszt $-SH$ cysteiny. Zarówno utleniona (I) jak i zredukowana forma enzymu (III) zawierają trójwartościowe żelazo, przy czym w formie utlenionej w skład kompleksu wchodzi dwa atomy Fe^{3+} , natomiast w formie zredukowanej jeden atom Fe^{3+} i jeden atom Fe^{2+} . Kompleksowi utlenionemu można przypisać dwie nie dające się rozróżnić pod względem chemicznym struktury graniczne I i II, z których II jest diamagnetyczna a w I może następować wymiana energii między dwoma niesparowanymi elektronami obu atomów żelaza, co powoduje znaczne spłaszczenie pasma absorpcji, uniemożliwiające jego wykrycie, lub zanik pasma w widmie ERP. Forma zredukowana ma również dwie formy graniczne III i IV, przy czym obie z nich posiadają po jednym niesparowanym elektronie i mogą dawać sygnał $g = 1,94$. Model ten zgadza się zarówno z danymi teoretycznymi, jak również wyjątkowo dobrze tłumaczy szereg obserwowanych, a dotąd niewyjaśnionych faktów doświadczalnych. Na przykład żelazo odszczepione od ferredoksyny i innych metaloproteidów zawiera zawsze 50% formy zredukowanej żelaza i 50% formy utlenionej. Badanie widm Mossbauera utlenionej i zredukowanej formy ferredoksyny otrzymanej z liści szpinaku (55) wykazało, że tylko jeden atom żelaza jest zredukowany podczas reakcji enzymatycznej, przy czym z dwoma molami zredukowanej ferredoksyny reaguje tylko jeden mol $NADP^+$ dając jeden mol zred. $NADP$. Przyczyna tych faktów staje się oczywista gdy patrzymy na przedstawiony model budowy centrum aktywnego zredukowanej formy enzymu.

III. Rola biologiczna

Dzięki spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego stwierdzono, że żelazo niehemowo związane w enzymach ulega redukcji w czasie reakcji enzymatycznej. Jednak dla udowodnienia udziału że-

laza w procesie transportu elektronów, należało zmierzyć szybkość jego redukcji i wykazać, że jest ona równa szybkości reakcji enzymatycznej. Było to o tyle trudne, że sygnał ERP można mierzyć w bardzo niskich temperaturach, w których reakcje enzymatyczne już nie zachodzą. B r a y (15, 16) opracował taką technikę szybkiego mieszania enzymu z substratem i następnie zamrażania mieszaniny reakcyjnej, że czas, jaki upływa od momentu dodania substratu do całkowitego przerwania reakcji enzymatycznej przez zamrożenie, jest kilkakrotnie krótszy niż jeden cykl badanej reakcji. Zastosowanie tej techniki pozwala na pomiar widma ERP po upływie 10 milisekund od chwili dodania substratu. Zatem gdy czas reakcji enzymatycznej wynosi około 100 milisekund, można przeprowadzić badanie kinetyki redukcji kompleksu żelazo-grupy tiolowe. Badania takie wykazały zgodność szybkości reakcji enzymatycznej z szybkością powstawania sygnału ERP $g = 1,94$, czyli szybkością redukcji kompleksu żelazo-grupy tiolowe, dla oksydazy ksantyny (17, 45) dehydrogenazy kwasu orotowego (1) i cząstek mitochondrialnych (7, 11).

Dla dehydrogenazy zred. NAD nie można było przeprowadzić odpowiednich doświadczeń z powodu krótszego niż 10 milisekund cyklu reakcji. Dlatego też B e i n e r t i w s p. (12) zastosowali jako substrat zred. NADP, dla którego czas jednego cyklu reakcji jest około stukrotnie większy. Otrzymane wyniki wykazały całkowitą zgodność szybkości redukcji flawiny z szybkością powstawania sygnału ERP $g = 1,94$. Z obliczeń ilości żelaza z intensywności pasma absorpcji w widmie ERP wynikało jednak, że ilość żelaza dającego sygnał $g = 1,94$ stanowi tylko około 10% ogólnej zawartości żelaza dehydrogenazy zred. NAD. Obliczenia te są jednak obarczone znacznym błędem. Ponadto natywność otrzymywanych obecnie dehydrogenaz zred. NAD jest sprawą sporną. Zawartość żelaza związanego niehemowo jest jednak w łańcuchu oddechowym tak duża (na przykład 24 atomy żelaza na mol flawiny w kompleksie I), że wydaje się możliwy jego udział w innych procesach poza transportem elektronów (48). Również w innych enzymach oksydoredukcyjnych zawierających żelazo niehemowo związane, na przykład w ferredoksynie (22, 57), nie można wykluczyć udziału żelaza w zapewnieniu odpowiedniej konformacji lub w wiązaniu substratu. Jednakże udział żelaza niehemowego w przenoszeniu elektronów nie ulega dzisiaj najmniejszej wątpliwości, a kompleks żelazo-grupy tiolowe stanowi nową grupę prostetyczną enzymów oksydoredukcyjnych.

LITERATURA

1. Aleman V., Smith S. T., Rajagopalan K. V., Handler P., w *Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion*, red. A. Pietro, Antioch Press, Yellow Springs 1965, str. 327.
2. Bachofen R., Arnon D. I., *Biochim. Biophys. Acta* **120**, 259 (1966).
3. Bayer E., Parr W., *Angew. Chem.* **78**, 824 (1966).
4. Bayer E., Parr W., *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 632 (1966).

5. Bayer E., Parr W., Kazmaier B., *Arch. Pharm.* **298**, 196 (1964).
6. Bearden A. J., Nartsch T. H., Moss A. J., Cusanovich A. M., w Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion, red. A. San Pietro, Antioch Press, Yellow Springs 1965, str. 87.
7. Beinert H., w Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion, red. A. San Pietro, Antioch Press, Yellow Springs 1965, str. 23.
8. Beinert H., Heinen W., Palmer G., w Enzymes Model and Enzymes Structure, Brookhaven Symp. Biol. **15**, 229 (1962).
9. Beinert H., Lee W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 40 (1961).
10. Beinert H., Palmer G., w Oxidases and Related Redox System, red. T. E. King, H. S., Mason and J. Morison, John Wiley and Sons, New York 1965, str. 567.
11. Beinert H., Palmer G., *Advan. Enzymol.* **27**, 105 (1966).
12. Beinert H., Palmer G., Cremona T., Singer T. P., *J. Biol. Chem.* **240**, 475 (1965).
13. Beinert H., Sands R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 41 (1960).
14. Blomstrom D. C., Knight E., Philips W. D., Weiher J. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1085 (1964).
15. Bray R. C., *Biochem. J.* **81**, 189 (1961).
16. Bray R. C., w Rapid Mixing and Sampling Techniques in Biochemistry, red. B. Chance, R. Eisenhart, Q. H. Gibson i K. K. Lomberg-Holm, Academic Press, New York 1964, str. 195.
17. Bray R. C., Palmer G., Beinert H., *J. Biol. Chem.* **239**, 2667 (1964).
18. Brintzinger H., Palmer G., Sands R. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **55**, 397 (1966).
19. Coleman R., Riske J. S., Wharton D. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 347 (1964).
20. Davenport H., Will E., Whatley F. R., *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.* **139**, 346 (1952).
21. Der Vartanian D. V., Orne W. H., Beinert H., Tsibris J. C., Gunsalus I. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 569 (1967).
22. Evans M. C., Buchanan B. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 1420 (1965).
23. Fray K. T., San Pietro A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 218 (1962).
24. Gersonde K., Druskeit W., *European J. Biochem.* **4**, 391 (1968).
25. Green D., w Units of Biological Structure and Function, red. O. H. Gabler, Academic Press, New York 1956, str. 465.
26. Green D., Wharton D. C., *Biochem. Z.* **338**, 335 (1963).
27. Hollocher E. C., Solomon E., Ragland T. E., *J. Biol. Chem.* **241**, 3452 (1966).
28. Kimura T., Suzuki K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 373 (1965).
29. Knight T. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 511 (1964).
30. Lovenberg W., Buchanann B. B., Rabinowitz J. C., *J. Biol. Chem.* **238**, 3899 (1963).
31. Lovenberg W., Sobel B. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 193 (1965).
32. Lusty C. J., Machinist I., Singer T. P., *J. Biol. Chem.* **240**, 1804 (1965).
33. Macler B., Mahler H. R., Green D., *J. Biol. Chem.* **210**, 149 (1954).
34. Mahler H. R., *Advan. Enzymol.* **17**, 233 (1956).
35. Mahler H. R., Elowe D. G., *J. Biol. Chem.* **210**, 165 (1954).
36. Malkin R., Rabinowitz J. C., *Biochemistry* **5**, 1262 (1966).
37. Malkin R., Rabinowitz J. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm* **23**, 822 (1966).

38. Massey V., *J. Biol. Chem.* **229**, 763 (1957).
39. Massey V., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 500 (1958).
40. Mortenson L. E., Valentine R. C., Carnahan J. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 448 (1962).
41. Mortenson L. E., Valentine R. C., Carnahan J. E., *J. Biol. Chem.* **238**, 794 (1963).
42. Nakamura Y., Otsuka H., Tanaki B., *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 34 (1966).
43. Omura T., Sanders E., Cooper D. Y., Rosenthal O., Estabrook R. W., w Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion, red. A. San Pietro, Antioch Press, Yellow Springs 1965, str. 401.
44. Omura T., Sato R., Cooper D. Y., Rosenthal O., Estabrook R. W., *Federation Proc.* **24**, 1181 (1965).
45. Palmer G., Bray R. C., Beinert H., *J. Biol. Chem.* **239**, 2657 (1964).
46. Palmer G., Sands R. H., *J. Biol. Chem.* **241**, 253 (1966).
47. Philips W. D., Knight E., Blomstrom D. C., w Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion, red. A. San Pietro, Antioch Press, Yellow Springs 1965, str. 69.
48. Racker E., w Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion, red. A. San Pietro, Antioch Press, Yellow Springs 1965, str. 271.
49. Rajagopalan K. V., Handler P., *J. Biol. Chem.* **239**, 1509 (1964).
50. Richert D. A., Westerfield W. W., *J. Biol. Chem.* **203**, 915 (1953).
51. Richert D. A., Westerfield W. W., *J. Biol. Chem.* **209**, 179 (1954).
52. Rieske J. S., Mac Lenan D. H., Coleman R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **15**, 338 (1964).
53. Roder A., Bayer E., *Angew Chem.* **79**, 274 (1967).
54. Sands R. H., Beinert H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **3**, 47 (1960).
55. San Pietro A., Abstracts of 7th Intern. Congress Biochem., Tokyo 1967, Cel. XIII-3, str. 559.
56. San Pietro A., Black C. C., *Ann. Rev. Physiol.* **19**, 340 (1965).
57. San Pietro A., Lang H. M., *J. Biol. Chem.* **231**, 211 (1958).
58. Shetana Y. I., Wilson P. W., Hansen R. E., Beinert H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 1263 (1964).
59. Singer T. P., w Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion, red. A. San Pietro, Antioch Press, Yellow Springs 1965, str. 349.
60. Singer T. P., Kearney E. B., Bernath P., *J. Biol. Chem.* **233**, 599 (1956).
61. Singer T. P., Massey V., *Record Chem. Progr.* **18**, 201 (1957).
62. Sobel B. E., Lovenberg W., *Biochemistry* **5**, 6 (1966)
63. Suzuki K., *Biochemistry* **6**, 1335 (1967).
64. Suzuki K., Kimura T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 340 (1965).
65. Suzuki K., Kimura T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 514 (1967).
66. Tagawa K., Arnon D. I., *Nature* **195**, 537 (1962).
67. Tanaka M., Benson A. M., Mower H. F., Yosunobu K. T., w Non-Heme Iron Proteins: Role in Energy Conversion, red. A. San Pietro, Antioch Press, Yellow Springs, 1965, str. 221.
68. Warburg O., *Heavy Metal Prosthetic Groups in Enzyme Action*, Clarendon Press, Oxford 1949.
69. Watari H., Kimura T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 106 (1966).
70. Wellner D., Meister A., *Science* **151**, 77 (1966).
71. Zeylemaker W. P., DerVartanian D. V., Veeger C., *Biochim. Biophys. Acta* **99**, 183 (1965)

K o m u n i k a t

Komitetu Organizacyjnego VIII Zjazdu PT Bioch.

VIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbędzie się w Szczecinie w dniach 28—30 maja 1970 roku.

W programie Zjazdu przewidziane jest sympozjum na temat „Izoenzymy” oraz obrady w sekcjach. Informacji szczegółowych udziela Komitet Organizacyjny Zjazdu — *Szczecin, al. Powstańców 72.*

Przewodniczący

Dr Janusz Gregorczyk

JOLANTA SKANGIEL-KRAMSKA *

Własności i biologiczna rola izoenzymów

Properties and Biological Function of Isoenzymes

The properties, biological function and genetic control of synthesis of some isoenzymes are described.

W roku 1950 Meister (43) zaobserwował, że w preparatach kryształicznej dehydrogenazy mleczanowej z serca wołu znajdują się dwa składniki różniące się ruchliwością elektroforetyczną. Dwa lata później Niellands (44) stwierdził, że oba składniki mają tę samą aktywność enzymatyczną. W ten sposób wykryto, że enzymy katalizujące ściśle określoną reakcję w danym organizmie mogą być heterogenne. Zagadnienie heterogenności enzymów omówiła Szumiel w *Postęпах Biochemii* (58).

Dla określenia różnych form molekularnych, w jakich może występować enzym w obrębie jednego organizmu bądź gatunku, Markert i Møller (39) zaproponowali nazwę izozymy. Termin izoenzymy uznano za równocenny. Obecnie znanych jest około 50 enzymów występujących w postaci izoenzymów. Reprezentują one niemal wszystkie klasy enzymów: oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, izomerazy. Zjawisko występowania izoenzymów obejmuje swym zasięgiem zarówno zwierzęta, rośliny jak i mikroorganizmy (14).

I. Budowa izoenzymów

Najlepiej poznano izoenzymy dehydrogenazy mleczanowej. Intensywne badania rozpoczęły się od obserwacji Pfleiderera i Jeckele (49), że dehydrogenaza mleczanowa (LDH) mięśni szkieletowych

*Mgr, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polska Akademia Nauk, Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: LDH — dehydrogenaza mleczanowa, MDH — dehydrogenaza jabłczanowa, IDH — dehydrogenaza izocytrynianowa, AChE — esteraza acetylocholinowa, NHD — nikotynamidohipoksantynowy dwunukleotyd.

szczura ma odmienne własności kinetyczne od enzymu z mięśnia sercowego. Rozdział elektroforetyczny LDH z tkanek szczura, królika i człowieka wykazał obecność pięciu aktywnych form tego enzymu (61). Izoenzym o największej ruchliwości w kierunku anody oznaczono jako izoenzym — 1, a o najmniejszej ruchliwości jako izoenzym — 5. Stwierdzono, że aktywność enzymatyczną LDH w mięśniu sercowym warunkuje przede wszystkim izoenzym — 1, natomiast w mięśniach szkieletowych izoenzym — 5.

Wraz ze wzrostem ruchliwości elektroforetycznej izoenzymy LDH wykazują stopniowe zmiany szeregu własności, między innymi wrażliwości na działanie inhibitorów, stabilności w podwyższonej temperaturze, powinowactwa do substratu (tablica 1) (62).

Tablica 1

Porównanie własności izoenzymów LDH ssaków (wg 62)

Badana właściwość	Izoenzym				
	LDH-5	LDH-4	LDH-3	LDH-2	LDH-1
Hamowanie siarczkiem(%)	31—37	42—48	47—53	62—78	69—75
Półokres denaturacji w 50°C (min)	3	10	40	100	∞
Optymalne stężenie pirogronianu (M)	1.2×10^{-3}	—————→			0.5×10^{-3}
Wzrost szybkości reakcji przy podniesieniu temperatury o 10°C	1,5	—————→			2.1

Gradacja własności izoenzymów LDH ujawnia się również w przypadku gdy zamiast NAD stosuje się jego analogi (13). Pomiar aktywności izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej przy użyciu jako koenzymu dwunukleotydu nikotynamidohipoksantynowego (zred. NDH) wskazują, że poszczególne izoenzymy w różnym stopniu wykorzystują analogi naturalnego koenzymu (tablica 2).

Z testów immunologicznych wynika, że LDH-1 i LDH-5 są różnymi białkami. Plagelmann i wsp. (52), używając przeciwciał działających na typ mięśniowy LDH królika, stwierdzili, że przeciwciała te precipitują izoenzym — 2, 3, 4 i oczywiście 5. Przeciwciała działające na LDH-1, reagowały również z LDH-4, 3, 2. Podobne wyniki uzyskano także na innym materiale (13, 34, 46, 47). Zjawisko to tłumaczą wyniki prac Appelli i Markerta (2) oraz Cahna i wsp. (13). Autorzy ci stosując 12M mocznik, względnie 5M chlorowodorek guanidyny z dodatkiem merkaptoetanolu otrzymali cztery nieaktywne polipeptydy. Zaobserwowane różnice ruchliwości elektroforetycznej świadczyły, że używa się dwójakiego rodzaju podjednostki. Izoenzym — 1 zawiera tylko

jeden rodzaj podjednostek, które oznaczono jako H (ang. *heart*), ponieważ izoenzym ten przeważa w sercu. Natomiast LDH-5 składa się z czterech identycznych podjednostek drugiego rodzaju, które oznaczono jako

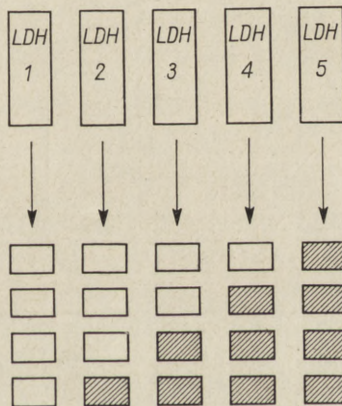
Tablica 2

Aktywność izoenzymów LDH przy zastosowaniu jako koenzymu dwunukleotydu nikotynamido hypoksantynowego (zred. NHD) względem aktywności z red. NAD (wg 13)

Izoenzym	Mięsień szkieletowy wołu	Serce wołu
LDH-1	2,78	2.50
LDH-2	1.83	1.74
LDH-3	1.23	1.29
LDH-4	0.70	0.78
LDH-5	0.53	—

Stężenie pirogronianu $3,3 \times 10^{-4}M$ przy stosowaniu zred. NHD i $10 \times 10^{-2}M$ przy zred. NAD.

M (ang. *muscle*). Wymienieni autorzy wysuwają pogląd, że podjednostki H i M mogą łączyć się ze sobą, wytwarzając aktywne tetrameryczne hybrydy LDH-2, LDH-3 i LDH-4 o własnościach pośrednich (schemat 1).



Schemat 1. Tetrameryczna budowa izoenzymów LDH.

Prostokąty puste — podjednostki H, Prostokąty pełne — podjednostki M

Według Jaenicke'a i Knopfa (30) ciężar cząsteczkowy LDH wynosi 142 000, a ciężar cząsteczkowy podjednostek około 35 000. Podjednostki H i M różnią się składem aminokwasowym (19, 50, 51, 61) (tablica 3). Za tetrameryczną budową LDH przemawiają również i inne dane: jeden mol enzymu wiąże w przybliżeniu cztery mole NAD (59), a w rodzimym enzymie znaleziono cztery wolne grupy -SH (16).

Pięknego potwierdzenia tetramerycznej budowy izoenzymów LDH dostarczyły doświadczenia Markerta (36). Działanie 1M NaCl oraz

zamrażanie oczyszczonych izoenzymów LDH, pochodzących z różnych tkanek wołu, powoduje rozpad na monomery. Przy rozmrażaniu zachodzi ponowne połączenie monomerów z wytworzeniem aktywnych tetramerów. Gdy zmieszano jednakowe ilości izoenzymów LDH-1 i LDH-5 i poddano je powyższej procedurze otrzymano pięć izoenzymów (rysunek 1). Izoenzymy te występowały w stosunkach 1 : 4 : 6 : 4 : 1. Proporcje te

Tablica 3

Porównanie składu aminokwasowego izoenzymów LDH z mięśni wołu (wg 36)

Aminokwas	Liczba reszt aminokwasowych na cząsteczkę enzymu*)	
	LDH-1	LDH-5
Lizyna	94	95
Histydyna	25	34
Arginina	34	52
Kwas asparaginowy	123	104
Treonina	56	62
Seryna	92	61
Kwas glutaminowy	124	135
Prolina	42	63
Glicyna	91	100
Alanina	72	122
Walina	135	82
Metionina	32	20
Izoleucyna	86	73
Leucyna	130	118
Tyrozyna	26	35
Fenylalanina	19	26

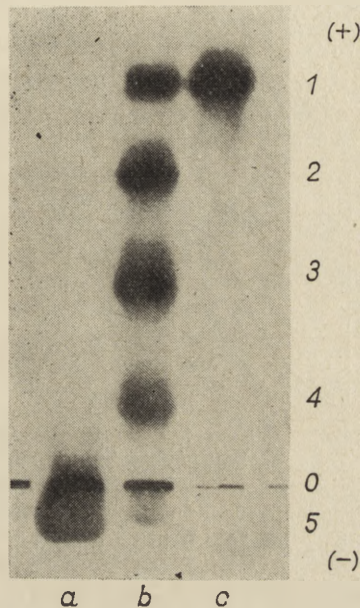
*) Przyjęto, że ciężar cząsteczkowy enzymu wynosi 135 000, a każdy izoenzym zawiera 12 reszt cysteiny i 30 reszt tryptofanu

świadczą o losowym łączeniu się podjednostek w aktywne tetramery. Podobne stosunki znaleziono również w warunkach naturalnych na przykład w mózgu ludzkim (56).

W niektórych przypadkach nie udało się wykazać żadnych różnic między izoenzymami poza odmienną ruchliwość w polu elektrycznym. Jako przykład mogą służyć formy mitochondrialnej dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) kurczenia uzyskiwanej w wyniku rozdzielania elektroforetycznego czystego enzymu. Kitto i wsp. (32) przypuszczają, że poszczególne formy różnią się od siebie tylko konformacją i dlatego nazwali je konformerami. Jednakże Schechter i Epstein (53) wykazali, że odwracalna denaturacja takich izoenzymów w 6M chlorowodoru guanidyny nie wywołuje zmian w rozmieszczaniu się izoenzymów podczas elektroforezy. Wynik ten sugeruje, że przyczyną różnej ruchliwości jest nie tylko konformacja, lecz i jakieś inne czynniki.

II. Rola izoenzymów w kontroli metabolizmu wewnątrzkomórkowego

Odmienne własności kinetyczne poszczególnych izoenzymów w połączeniu z danymi o ich rozmieszczeniu w różnych tkankach sugerują, że charakterystyczny skład izoenzymatyczny jest związany z funkcją tkanki (37, 38). Różnice w stopniu hamowania LDH-1 i LDH-5 przez pirogronian stały się podstawą wysuniętej przez grupę Kaplan'a koncepcji o fizjologicznej roli tych dwóch podstawowych izoenzymów (13).



Rys. 1. Obraz rozdzielu elektroforetycznego trzech preparatów LDH, uzyskany przez Markerta (wg 36)

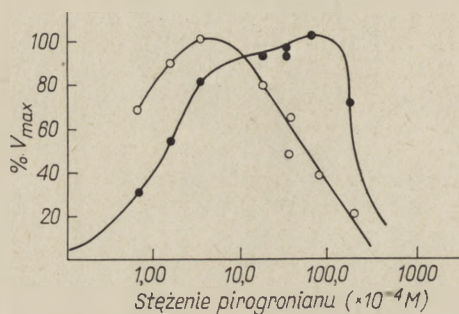
a — LDH-5; b — mieszanina utworzona po zmieszaniu jednakowych ilości LDH-1 i LDH-5; c — LDH-1; 0 — linia startu.

LDH-1 hamowana jest przez stężenie 10^{-2} M pirogronianu (13, 40, 52), natomiast LDH-5 jest mniej wrażliwa na wzrost stężenia tego substratu (rysunek 2).

Forma LDH-1 występuje w sercu, gdzie jest stałe zapotrzebowanie na energię. Ciągłość dostawy energii zapewniona jest przez utlenianie pirogronianu w cyklu kwasów trójkarboksyłowych. Hamowanie aktywności LDH-1 przez substrat w stężeniu 10^{-2} M sprzyja całkowitemu utlenieniu pirogronianu. LDH-5 stanowi główny składnik LDH w mięśniach szkieletowych, w których występują okresy względnego niedotlenienia. Dodatkowa energia potrzebna do skurczu mięśnia dostarczana jest dzięki glikolizie. W procesie tym wytwarzają się znaczne ilości pirogronianu, który następnie zredukowany jest do mleczanu. Mleczan przenika do

krwiobiegu, gdzie jest dalej metabolizowany. W ten sposób fizjologiczne własności serca i mięśni szkieletowych znajdują swój wyraz we własnościach odpowiadających im izoenzymów.

Dalsze prace potwierdziły hipotezę, że forma złożona z czterech podjednostek H przystosowana jest do działania w warunkach tlenowych, natomiast forma LDH-5 nie jest ściśle uzależniona od dostawy tlenu. Porównanie izoenzymów mięśni piersiowych sporadycznie i krótko fruujących ptaków (kura, głuszc) i ptaków fruujących często i długo (kolibry, burzyki) wykazało u tych ostatnich przewagę podjednostek typu H (64). Z danych Bonavity (9) o rozmieszczeniu izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej w tkance nerwowej wynika, że więcej LDH-1 jest w mózgu niż w obwodowym układzie nerwowym. Jak wiadomo mózg jest tkanką szczególnie wrażliwą na niedotlenienie. Ten sam



Rys. 2. Wpływ stężenia pirogronianu sodu na aktywność LDH-1 i LDH-5 (wg 13)
Kółka pełne LDH-5, kółka puste LDH-1

autor wiąże zwiększanie się ilości podjednostek H w nerwach obwodowych zwierzęcia po przejściu do życia pozapłodowego ze zmianą stopnia dotlenienia organizmu (10).

Fritz (22) wykazał, że izoenzym LDH-5 z mięśni szkieletowych królika jest aktywowany przez metabolity cyklu kwasów trójkarboksylowych. Po dodaniu jednego z tych aktywatorów krzywa nasycenia pirogronianem zmienia kształt z sigmoidalnej na hiperboliczną. Ogrzewanie LDH-5 przez 3 minuty w temperaturze $40^{\circ}C$ znosi ten efekt. Izoenzym — 1 nie wykazuje tych własności.

Z uzyskanych danych wynika, że LDH-5 jest enzymem allosterycznym. Autor sądzi, że aktywacja tego izoenzymu przez metabolity cyklu Krebsa może być czynnikiem wpływającym na gromadzenie się mleczanu w mięśniach przy niedoborze tlenu.

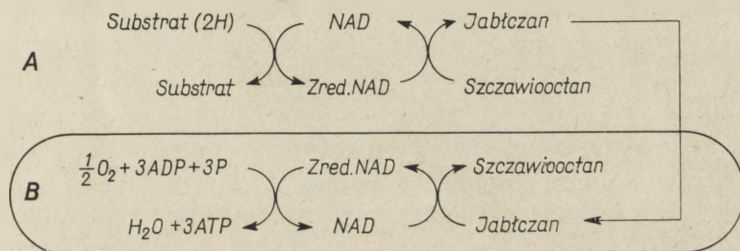
Również zmiany w składzie izoenzymatycznym LDH podczas snu zimowego u susła sugerują, że wzrost ilości podjednostek M podczas hibernacji jest związany z adaptacyjnymi zmianami metabolicznymi (12).

Najdokładniej przebadane obok izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej są różne formy esteraz (7, 27, 63). Rola większości poznanych izo-

enzymów esteraz w metabolizmie nie jest całkowicie wyjaśniona, nieznane są również ich naturalne substraty. Z tego względu stosowanie terminu izoenzym w tych przypadkach budzi wątpliwości (3).

Szczególne miejsce wśród esteraz zajmuje esteraza acetylocholinowa (AChE), enzym o wyraźnej specyficzności substratowej. Bernsohn i Barron (6) wykazali obecność trzech izoenzymów AChE w mózgu ssaków. Maynard (42) zaobserwowała wybiórczy wpływ *Tritonu X-100* na aktywność izoenzymu o najmniejszej ruchliwości w kierunku anody. Niemierko i Lubińska (45), na podstawie zachowania się AChE w nerwach obwodowych po ich przecięciu, sugerują obecność dwóch form tej esterazy, powiązanych z różnymi strukturami aksonu.

Występowanie różnych izoenzymów w obrębie jednej komórki może wiązać się z rolą poszczególnych organelli. Dehydrogenaza jabłczanowa występująca w mitochondriach ma odmienne własności od formy znajdującej się we frakcji rozpuszczalnej. Nasunęło to przypuszczenie, że enzym mitochondrialny, który hamowany jest przez szczawiooctan, prowadzi reakcję w kierunku utleniania jabłczanu i redukcji NAD, a dehydrogenaza jabłczanowa rozpuszczalna bierze udział w redukcji szczawiooctanu (31) (schemat 2). Rola tych dwóch form dehydrogenazy jabłczanowej uwypukla się w zestawieniu z faktem ograniczonej przepuszczalności błon mitochondrialnych dla jabłczanu (24).

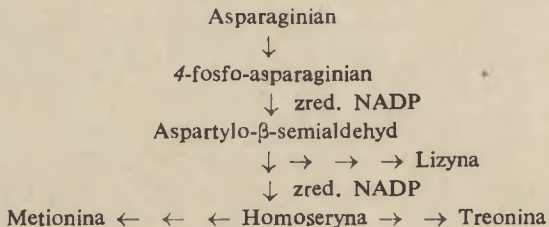


Schemat 2. Działanie mitochondrialnej i rozpuszczalnej dehydrogenazy jabłczanowej (wg 31)

A — przestrzeń pozamitochondrialna, B — mitochondrium

Własności kinetyczne dwóch form transaminazy glutaminian:pirogonian (alaninowej) (65) oraz dwóch izoenzymów transaminazy glutaminian:szczawiooctan. (asparaginianowej) (11, 41) wskazują, że formy występujące w mitochondriach katalizują reakcję tworzenia się ketokwasów z odpowiednich aminokwasów, natomiast występujące w cytoplazmie reakcję odwrotną — powstawania aminokwasów z odpowiednich ketokwasów. Może najwyraźniejszym przykładem kontroli metabolicznej, sprawowanej przez izoenzymy, jest opisana przez Stadtmann i wsp. (57) regulacja metabolizmu asparaginianu u *E.coli*. Asparaginian jest prekursorem trzech aminokwasów: izoleucyny, treoniny i metioniny

(schemat 3). Mechanizmem regulującym biosyntezę tych aminokwasów jest sprzężenie zwrotne. Hamowaniu syntezy dwóch z tych aminokwasów przez nadmiar trzeciego zapobiega obecność trzech różnych izoenzymów kinazy asparaginianowej, z których każdy hamowany jest przez nadmiar innego aminokwasu (48, 57).



Schemat 3. Drogi biosyntezy lizyny, metioniny i treoniny z asparaginanu

III. Genetyczna kontrola syntezy izoenzymów

Występowanie w obrębie jednego gatunku zwierząt enzymów w różnych formach molekularnych spowodowało konieczność zrewidowania poglądu, że jeden gen kieruje syntezą jednego enzymu. Stosując metodę tzw. zymogramów — wykrywania aktywności enzymatycznej bezpośrednio na podłożu elektroforetycznym (28) — udało się uzyskać szereg dowodów na wielogenową kontrolę syntezy jednego enzymu. Shaw i Barto (55), badając zmiany w obrazie elektroforetycznym LDH różnych genetycznych odmian myszy, zaobserwowali, że zmianie ulega polipeptyd H. Cztery spośród pięciu izoenzymów miały zmienioną ruchliwość w porównaniu z odmianą dziką, przy niezmienionej ruchliwości podjednostki LDH-5. Stwierdzono również, że podczas elektroforezy LDH z osobników heterozygotycznych pod względem alleli, kierujących syntezą LDH, ujawniały się dodatkowe pasma obok pasm występujących na obrazie elektroforetycznym LDH rodziców. Pasma te odpowiadały kombinacjom normalnych i zmienionych polipeptydów. Forma LDH-1 występowała w postaci pięciu pasm, podczas gdy LDH-5 jako jedno pasmo. Wskazuje to, że synteza podjednostek H i M jest kontrolowana przez dwa różne geny.

Ciekawych danych dostarczyli Zinkham i wsp. (66, 67). Wykryli oni, że LDH z jąder ptaków i człowieka wykazuje obecność jeszcze jednej formy molekularnej — LDH-X, o ruchliwości pośredniej między LDH-3 a LDH-4. Dysocjacja i reasocjacja wykazały, że forma LDH-X złożona jest z czterech identycznych monomerów różnych od H i M. Autorzy wnioskują zatem, że synteza podjednostek X znajduje się pod kontrolą oddzielnego locus genowego.

Markert (38) przypuszcza, że we wczesnych stadiach ewolucji

jeden gen warunkował syntezę jednego łańcucha polipeptydowego. Polipeptyd taki mógł łączyć się z podobnymi łańcuchami tworząc polimery. Duplikacja genu, wywołana na przykład przez niehomologiczny *crossing-over*, nie zmieniała powstających polimerów. Jeśli jednak zaszła mutacja jednego z dwóch genów, zaczynały pojawiać się dwa różne polipeptydy, które w wyniku polimeryzacji dawały różne izoenzymy. Ta hipoteza odnosi się również do genów, kontrolujących syntezę hemoglobiny (29) oraz innych białek złożonych.

Jednakże niektóre fakty świadczą o kontroli syntezy izoenzymów niektórych enzymów przez jeden gen. Jeśli bowiem mutacja powoduje zmianę ruchliwości elektroforetycznej wszystkich uzyskanych przy rozdziale form badanego enzymu, to przynajmniej część cząsteczki każdego z izoenzymów musi się znajdować pod kontrolą tego samego genu. U *E.coli* na przykład pojedyncza mutacja powoduje zmianę ruchliwości wszystkich form fosfatazy alkalicznej, co sugeruje, że ich synteza znajduje się pod kontrolą jednego genu (4). Doświadczenia genetyczne wykazały, że również produkcja różnych form esteraz u szczepu 1 *Tetrahymena pyriformis* kontrolowana jest przez ten sam gen (1).

Liczne dane świadczą o podjednostkowej strukturze innych izoenzymów. Większości dowodów na podjednostkową budowę izoenzymów dostarczyły badania genetyczne (54). Na przykład myszy heterozygotyczne dla alleli kontrolujących syntezę dehydrogenazy izocytrynianowej (IDH), zależnej od NADP, wykazują obecność trzech form rozpuszczalnych tego enzymu. Formy te pojawiają się w proporcji 1 : 2 : 1. Homozygotyczne myszy rodzicielskie mają tylko jedną formę rozpuszczalnej IDH. Można zatem sądzić, że rozpuszczalne izoenzymy dehydrogenazy izocytrynianowej zależnej od NADP są złożone z dwóch podjednostek łączących się w sposób przypadkowy z wytworzeniem trzech różnych cząsteczek AA, AA', A'A' (26).

IV. Zmiany składu izoenzymatycznego tkanek podczas rozwoju

Zmiany składu izoenzymatycznego tkanek zaobserwowano podczas rozwoju zwierząt i roślin są niewątpliwie związane z różnicowaniem się komórek. Jednakże interpretacja wyników jest bardzo trudna.

Ciekawą próbę powiązania zmian w składzie izoenzymów z pojawianiem się nowych elementów strukturalnych dali Eppenberger i wsp. (17). Porównali oni wzrost aktywności izoenzymu fosfotransferazy kreatynowej (2.7.3.2) typu mięśniowego w czasie rozwoju kurcząt ze wzrostem ilości fosfokreatyny oraz struktur zawierających aktomiozynę. Okazało się, że wszystkie te procesy przebiegają równolegle.

Barber i Stewart (5) próbują wiązać zmiany spektrum izo-

enzymatycznego dehydrogenazy jabłczanowej tulipana z powstawaniem narządów wegetatywnych i kwiatowych.

Francesconi i Vilee (21), badając izoenzymy dehydrogenazy jabłczanowej w zarodkach *Arbacia*, wykazali pojawianie się dodatkowych form enzymu w 45 minut po zapłodnieniu. Aktywność tych form wzrasta intensywnie przez dwie godziny, po czym ustala się. Autorzy tłumaczą to zjawisko wzmożoną syntezą białka w tym okresie i zmianami metabolicznymi towarzyszącymi pierwszemu podziałowi.

Charakterystyczne zmiany składu izoenzymatycznego MDH podczas rozwoju owadów obserwował Laufer (33). Najwięcej jednak prac poświęconych jest zmianom składu dehydrogenazy mleczanowej w ontogenezie różnych zwierząt (18, 34, 40). Na przykład zarodkowe mięśnie szkieletowe kurcząt zawierają stosunkowo znaczną ilość podjednostek H. Po wykluciu się piskląt ilość podjednostek M gwałtownie wzrasta, a podjednostek H pozostaje bez zmiany. Zbliżoną sytuację można obserwować w mięśniu gastroemius podczas rozwoju królika.

Dodatkowych danych o czynnikach, regulujących syntezę izoenzymów mogą dostarczyć również badania nad wpływem rozmaitych parametrów na skład izoenzymatyczny tkanek zarodkowych. Dawson i wsp. (15) obserwowali, że w zapłodnionych jajach kurcząt inkubowanych w atmosferze zawierającej 100% tlenu następuje zahamowanie syntezy podjednostek M LDH w mięśniach szkieletowych. Z drugiej strony Lindy i Rajasalmi (35) wykazali, że pod wpływem obniżenia ciśnienia cząstkowego tlenu do 15% wzrasta synteza podjednostek M w sercu, nerkach i mięśniach piersiowych kurcząt. Podobną zależność składu izoenzymatycznego LDH od ciśnienia cząstkowego tlenu obserwowali również Hellung-Larsen i Anderson (25) w hodowli ludzkich limfocytów. Niskie ciśnienie tlenu pobudza zatem syntezę izoenzymów, w których przeważają podjednostki M, bardziej odporne na niedotlenienie.

U szczurów przetrzymywanych w niskiej temperaturze zwiększa się synteza podjednostek M w sercu w porównaniu ze szczurami kontrolnymi (8). Jednakże temperatura może być czynnikiem tylko pośrednio regulującym syntezę tych podjednostek. Czynnikiem bezpośrednim mogłyby być na przykład hormony. Wiadomo bowiem, że podawanie hormonów sterydowych wpływa na syntezę izoenzymów LDH w niedojrzałej macicy kastrowanych szczurów i królików. Obserwowano, że jeden z tych hormonów — estradiol stymuluje w większym stopniu syntezę podjednostek M niż podjednostek H. Równocześnie podanie obok estradiolu aktynowycyny znosi pobudzające działanie tego hormonu (23).

Również w stanach patologicznych normalny skład izoenzymatyczny ulega zmianom. Pojawianie się pewnych izoenzymów w surowicy i zmienne spektrum izoenzymatyczne tkanek wykorzystano w diagnostyce klinicznej (20, 60).

LITERATURA

1. Allen S. L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **94**, 753 (1961).
2. Appella E., Markert C. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **6**, 171 (1961).
3. Augusstinson K. B., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **94**, 844 (1961).
4. Bach M. L., Signer E. R., Levinthal C., Sizer I. W., *Federation Proc.* **20**, 225 (1961).
5. Barber J. T., Stewart F. C., *Develop. Biol.* **17**, 326 (1968).
6. Bernsohn K., Barron K. D., *Int. Rev. Neurobiol.* **7**, 297 (1964).
7. Bernsohn K., Barron K. D., Hess A., *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 656 (1961).
8. Blatt W. R., Walker J., Mager M., *Am. J. Physiol.* **209**, 785 (1965).
9. Bonavita V. w *Progress in Brain Research*, tom IV, red. D. P. Purpura i J. P. Schadé, Elsevier, Amsterdam-Londyn-New York, 1964, str. 254.
10. Bonavita V. w *Protides of Biological Fluides*, red. H. Peeters, Elsevier, Amsterdam-Londyn-New York, 1966, str. 163.
11. Boyd J. W., *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 302 (1966).
12. Burlington R. F., Sampson J. H., *Comp. Biochem. Physiol.* **25**, 185 (1968).
13. Cahn R. D., Kaplan N. O., Levine L., Zwilling E., *Science* **136**, 962 (1962).
14. Conference of Multiple Molecular Forms of Enzymes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **94**, 655 (1961).
15. Dawson D. M., Goodfriend T. L., Kaplan N. O., *Science* **143**, 929 (1964).
16. DiSabato G., Kaplan N. O., *Biochemistry* **2**, 776 (1963).
17. Eppenberger H. M., Eppenberger M., Richterich R., Aebi H., *Develop. Biol.* **10**, 1 (1964).
18. Fine I. H., Kaplan N. O., Kuftinec D., *Biochemistry* **2**, 116 (1963).
19. Fondy T. P., Pesce A., Freeberg J., Stolzenbach F., Kaplan N. O., *Biochemistry* **3**, 522 (1964).
20. Fortrell P. D., *Sci. Progr. Oxford* **55**, 543 (1967).
21. Francesconi R. P., Vilee C. A., *Comp. Biochem. Physiol.* **25**, 747 (1968).
22. Fritz P. J., *Science* **150**, 367 (1965).
23. Goodfriend T. L., Kaplan N. O., *J. Biol. Chem.* **239**, 130 (1964).
24. Haslam J. M., Krebs H. A., *Biochem. J.* **107**, 659 (1968).
25. Hellung-Larsen P., Anderson V., Abstracts of V FEBS Meeting, Praha 1968, The Czechoslovak Biochem. Soc. Praha 1968, str. 90.
26. Henderson N. S., *J. Exptl. Zool.* **158**, 263 (1965).
27. Holmes R. S., Masters C. J., *Biochim. Biophys. Acta* **151**, 147 (1968).
28. Hunter R. L., Markert C. L., *Science* **125**, 1294 (1957).
29. Ingram V. M., w *The Hemoglobins in Genetic and Evolution*, Columbia Univ. Press, New York 1963.
30. Jaenicke R., Knopf S., *Eur. J. Biochem.* **4**, 157 (1968).
31. Kaplan N. O., *Bacteriol. Rev.* **27**, 155 (1963).
32. Kitto G. B., Wassarman P. M., Kaplan N. O., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 578 (1966).
33. Laufer H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **94**, 825 (1961).
34. Lindsay D. T., *J. Exptl. Zool.* **152**, 75 (1963).
35. Lindy S., Rajasalmi M., *Science* **153**, 1401 (1966).
36. Markert C. L., *Science* **140**, 1329 (1963).

37. Markert C. L., w *Cytodifferentiation and Macromolecules Synthesis* red. M. Locke, Academic Press, New York-Londyn, 1963, str. 65.
38. Markert C. L., *The Harvey Lectures* 59, 187 (1965).
39. Markert C. L., Møller F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 45, 753 (1959).
40. Markert C. L., Uspung H., *Develop. Biol.* 5, 363 (1962).
41. Martinez-Carion M., Michuda C., Abstracts of V FEBS Meeting, Praha 1968, Czechoslovak Biochem. Soc., Praha, 1968, str. 60.
42. Maynard E. A., *J. Exptl. Zool.* 157, 251 (1964).
43. Meister A., *J. Biol. Chem.* 184, 117 (1950).
44. Niellands J. B., *J. Biol. Chem.* 199, 73 (1952).
45. Niemierko S., Lubińska L., *J. Neurochem.* 14, 761 (1967).
46. Nisselbaum J. S., Bodansky O., *Federation Proc.* 19, 336 (1960).
47. Nisselbaum J. S., Bodansky O., *J. Biol. Chem.* 236, 401 (1961).
48. Patte J. C., Le Bras G., Cohen G. N., *Biochim. Biophys. Acta* 136, 245 (1967).
49. Pfleiderer G., Jeckel D., *Biochem. Z.* 329, 371 (1957).
50. Pfleiderer G., Mella K., Abstracts of V FEBS Meeting, Praha 1968, The Czechoslovak Biochem. Soc., Praha 1968, str. 175.
51. Pfleiderer G., Wieland Th., *Biochem. Z.* 34, 80 (1964).
52. Plagelmann P. G., Gregory K. F., Wróblewski F., *J. Biol. Chem.* 235, 2288 (1960).
53. Schechter A. A., Epstein C. J., *Science* 159, 997 (1968).
54. Shaw C. R., *Science* 149, 936 (1965).
55. Shaw C. R., Barto E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 50, 211 (1963).
56. Spector R. G., Watts D. C., *Nature* 216, 154 (1967).
57. Stadtman E. R., Cohen G. N., Le Bras G., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 94, 952 (1961).
58. Szumiel I., *Post. Biochem.* 9, 153 (1963).
59. Takenaka Y., Schivert G. W., *J. Biol. Chem.* 223, 157 (1956).
60. Tomaszewski L., *Post. Biochem.* 9, 173 (1963).
61. Wachsmuth E. D., Pfleiderer G., Wieland Th., *Biochem. Z.* 334, 185 (1961).
62. Wieland Th., Pfleiderer G., *Angew. Chem.* 74, 261 (1962).
63. Wilkinson J. H., Isoenzymes, red. C. Long; E. N. Spoon LTD; Londyn 1965, str. 121.
64. Wilson A. C., Cahn R. D., Kaplan N. O., *Nature* 197, 331 (1963).
65. Ziegenbein R., *Nature* 212, 935 (1966).
66. Zinkham W. H., Blanco A., Kupchuk L., *Science* 142, 1303 (1963).
67. Zinkham W. H., Blanco A., Kupchuk L., *Science* 144, 1353 (1964).

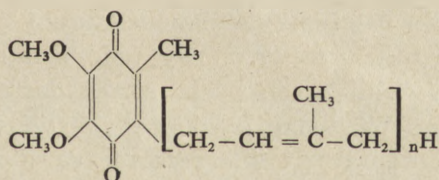
ALICJA K. DRABIKOWSKA *

Biosynteza ubichinonu w tkankach zwierzęcych

Biosynthesis of Ubiquinone in Animal Tissues

The biosynthetic pathway of ubiquinone is reviewed.

W roku 1955 w pracowni Mortona w Liverpoolu, w której przeprowadzono badania nad lipidami w różnych tkankach, wyodrębniono substancję o wyraźnym maksimum absorpcji przy 272 nm (8). Substancja ta nie ulegała zmydleniu w czasie gotowania z alkoholowym roztworem ługu. Na podstawie własności nieoczyszczonego preparatu Morton przypuszczał, że jest to związek o strukturze steroli. W roku 1957 Crane i wsp. (6) otrzymali z lipidów mitochondrialnych substancję o takim samym widmie w ultrafiolecie. Widmo w podczerwieni tej substancji oraz własności chemiczne wskazywały, że ma ona strukturę chinonu. W dwa lata później obydwie grupy badaczy ustaliły, że substancje te są identyczne, a dalsze badania wykazały, że jest to 2,3-dwumetoksy-5-metylo-6-dekaprenylo-1,4-benzochinon (wzór I). Związek ten nazwano ubichinonem (19, 39, 44).



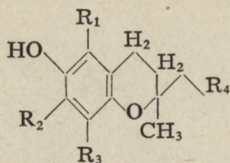
I

ubichinon (Qn)

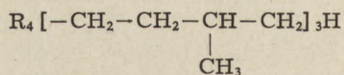
Występujące w świecie żywym homologi ubichinonu różnią się nie tylko długością łańcucha prenylowego i stopniem nasycenia, ale także podstawnikami w pierścieniu. Występowanie tych chinonów oraz różnice w ich budowie omówiono w *Postępkach Biochemii* (7).

Mimo, że ubichinon pod względem budowy chemicznej podobny jest do witamin E i K (wzór II, III) to jednak nie ma dotąd żadnych danych wskazujących na jakiegokolwiek ich pokrewieństwo biogenetyczne.

* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

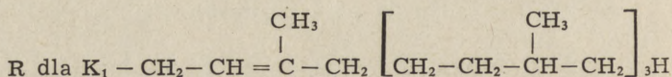
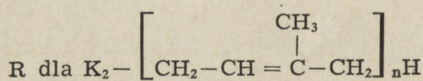
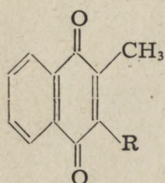


$R_1, R_2, R_3 \text{ CH}_3 \text{ lub H}$



II

tokoferol (witamina E)



III

witamina K

Poziom ubichinonu w tkankach nie zależy od zawartości tego związku w podawanym pożywieniu, ani od intensywności jego biosyntezy przez mikroflorę jelitową, a ponadto nie można zwierząt pozbawić całkowicie ubichinonu eliminując go z pokarmu (29). Wydaje się, że fakty te wskazują jednoznacznie, że ubichinon nie jest witaminą.

W ślad za wykryciem ubichinonu w tkankach i stwierdzeniem, że nie jest on pochodzenia egzogenego, potoczyły się badania zmierzające do ustalenia dróg jego syntezy w organizmach żywych. Do tego celu posłużyły badania z substancjami radioaktywnymi, domniemanymi prekursorami ubichinonu, przeprowadzane *in vivo* i *in vitro*.

Punktem wyjścia było założenie, że łańcuch prenylowy ubichinonu powstaje z octanu poprzez kwas mewalonowy, natomiast pierścień benzenowy może pochodzić z cyklicznych prekursorów dostarczanych organizmowi z pożywieniem. Wiadomo bowiem było na podstawie prac Beera i wsp. (3), że organizmy zwierzęce nie są zdolne do syntezy pierścienia benzenowego *de novo* z niskocząsteczkowych związków, lecz jedynie, i to w ograniczonym stopniu, mogą aromatyzować pewne pochodne cykloheksanowe oraz pierścień A estrogenów.

I. Biosynteza ubichinonu *n vivo*

We wszystkich pracowniach zajmujących się wyjaśnieniem mechanizmu biosyntezy ubichinonu posługiwano się podobną metodyką badań. Zwierzętom, zazwyczaj szczurom, podawano znakowane węglem ^{14}C do-

mniemane prekursorów. Początkowo jako prekursorów ubichinonu używano kwasów mewalonowego i octowego, które, jak przypuszczano, winny włączać się do łańcucha bocznego oraz fenyloalaniny i tyrozyny — jako prekursorów pierścienia benzenowego (11, 17, 26, 28).

Udział mikroflory bakteryjnej w tych doświadczeniach wykluczono przez wyjaławianie jelit zwierząt sulfamidami (34) lub antybiotykami (27). Olson i wsp. (28) przeprowadzili także badania na szczurach, którym usunięto operacyjnie jelita. Zwierzęta po tych zabiegach przeżywały jeszcze kilka godzin. Czas ten był wystarczający do przeprowadzenia doświadczeń z radioaktywnymi prekursorami. W wyniku tych badań ustalono, że ubichinon tkankowy jest produktem biosyntezy, która zachodzi wyłącznie w tkankach zwierzęcych. Włączanie się do Q_9 fenyloalaniny jednocie znakowanej ($-U-^{14}C$) oraz octanu ($-1-^{14}C$), podanych szczurom dożylnie, było jeszcze jednym dowodem potwierdzającym biosyntezę tego chinonu w tkankach zwierzęcych (28).

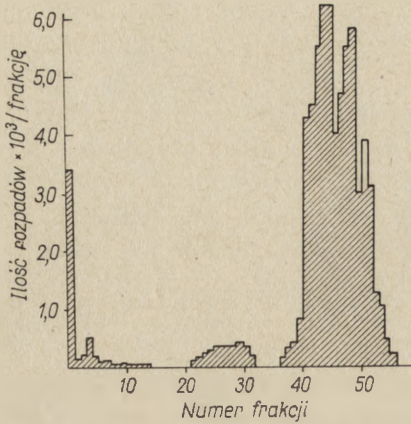
W rutynowych badaniach najczęściej śledzono wbudowywanie się prekursorów do ubichinonu w wątrobie szczurów. Dominuje w niej ubichinon o dziewięciu jednostkami izoprenowymi (Q_9). Stanowi on około 80% całej ilości chinonów; pozostałe 20% to ubichinon o dziesięciu jednostkami izoprenowymi (Q_{10}) (26, 28). Niższe homologi występują w ilościach śladowych. Po podaniu szczurom octanu znakowanego ^{14}C w grupie karboksylowej 95% radioaktywności frakcji chinonowej odnajdowano w Q_9 (27). W związku z tym w badaniach rutynowych wyodrębniano tylko Q_9 przyjmując, że u szczurów jest to jedyny syntetyzowany homolog chinonowy.

Wyodrębnianie ubichinonu z tkanki przeprowadzano w następujący sposób. Po upływie 1,5—3 godzin od podania radioaktywnego prekursora zwierzęta zabijano, a ubichinon ekstrahowano eterem etylowym ze zmydlonej tkanki. Ekstrakt oczyszczano wielokrotnie na kolumnie z tlenku glinu, a następnie za pomocą chromatografii bibułowej — aż do otrzymania spektralnie i radiochemicznie czystej substancji. W celu zabezpieczenia grup chinonowych zredukowaną formę ubichinonu acetylowano, w wyniku czego otrzymywano dwuoctan chinonu (20).

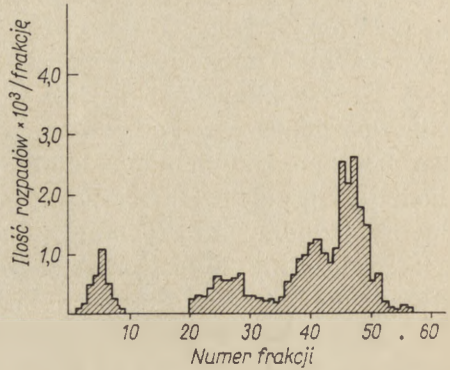
W większości eksperymentów oczyszczano także inne frakcje lipidowe dla porównania ich radioaktywności z radioaktywnością ubichinonu. Należy wspomnieć, że podawany szczurom radioaktywny octan odnajdowano głównie we frakcji sterolowej, a tylko nieznaczną jego część we frakcji chinonowej. Na przykład po podaniu zwierzęciu dootrzewnowo 100 μC octanu ($-1-^{14}C$) radioaktywność w poszczególnych frakcjach eluowanych z kolumny mieszaniną eteru naftowego i dwuetylowego, którego stężenie wzrastało od 0—50%, rozmieszczona była w sposób podany na rysunku 1.

Po podaniu szczurom jednocie znakowanej fenyloalaniny obserwowano podobny jakościowo rozkład radioaktywności w poszczególnych

frakcjach (rysunek 2). We frakcjach od 1 do 10 znajdowały się węglowodory, we frakcjach od 20 do 35 homologi ubichinonu, a we frakcjach 36—55 sterole.



Rys. 1. Rozmieszczenie radioaktywności w lipidach ekstrahowanych z wątroby szczura, któremu podano 100 μC octanu ($-1-^{14}\text{C}$), po chromatografii na tlenku glinu wg (28)

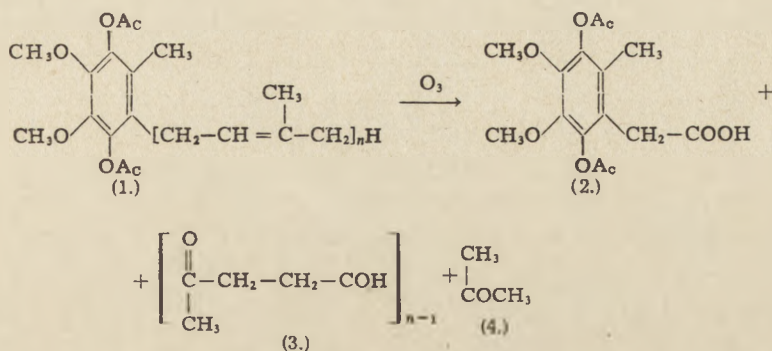


Rys. 2. Rozmieszczenie radioaktywności w lipidach ekstrahowanych z wątroby szczura, któremu podano 100 μC fenyloalaniny ($-U-^{14}\text{C}$), po chromatografii na tlenku glinu wg (28)

Podobny rozkład radioaktywności otrzymali Gloor i Wiss (12) po podaniu szczurom mewalonianu ($-2-^{14}\text{C}$) jako prekursora. W przypadku fenyloalaniny ($-U-^{14}\text{C}$) i octanu ($-1-^{14}\text{C}$) włączanie węgla izotopowego do frakcji węglowodorowej i ubichinonowej jest ilościowo bardzo zbliżone. Radioaktywność frakcji sterolowej jest natomiast prawie 3,5 razy większa po podaniu octanu niż fenyloalaniny. Frakcja ubichinonowa otrzymana po podaniu radioaktywnej fenyloalaniny zawiera znacznie mniej zanieczyszczeń niż frakcja wyodrębniona po podaniu znakowanego octanu, zawierająca prenylowe alkohole o różnej długości łańcucha, które powstają z octanu. Stopień zanieczyszczeń obrazuje następujący przykład (28): jeżeli ilość impulsów/min/mg substancji znajdujących się w frakcji chinonowej, jeden raz oczyszczonej na kolumnie, przyjmie się za 100, to po sześciokrotnym oczyszczeniu wynosi ona około 12, a po wyodrębnieniu ubichinonu w postaci duoctanu zaledwie 7.

Stosunek średniej wartości radioaktywności właściwej ubichinonu do radioaktywności właściwej cholesterolu wynosi 0,48 po podaniu octanu ($-1-^{14}\text{C}$) i 4,31 po podaniu fenyloalaniny ($-U-^{14}\text{C}$). Fakt ten wskazuje, że fenyloalanina jest dawką ^{14}C nie tylko dla łańcucha prenylowego, lecz także pierścienia ubichinonu. W celu ustalenia miejsc w cząsteczce ubichinonu, w które włączają się octan, mewalonian lub fenyloalanina, wy-

osobniony ubiquinon po zacetylowaniu (związek 1, schemat 1) poddawano degradacji za pomocą ozonolizy (4), a w otrzymanych produktach oznaczano radioaktywność.



Schemat 1. Ozonoliza ubiquinonu wg (35)

(1) — ubiquinon, (2) — kwas 3,6-dwuacetoksy-4,5-dwumetoksy-2-metylo-fenylooctowy, (3) — aldehyd lewulinowy, (4) — aceton

W wyniku ozonolizy otrzymywano z pierścienia ubiquinonu podstawioną pochodną kwasu fenylacetylowego, a z łańcucha prenylowego aldehyd lewulinowy i aceton powstający z końcowych węgli łańcucha (związki 2, 3 i 4, schemat 1). Analiza tych produktów wykazała, że octan nie jest wbudowywany do pierścienia ubiquinonu, a jedynie do łańcucha prenylowego. Natomiast 70—80% radioaktywności podanej fenyloalaniny ($-U-^{14}\text{C}$) odnajdowano w pierścieniu ubiquinonu a tylko 20—30% w bocznym łańcuchu. Obecność węgla ^{14}C w bocznym łańcuchu ubiquinonu można wytłumaczyć degradacją fenyloalaniny poprzez kwasy homogenityzyny i mewalonowy do kwasu octowego, który włącza się do łańcucha prenylowego ubiquinonu. (23).

W celu prześledzenia losu bocznych grup fenyloalaniny i tyrozyny użyto tych prekursorów znakowanych na trzecim atomie węgla w łańcuchu bocznym. Z obu tych substratów ^{14}C jest wbudowywany do łańcucha bocznego ubiquinonu, nie włącza się natomiast w żadne z miejsc pierścienia. Przypuszcza się, że łańcuchy boczne obydwu aromatycznych aminokwasów są odszczepiane przy przemianie pierścienia aminokwasów w pierścień ubiquinonowy i włączają się w przemiany, które prowadzą do syntezy prenylowego łańcucha. Z badań tych wynika, że pierścień benzenowy pochodzi zawsze z pierścienia fenyloalaniny lub tyrozyny, zaś łańcuch boczny ubiquinonu tworzy się z octanu oraz bocznych łańcuchów aromatycznych aminokwasów, a niekiedy także z produktów degradacji ich pierścienia. W nieznacznym stopniu może w tym procesie brać udział kwas mrówkowy (43). Brak radioaktywności w pierścieniu benzenowym ubiquinonu po podaniu zwierzętom octanu lub mewalonianu jest dowodem, że pierścień benzenowy nie może być syntetyzowany *de novo* z niskocząsteczkowych prekursorów.

II. Biosynteza ubichinonu *in vitro*

Po wielu nieudanych próbach przeprowadzenia biosyntezy ubichinonu *in vitro* (18, 33, 41, 42) Gold i Olson (14) oraz Gold i wsp. (13) wykazali, że w odpowiednio dobranych warunkach proces ten zachodzi z wydajnością zbliżoną do biosyntezy *in vivo*. Octan ($-1-^{14}\text{C}$), mewalonian ($-2-^{14}\text{C}$), fenyloalanina ($-U-^{14}\text{C}$) i tyrozyna ($-U-^{14}\text{C}$) są włączane do ubichinonu. Używając mewalonianu stwierdzono, że *in vitro* stosunki szybkości biosyntezy ubichinonu i cholesterolu cechuje większa zmienność niż *in vivo*. O ile *in vivo* przeciętna szybkość syntezy cholesterolu była 40 razy większa niż ubichinonu, to *in vitro* szybkość ta jest do 350 razy większa. Różnice te są znacznie mniejsze gdy używa się zamiast wątroby preparatów innych tkanek (tablica 1). Zmieniony *in vitro* stosunek szybkości

Tablica 1

Włączanie mewalonianu ($-2-^{14}\text{C}$) do ubichinonu i cholesterolu w skrawkach tkanek szczura wg (14)

Tkanka	Ubichinon			Cholesterol		
	Zawartość $\mu\text{g/g}$ tkanki	Aktywność właściwa $\text{imp}/\mu\text{mol}$	Synteza $\text{imp}/\text{min}/\text{g}$ tkanki	Zawartość $\mu\text{g/g}$ tkanki	Aktywność właściwa $\text{imp}/\mu\text{mol}$	Synteza $\text{imp}/\text{min}/\text{g}$ tkanki
Serce	210	1650	456	1,04	1620	1680
Wątroba	100	3520	530	2,10	56000	117000
Nerki	80	18200	1944	1,90	13000	24700
Jelita	28	3410	136	1,60	1268	2200

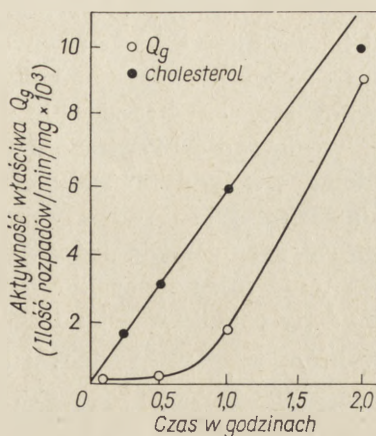
biosyntezy ubichinonu do szybkości syntezy cholesterolu wskazuje na istnienie mechanizmu kontrolującego w warunkach fizjologicznych. Zaobserwowano również (14, 24), że w obecności mewalonianu ($-2-^{14}\text{C}$) biosynteza cholesterolu zachodzi natychmiast, natomiast biosyntezę ubichinonu poprzedza okres spoczynkowy (ang. *lag period*) (rysunek 3). Natychmiastowe włączanie mewalonianu do cholesterolu może być uwarunkowane tym, że jest to jedyny prekursor cholesterolu. Natomiast w syntezie ubichinonu biorą udział także inne związki, które muszą być „ściągnięte”, jak przypuszczają autorzy, z różnych obszarów komórki.

III. Związki pośrednie w biosyntezie ubichinonu

1. Prekursory pierścienia ubichinonu

Wyniki badań przeprowadzanych *in vivo* i *in vitro* wskazywały, że do pierścienia ubichinonu poza fenyloalaniną i tyroziną może być włączany z całkiem dobrą wydajnością pierścień kwasu benzoowego oraz *p*-hydroksybenzoowego (2, 25, 31, 32). Wydaje się zatem, że aroma-

tyczne aminokwasy podlegają enzymatycznym przemianom prowadzącym do kwasu benzoowego lub *p*-hydroksybenzoowego (5a, 16) lub ewentualnie do związków mogących wziąć bezpośredni udział w biosyntezie ubiquinonu.



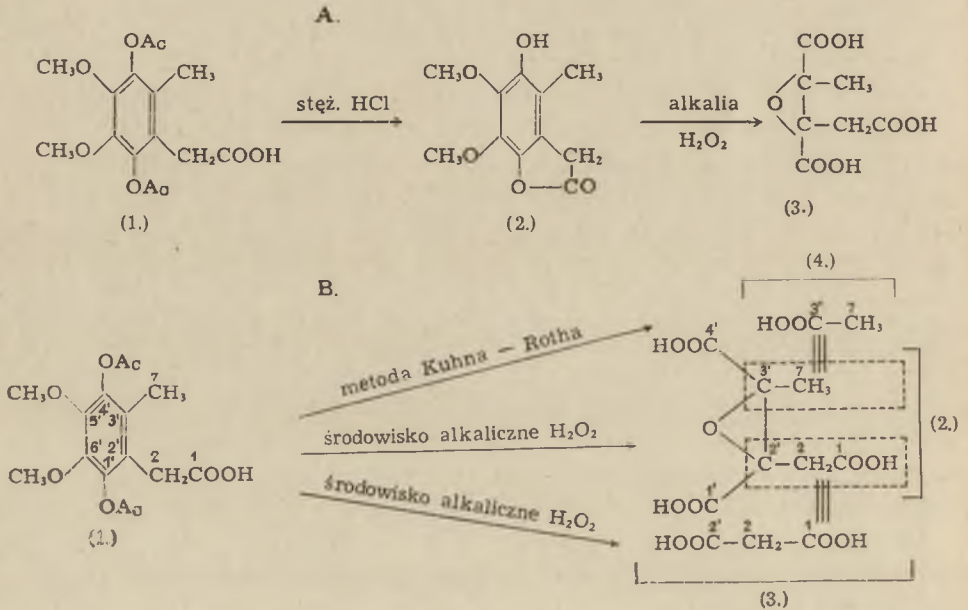
Rys. 3. Szybkość włączania się mewalonianu ($-2\text{-}^{14}\text{C}$) do ubiquinonu i cholesterolu wg (14)

W badaniach nad przemianami, jakim ulega tyrozyna przed włączeniem się do cząsteczki ubiquinonu zastosowano metodę rozcieńczeń „zimnym” związkiem pośrednim. Jako substratu używano tyrozyny ($-U\text{-}^{14}\text{C}$), a jako substancji rozcieńczających różnych pochodnych benzenowych. Te z nich, które stanowią związki pośrednie w biosyntezie ubiquinonu powinny zmniejszać lub całkowicie hamować włączanie się tyrozyny. Okazało się, że *p*-hydroksyfenylopirogronian, kwas *p*-hydroksycynamonowy, *p*-hydroksybenzoesan, benzoesan i jego pochodne podstawione w pozycjach 2, 3 i 4 zmniejszają włączanie się jednolicie znakowanej tyrozyny do pierścienia ubiquinonu (2, 23). Są one zatem pośrednikami w biosyntezie pierścienia ubiquinonu. Inne substancje nie leżące na głównym szlaku metabolicznym aromatycznych aminokwasów mogą być również włączane do pierścienia ubiquinonu. Do nich należą alkohol benzoesowy i *p*-hydroksybenzoesowy oraz aldehyd benzoesowy i *p*-hydroksybenzoesowy. Obydwa rodzaje tych związków ulegają prawdopodobnie najpierw utlenieniu do kwasu benzoowego lub *p*-hydroksybenzoowego, a następnie wchodzą w tok normalnych przemian.

Wyniki doświadczeń z fenylomleczanem lub *p*-hydroksyfenylomleczanem jako czynnikami rozcieńczającym jednolicie znakowaną fenylalaninę dowodzą, że tworzenie się *p*-hydroksybenzoesanu zachodzi głównie poprzez hydroksylację fenylalaniny do tyrozyny. Z drugiej strony w wyniku przemian fenylalaniny powstają także kwas benzoesowy lub aldehyd benzoesowy, które mogą także ulegać *in vivo* hydroksylacji (1). Wydaje się, że obecność grupy karboksylowej lub karbonylowej przy

pierścieniu benzenowym sprzyja temu procesowi. Dowodem pozwalającym na wyciągnięcie takich wniosków są doświadczenia Rudneya i Parsona (37) oraz Parsona i Rudneya (31), którzy wykazali, że szybkość włączania się radioaktywnego benzaldehydu do ubichinonu u *Rhodospirillum rubrum*, *Azotobacter vinelandii*, drożdży i w nerkach szczura jest taka sama jak kwasu benzoowego. Wskazuje to na jego ścisłe powiązanie ze związkiem stanowiącym bezpośredni prekursor pierścienia benzenowego, prawdopodobnie z kwasem *p*-hydroksybenzoowym. Ponieważ węgiel radioaktywny grupy karboksylowej ani karbonylowej nie odnajdowano w żadnym produkcie pośrednim, przypuszcza się, że grupy te zostają enzymatycznie odszczepione od pierścienia przed przyłączeniem lub w czasie przyłączenia łańcucha prenylowego. Droga wiodąca przez benzoosan może mieć znaczenie w fenylketonurii, kiedy aktywność hydroksylazy fenylalaniny jest znacznie osłabiona (30).

W celu ustalenia, w które miejsce cząsteczki ubichinonu włącza się radioaktywny atom węgla badanych związków, ubichinon izolowano z tkanki, przeprowadzano w pochodną dwuacetylową i poddawano ozonolizie otrzymując kwas 3,6-dwuacetoxy-4,5-dwumetoksy-2-metylofenylooctowy (schemat 1, związek 2), który degradowano następnie w sposób podany na schemacie 2.



Schemat 2. Degradacja kwasu 3,6-dwuacetoxy-4,5-dwumetoksy-2-metylofenylooctowego (wzór (1))

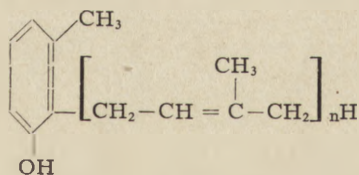
(2) — lakton pochodnej kwasu fenyllooctowego, (3) — kwas epoksytrójkarboksylowy, (4) — kwas malonowy, (5) — kwas octowy

W wyniku tej degradacji otrzymywano dwie cząsteczki CO_2 , kwas epoksytrójkarboksylowy (związek 3, schemat 2A) oraz kwas malonowy. Kwas epoksytrójkarboksylowy wykazywał tę samą aktywność co ubichinon powstały z kwasu benzoowego, w którym atom węgla w pierścieniu związany z grupą karboksylową był radioaktywny. Kwas malonowy natomiast nie był radioaktywny. A zatem radioaktywny węgiel znajdujący się w pierścieniu kwasu benzoowego jest włączany przez tkanki do pierścienia ubichinonu w jedną z ugrupowań chinonowych. Okazało się również, że powstający podczas degradacji metodą Kuhna-Rotha (schemat 2B) kwas octowy jest nieradioaktywny. Wyniki te świadczą, że pierścień benzenowy ubichinonu może powstawać ze wszystkich związków, które ulegają przemianom do kwasu *p*-hydroksybenzoowego (schemat 3).

Przemiany prowadzące od kwasu *p*-hydroksybenzoowego do ubichinonu muszą obejmować dekarboksylację, O- i C-metylację oraz przyłączenie łańcucha prenylowego. Wykrycie szeregu prekursorów ubichinonu (9) w ciągu ostatnich kilku lat pozwala uzupełnić w dość znacznym stopniu schemat biosyntezy ubichinonu na odcinku od kwasu *p*-hydroksybenzoowego aż do ubichinonu (schemat 3).

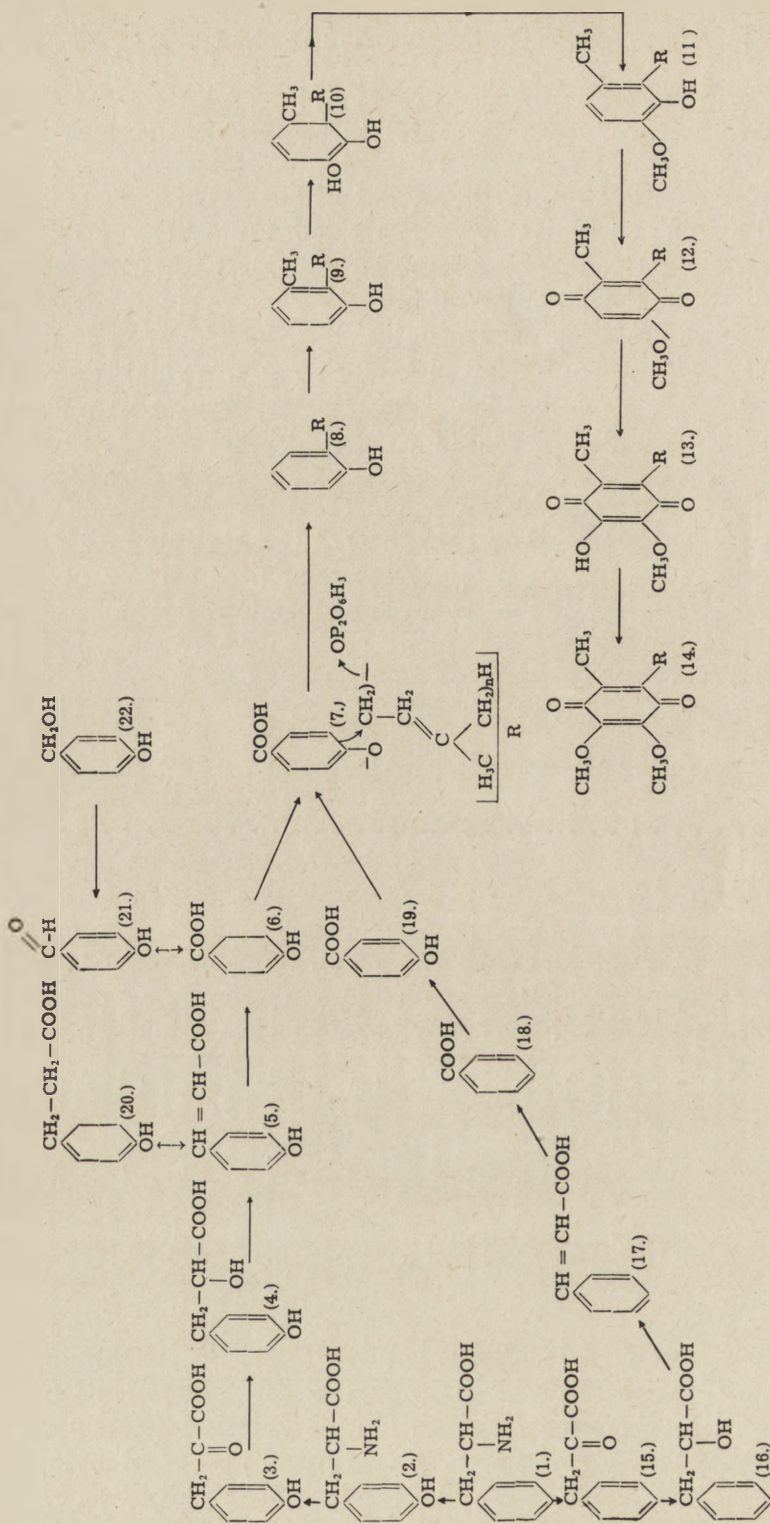
2. Przyłączanie łańcucha prenylowego

W roku 1966 Olson i Aiyar (24) wyodrębnili ze skrawków wątroby i nerek szczura lipid, absorbujący światło ultrafioletowe, który podczas chromatografii wykazuje bardziej polarne własności niż 2-dekaprenylofenol (schemat 3). Ma on prawdopodobnie podstawioną jedną pozycję w pierścieniu grupą metylową (wzór IV). Tyrozyna ($-\text{U}^{-14}\text{C}$) oraz kwas *p*-hydroksybenzoowy ($-\text{U}^{-14}\text{C}$) znakują ten związek w podobny sposób jak ubichinon. Lipid ten podany jako substrat wbudowuje się



IV
metylo-prenylofenol

w ubichinon i w związku z tym przypuszcza się, że jest jego naturalnym prekursorem i że przyłączenie łańcucha prenylowego do pierścienia benzenowego zachodzi we wczesnej fazie procesu biosyntezy cząsteczki ubichinonu (22). Pierwotnie przypuszczano, że przyłączenie grupy prenylowej jest ostatnim z etapów biosyntezy ubichinonu. Poza tym sądzono, że grupa prenylowa włącza się w miejsce grupy karboksylowej kwasu ben-



Schemat 3. Biosynteza ubichinonu

(1) — fenyloalanina, (2) — tyrozyna, (3) — kwas *p*-hydroksyfenylpirogonowy, (4) — kwas *p*-hydroksyfenylomlekowy, (5) kwas *p*-hydroksycynamonowy, (6) — kwas *p*-hydroksybenzoesowy, (7) — hipotetyczny posrednik, (8) — *p*-prenylofenol, (9) — 2-prenylo-3-metylo-6-hydroksyfenol, (10) — 2-prenylo-3-metylo-6-metoksyfenol, (11) — 2-prenylo-3-metylo-6-metoksy-1,4-benzochinon, (12) — 2-prenylo-3-metoksy-5-hydroksybenzochinon, (13) — 2-prenylo-3-metoksy-5-hydroksybenzochinon, (14) — ubichinon, (15) — kwas fenylopirogonowy, (16) — kwas fenylopirogonowy, (17) — kwas cynamonowy, (18) — kwas benzoowy, (19) — kwas *p*-hydroksybenzoesowy, (20) — kwas *p*-hydroksyfenylpirogonowy, (21) — aldehyd *p*-hydroksybenzoesowy, (22) — alkohol *p*-hydroksybenzoesowy.

zoesowego (38, 40). Koncepcję tę podważyły negatywne wyniki doświadczeń, w których próbowano podstawić grupę prenylową do cząsteczki ubichinonu Q_0 (11). Obecnie uważa się, na co wskazuje budowa licznych wyodrębnionych związków pośrednich, które są niekompletnie podstawione, że kwas *p*-hydroksybenzoesowy jest alkilowany przez pirofosforan prenylu do kwasu 3-prenylo-4-hydroksybenzoesowego, który z kolei ulega dekarboksylacji dając 2-prenylofenol (schemat 3). Gdyby łańcuch prenylowy włączał się w miejsce grupy karboksylowej, wówczas powstałaby 4-prenylofenol, co nie jest zgodne z obserwacjami.

3. Przyłączanie grup metylowych i metoksylowych

W roku 1961 Olsen i wsp. (27) stwierdzili, że grupa metylowa związana z pierścieniem benzenowym ubichinonu może tworzyć się z kwasu mrówkowego podobnie jak pozostałe grupy metoksyłowe. Dawcą grup metoksylowych i metylowych jest prawdopodobnie *S*-adenozylometionina (25). Byłby to według Olsona i wsp. (25) pierwszy zaobserwowany przypadek bezpośredniego dołączania grupy metylowej do atomu węgla związku występującego w tkankach zwierzęcych. Ostatnio w pracowni Olsona (5) stwierdzono, że podany szczurom radioaktywny aldehyd mrówkowy włącza się do ubichinonu z wątroby. Wyizolowany i oczyszczony ubichinon poddany ozonolizie daje kwas 1,4-dwuacetoksy-5,6-dwumetoksy-3-metylofenylooctowy (schemat 2, wzór 1), który wykazuje prawie 80% radioaktywności wyodrębnionego ubichinonu. Reszta zaś znajduje się w produktach rozkładu łańcucha prenylowego. Wyniki degradacji metodą Kuhna-Rotha lub Zeisela wykazały, że radioaktywność atomu węgla grupy metylowej stanowi około 41%, a grup metoksylowych 59% całej radioaktywności pochodnej fenylowej kwasu octowego (5). Teoretyczne wartości przy założeniu, że wszystkie trzy grupy są w jednakowy sposób włączane do pierścienia wynosiłyby 33,3% dla grupy metylowej i 66,6% dla grup metoksylowych.

Wydaje się, że przyłączanie grupy metylowej przebiega tak samo również i u *Rhodospirillum rubrum*. Okazało się bowiem, że podobnie jak u szczurów radioaktywność grupy metylowej ubichinonu wyodrębnionego z tego mikroorganizmu po podaniu do pożywki mrówczanu stanowi 44% całej radioaktywności ubichinonu (32).

Doświadczenia z kwasem benzoesowym znakowanym ^{14}C w pierścieniu wykazały, że grupa metylowa nie przyłącza się do pierścienia benzenowego ubichinonu w miejsce poprzednio związanej z nim grupy karboksylowej. Produkt degradacji metodą Kuhna-Rotha, kwas octowy, nie jest bowiem radioaktywny. Jest to w zgodzie z poprzednimi wnioskami (36), że węgiel pierścienia benzenowego, z którym związana jest grupa karboksylowa stanowi jeden z dwóch węgli chinonowych, a grupa metylowa włącza się w pozycję *orto* w stosunku do grupy karboksylowej kwasu benzoesowego lub *p*-hydroksybenzoesowego.

Z *R. rubrum* po dodaniu do pożywki kwasu benzooesowego lub *p*-hydroksybenzooesowego otrzymano kilka poliprenylofenoli i benzochinonów (9, 10, 21), które mogą być produktami pośrednimi w biosyntezie ubichinonu. Należy do nich 2-dekaprenylo-6-metoksy-3-metylo-1,4-benzochinon, 2-dekaprenylo-6-metoksy-1,4-benzochinon oraz metylo-dekaprenylobenzochinon i metylo-nonaprenylobenzochinon. W dwóch ostatnich związkach dających charakterystyczne sygnały w spektroskopii masowej nie ustalono pozycji grupy metylowej. Mimo, że nie wszystkie te związki udało się wyodrębnić z tkanek zwierzęcych, to jednak wydaje się, że u zwierząt i *Rhodospirillum rubrum* drogi biosyntezy ubichinonu są wspólne lub tylko nieznacznie różniące się na pewnych odcinkach. Przemawiają za tym przede wszystkim dwa fakty: *p*-hydroksybenzoosan jest prekursorem ubichinonu zarówno u *R. rubrum* jak i zwierząt wyższych, a ubichinon Q₁₀ występuje w obu tych organizmach.

IV. Miejsce syntezy ubichinonu w komórce

Mimo, że przebieg biosyntezy ubichinonu został w ostatnich latach w znacznym stopniu wyjaśniony, to dotychczas niewiele wiadomo o miejscu jego syntezy w komórce.

Joshi i wsp. (15) wykazali, że podany szczurom radioaktywny kwas mewalonowy włącza się do ubichinonu w wątrobie przy czym najwyższą radioaktywność wykazywał płyn po odwirowaniu mikrosomów, mitochondriów i jąder komórkowych z homogenatu sporządzonego po jednej godzinie od chwili podania mewalonianu. Po tym czasie ilość ubichinonu w supernatancie zmniejszała się, a zwiększała się jego zawartość w pozostałych frakcjach. Wyniki te wskazują dość wyraźnie, że w supernatancie zachodzą ostatnie etapy biosyntezy ubichinonu.

Phillips i wsp. (35) wykazali, że ubichinon nie jest syntetyzowany przez żadną frakcję podkomórkową użytą z osobna. Wydajność biosyntezy równą wyjściowej w homogenacie wątroby szczura otrzymano, kiedy mitochondria i supernatant lub mikrosomy i supernatant inkubowano razem.

Ta skromna ilość prac i wyników nie może stanowić podstawy do wyciągania ogólnych wniosków. Zebrane dane zaprzeczają jednak przypuszczeniu, jakoby prenylacja pierścienia, jako jeden z ostatnich etapów biosyntezy ubichinonu, zachodziła w mitochondriach. Wskazują natomiast, że mitochondria lub mikrosomy są konieczne we wcześniejszej fazie procesu. Wydaje się jednak, że na pytanie jakie struktury komórkowe biorą udział w biosyntezie ubichinonu nie szybko otrzymamy odpowiedź.

LITERATURA

1. Acheson R. M., Gibbard S., *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 320 (1962).
2. Aiyar A. S., Olson R. E., *Federation Proc.* **23**, 425 (1964).
3. Beer C. T., Dickens F., Pearson J., *Biochem. J.* **48**, 222 (1951).
4. Bentley R., Ramsey V. G., Springer C. M., Dialameh G. H., Olson R. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 443 (1961).
5. Bentley R., Springer C. M., Ramsey V. G., Dialameh G. H., Olson R. E., *J. Biol. Chem.* **243**, 174 (1968).
- 5a. Booth A. N., Masri M. S., Robbins D. J., Emerson O. H., Jones F. T., De Eds F., *J. Biol. Chem.* **235**, 2649 (1960).
6. Crane F. L., Hatefi Y., Lester R. L., Widmer C., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 220 (1957).
7. Drabikowska A. K., *Post. Biochem.* **15**, 65 (1969).
8. Festenstein G. N., Heaton F. W., Lowe J. S., Morton R. A., *Biochem. J.* **59**, 558 (1955).
9. Friis P., Daves G. D., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4754 (1966).
10. Friis P., Lars J., Nillson G., Daves Jr., Folkers K., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 324 (1967).
11. Gloor U., Wiss O., *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 216 (1959).
12. Gloor U., Wiss O., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2**, 222 (1960).
13. Gold P. H., Dialameh G. H., Olson R. E., *Federation Proc.* **20**, 228 (1961).
14. Gold P. H., Olson R. E., *J. Biol. Chem.* **241**, 3507 (1966).
15. Joshi V. C., Jayaraman J., Ramasarma T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 108 (1965).
16. Lawson D. E. M., Glover J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 223 (1961).
17. Lawson D. E. M., Mercer E. I., Glover J., Morton R. A., *Biochem. J.* **74**, 38P (1960).
18. Lawson D. E. M., Trelfall D. R., Glover J., Morton R. A., *Biochem. J.* **79**, 201 (1961).
19. Lester R. L., Crane F. L., Hatefi Y., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4751 (1958).
20. Lester R. L., Hatefi Y., Widmer C., Crane F. L., *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 169 (1959).
21. Olsen R. K., Daves Jr. G. D., Moore H. W., Folkers K., Parson W. W., Rudney H. J., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 5919 (1966).
22. Olsen R. K., Smith J. L., Daves G. D., Moore H. W., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 2298 (1965).
23. Olson R. E., *Federation Proc.* **24**, 85 (1965).
24. Olson R. E., Aiyar A. S., *Federation Proc.* **25**, 217 (1966).
25. Olson R. E., Bentley R. A., Aiyar A. S., Dialameh G. H., Gold P. H., Ramsey V. G., Springer C. M., *J. Biol. Chem.* **238**, PC3146 (1963).
26. Olson R. E., Dialameh G. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2**, 198 (1960).
27. Olson R. E., Dialameh G. H., Bentley R., w Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport, red. G. E. W. Welstenholme i C. M. O'Connor, LDT. Londyn 1961, str. 264.
28. Olson R. E., Dialameh G. H., Bentley R., Springer C. M., Ramsey V. G., *J. Biol. Chem.* **240**, 514 (1965).
29. Morton P., *Biochem. J.* **73**, 427 (1959).

30. Napier E. A. Jr., Kreyden R. W., Henley K. S., Pollard H. M., *Nature* **202**, 806 (1964).
31. Parson W. W., Rudney H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **51**, 444 (1964).
32. Parson W. W., Rudney H., *J. Biol. Chem.* **240**, 1855 (1965).
33. Phillips W. E. J., *Can. J. Biochem. Physiol.* **38**, 1105 (1960).
34. Phillips W. E. J., Hidioglou M., Hatina G., *Can. J. Biochem.* **44**, 1615 (1966).
35. Phillips W. E. J., Morton R. A., *Biochem. J.* **73**, 430 (1959).
36. Ramsey V. G., Zwitkowitz P. M., Bentley R., Olson R. E., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 1553 (1966).
37. Rudney H., Parson W. W., *J. Biol. Chem.* **238**, PC3137 (1963).
38. Schieffer H. G., Martius C., *Biochem. Z.* **333**, 454 (1960).
39. Shunk C. H., Linn B. O., Wong E. L., Wittreich P. E., Robinson F. M., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4754 (1958).
40. Stoffel W., Martius C., *Biochem. Z.* **333**, 440 (1960).
41. Wiss O., Gloor U., Vitamins and Hormones red. R. S. Harris, J. G. Wool, J. A. Loraine, Academic Press, New York i Londyn, 1960, tom 18, str. 485.
42. Wiss O., Gloor U., Weber F., *Am. J. Clin. Nutr.* **9**, 27 (1961).
43. Wiss O., Gloor U., Weber F., Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport, red. G. E. W. Welstenholme, i C. M. O'Connor, LDT. Londyn 1961, str. 264.
44. Wolf D. E., Hoffman C. H., Trenner N. R., Arison B. H., Shunk C. H., Linn B. O., Mc Person J. F., Folkers K., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4752 (1958).

WIESŁAW H. TRZECIAK *

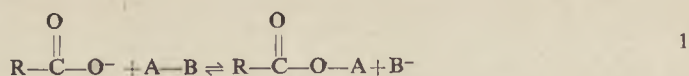
Enzymatyczna aktywacja kwasów tłuszczowych

Enzymic Fatty Acid Activation

Enzymic fatty acid activation is reviewed.

W środowisku o *pH* zbliżonym do panującego w tkankach kwasy tłuszczowe występują prawie wyłącznie w postaci ujemnie naładowanych reszt kwasowych, nie ulegających reakcji podstawienia ugrupowaniami nukleofilowymi. Aktywacja kwasów tłuszczowych polega na przekształceniu reszty kwasowej w pochodną reaktywną, zwykle kosztem energii wiązania nukleozydotrójfosforanu. Wyróżnia się bezpośrednią i pośrednią aktywację kwasów tłuszczowych (30).

Bezpośrednia aktywacja polega na przekształceniu reszty kwasowej w taką pochodną, która nie wykazuje ujemnego ładunku ani rezonansu właściwego wolnej grupie karboksylowej. Reakcja przebiega według następującego schematu:

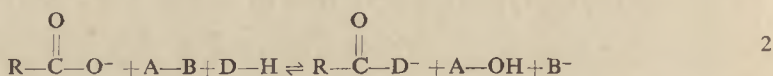


gdzie A—B jest donatorem energii. W reakcji tego typu oba atomy tlenu pochodzące z grupy karboksylowej pozostają w jednym z produktów reakcji, co stwierdzono używając związku znakowanego ^{18}O . Jedynymi tego rodzaju reakcjami, prowadzącymi do powstania znacznych ilości „aktywnych” kwasów tłuszczowych, są reakcje katalizowane przez fosfotransferazy (EC. 2.7.2.). Aktywna grupa fosforanowa — zwykle z ATP — zostaje przeniesiona bezpośrednio na resztę kwasu tłuszczowego. Produktem reakcji są acylofosforany. Do najlepiej poznanych enzymów katalizujących reakcje bezpośredniej aktywacji kwasów tłuszczowych należą kinaza octanowa (EC. 2.7.2.1.), przenosząca resztę fosforanową

* Dr, Katedra Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Poznań

z ATP na octan (41) oraz kinaza maślanowa, katalizująca przeniesienie reszty fosforanowej z ATP na kwasy tłuszczowe o łańcuchu zawierającym 2 do 10 atomów węgla (64). Acylofosforany mogą także być źródłem innych „aktywnych” postaci kwasów tłuszczowych. W reakcjach katalizowanych przez fosfotransacylazę (EC. 2.3.1.8.) acyl z acylofosforanu może zostać przeniesiony na CoA. Produktem reakcji są acylotioestry koenzymu A.

Pośrednia aktywacja kwasów tłuszczowych polega na przekształceniu reszty kwasowej w rodnik acylowy przez wymianę jednego atomu tlenu w grupie karboksylowej na atom siarki. Oprócz donatora energii (A-B) w reakcji tej bierze udział akceptor acylu (D-H):



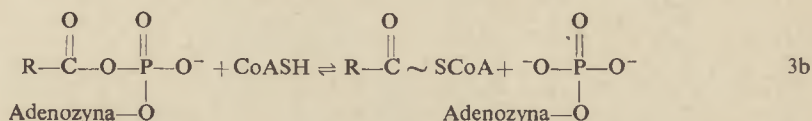
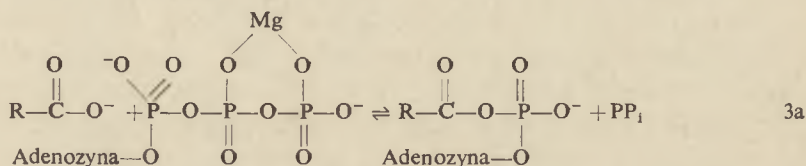
W reakcji 2 zachodzi wymiana izotopowego tlenu ^{18}O grupy karboksylowej między akceptorem acylu a donatorem energii (10). Reakcji towarzyszy rozłożenie donatora energii — nukleozydotrójfosforanu (z reguły ATP) na nukleozydomonofosforan i nieorganiczny pirofosforan (5, 6, 28, 31, 35). W ten sposób aktywowane są octan (5, 6, 28, 31, 35, 69), kwasy tłuszczowe o średniej długości łańcucha (28, 31, 44) i o długim łańcuchu acylowym (38, 45, 57). Opisano także reakcje aktywacji kwasów tłuszczowych o łańcuchu średniej długości (53) i o długim łańcuchu acylowym (24, 25, 55), którym towarzyszył rozpad GTP na GDP i nieorganiczny ortofosforan. Wskazuje to na istnienie co najmniej dwóch dróg pośredniej aktywacji kwasów tłuszczowych. Akceptorem acylu w reakcji pośredniej aktywacji kwasów tłuszczowych jest koenzym A, a produktami reakcji są acylotioestry CoA.

I. Mechanizm reakcji aktywacji kwasów tłuszczowych

Jako układ modelowy dla śledzenia mechanizmu aktywacji kwasów tłuszczowych posłużył układ aktywujący octan. Okazało się, że reakcja katalizowana przez oczyszczoną syntetazę acetylo-CoA z drożdży przebiega w dwóch etapach (5, 6).

W pierwszym etapie, w obecności jonów magnezu, reszta kwasu tłuszczowego reaguje z ATP. Produktami reakcji są: związany z enzymem, mieszany bezwodnik kwasu tłuszczowego i nukleozydomonofosforanu (adenylan acylowy) oraz nieorganiczny pirofosforan (reakcja 3a). W drugim etapie w obecności kationów jednowartościowych adenylan reaguje z koenzymem A i tworzą się acylo-CoA („aktywny” acyl) i adenozy-nomonofosforan (reakcja 3b). Berg (5, 6) przedstawił przekonujące dowody przemawiające za udziałem acetylo-AMP w reakcji aktywacji

octanu. Wykazał on, że acetyloadenylan może być donatorem acetylu dla CoA lub adenylu dla pirofosforanu. Ta ostatnia reakcja zachodzi wyłącznie w obecności jonów magnezu. Przy współudziale hydroksylaminy jako akceptora acetylu syntetaza acetylo-CoA katalizuje reakcję, w której w obecności jonów magnezu z octanu i ATP powstają kwas acetylohydroksamowy, AMP i PP_i . Reakcja może przebiegać bez udziału



CoA. Dowiedziono ponadto, że radioaktywny pirofosforan w obecności octanu i jonów magnezu wymienia piętno izotopowe z ATP (5, 6, 23) oraz, że wbudowanie do ATP znakowanego AMP wymaga octanu i CoA (5, 6). Piętno izotopowe octanu odnajdowano w acetylo-CoA po inkubacji w obecności PP_i , AMP i syntetazy acetylo-CoA. Znakowany octan nie włączał się w tych warunkach do acetylo-AMP (5, 6).

Aktywacja kwasów tłuszczowych o łańcuchach średniej długości i o długim łańcuchu acylowym przebiega analogicznie do aktywacji octanu (31, 67).

Badając reakcję acetyloadenylanu z imidazolem J e n c k s wykazał, że energia swobodna hydrolizy wolnego acetylo-AMP, mierzona w pH 7, jest co najmniej równa energii uwalniającej się podczas hydrolizy acetyloimidazolu (28). Ponieważ energia swobodna hydrolizy acetyloimidazolu wynosi około 13 300 kal/mol, a energia uwalniająca się w czasie rozkładu ATP na AMP i PP_i zaledwie 7600 kal/mol (32), bariera energetyczna, której przekroczenie jest konieczne do utworzenia wolnego acetyloadenylanu, jest wysoka. Wolne acetyloadenylany nie gromadzą się w przebiegu reakcji i trudno je wykryć nawet stosując czułe techniki izotopowe. Nie decyduje o tym wyłącznie wspomniana wysoka bariera energetyczna, lecz także pewna „modyfikacja” struktury tego związku spowodowana przypuszczalnie jego związaniem z białkiem enzymatycz-

nym (30). Dane doświadczalne wskazują, że bariera energetyczna dysocjacji związanego acyloadenylnanu znacznie przewyższa wydatek energii potrzebny do połączenia wolnego acyloadenylnanu z białkiem. Związany acylo-AMP musi więc znajdować się na niższym poziomie energetycznym niż wolne acyloadenylnany.

Te same uwagi stosują się do reakcji przebiegających z rozszczepieniem nukleozydotrójfosforanu na nukleozydodwufosforan i ortofosforan z tą jednak różnicą, że energia swobodna hydrolizy ATP na ADP i P_i jest przypuszczalnie nieco niższa niż energia wydzielająca się podczas rozkładu nukleozydotrójfosforanu na nukleozydomonofosforan i nieorganiczny pirofosforan. Hydroliza pirofosforanu dostarcza dodatkowo pewnej ilości energii (30). Pirofosfataza mogłaby zapewnić utrzymanie stężenia pirofosforanu na niskim poziomie, a tym samym powodowałaby przesunięcie reakcji aktywacji kwasów tłuszczowych w kierunku tworzenia acyloadenylnów.

Rhodes i Mc Elroy (52) wykazali, że energia swobodna hydrolizy wolnego luciferylo-AMP jest zbliżona do wartości uzyskanych dla acetylo-AMP. Dowiedziono ponadto, że istnieje możliwość biologicznej syntezy luciferylo-AMP (52). Webster i Campagnari (74) otrzymali znakowane ^{14}C acetylo- i butyrylo-adenylnany z mieszaniny reakcyjnej zawierającej radioaktywny octan i maślan oraz ATP, jony magnezu i odpowiednie syntetazy. Stosując różnorodne techniki chromatograficzne autorzy ci stwierdzili identyczność otrzymanych acyloadenylnów ze związkami syntetycznymi oraz wykazali, że ich pochodne hydroksamowe mają te same własności (74). Pogląd, że acyloadenylnany są związane z białkiem enzymatycznym poparły doświadczenia Webstera (69), który inkubował ^{14}C -octan, ATP i jony magnezu ze znacznie oczyszczoną syntetazą acetylo-CoA, po czym rozdzielił mieszaninę reakcyjną na kolumnie wypełnionej żelą *Sephadex G-200*. Stwierdził on, że szczyt radioaktywności pokrywał się ze szczytem aktywności enzymu. To samo zjawisko zaobserwował inkubując ^{14}C -acetylo-CoA z AMP w obecności syntetazy acetylo-CoA. Izolując związek, w którym znajdowało się piętno izotopowe stwierdził, że był nim acyloadenylnan (69). Dzięki temu można było uznać, że naturalne acyloadenylnany w układach *in vitro* zachowują się tak samo jak syntetyczne acyloadenylnany (5, 6, 67, 69). Okazało się, że wolny acetylo-AMP jest bardzo wrażliwy, zaś acyloadenylnan związany z syntetazą odporny na hydrolizę deacylazą (EC. 3.1.2.1.) (69). Wykazano ponadto, że działanie deacylasy jest swoiste i inne białka nie chronią acyloadenylnanu przed enzymatyczną hydrolizą (69). Badania te wskazują na zanieczyszczenia deacylazą preparatów syntetazy acetylo-CoA jako na przyczynę niepowodzeń przy otrzymywaniu acyloadenylnów z materiału biologicznego.

II. Enzymy aktywujące kwasy tłuszczowe

Reakcje aktywacji kwasów tłuszczowych są katalizowane przez syntetazy acylo-koenzymu A zwane też ligazami kwasów tłuszczowych (ligazy kwas : CoA (AMP); EC. 6.2.1.). Na podstawie odrębnej swoistości substratowej wyróżniono trzy różne enzymy aktywujące: syntetazę acetylo-koenzymu A (EC. 6.2.1.1.), enzym aktywujący kwasy tłuszczowe o średniej długości łańcucha (EC. 6.2.1.2.) oraz syntetazę aktywującą kwasy tłuszczowe o długim łańcuchu (EC. 6.2.1.3.).

1. Syntetaza acetylo-koenzymu A (EC.6.2.1.1.)

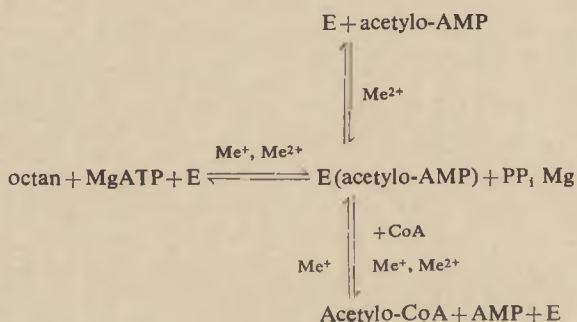
Syntetazę acetylo-koenzymu A katalizującą reakcję 3 otrzymano z drożdży (5), szpinaku i innych roślin (46) oraz z bakterii *Rodospirillum rubrum* (18, 19) i *Streptobacterium plantarum* (17). Spośród syntetaz z narządów ssaków (4, 11, 16, 26, 35, 36, 42, 60, 70) w stanie najbardziej oczyszczonym otrzymano syntetazę z wątroby gołębia (16, 35, 36, 42) oraz enzym z mitochondriów serca wołu (70). Syntetaza acetylo-koenzymu A katalizuje reakcje aktywacji octanu, propionianu i akrylanu wykazując największe powinowactwo do octanu jako substratu (5, 42, 70). Wartości stałej Michaelisa (K_m) dla tych substratów wynoszą: $1,5 \times 10^{-3}M$, $5 \times 10^{-3}M$ i $2,9 \times 10^{-3}M$ (26). Fluorooctan jest także aktywowany, jednak reakcja wymaga znacznie większych stężeń substratu (10). Mrówczan, maślan, kapronian i kaprylan nie są w tych warunkach aktywowane (26). Reakcja wymaga obecności ATP, koenzymu A i jonów magnezu, które zastąpić można jonami manganu (5, 6, 71). GTP i ITP oraz UTP i CTP nie mogą zastąpić ATP w mieszaninie reakcyjnej (5, 6). W obecności równomolowych ilości ATP i jonów magnezu stała równowagi reakcji wynosi około 1. Jones (34) podał wartości od 1,4 do 5,7 z przeciętną wartością 2,7 w pH 7,5 a Hele (26) w pH 7,5 8,0 i 8,5 znalazł wartość stałej równowagi 0,86. Najwyższą aktywność enzymu obserwowano pomiędzy pH 7,2 a 8,5 (5, 6, 35, 70).

Badając wpływ kationów na aktywność znacznie oczyszczonej syntetazy acetylo-CoA z drożdży Evans i wsp. (20) dowiedli, że w reakcji tworzenia acetyloadenyliarów (reakcja 3a) niezbędne są jony magnezu, zaś zbyteczne jednowartościowe kationy. Stwierdzili oni także, że chlorek magnezu w stężeniu 0,01M hamuje tworzenie acyloioestrów (reakcja 3b). Jony potasu, amonu lub rubidu są niezbędne przy tej reakcji, sód i lit nie wywierają na nią wpływu, a cez nieznacznie aktywuje syntetazę. Autorzy ci wysunęli przypuszczenie, że jony potasu wpływają na szybkość rozpadu kompleksu enzym- $CH_3C-AMP-CoA$, lub oddziałują na



centra aktywne uczestniczące w reakcji 3b. Własności aktywujące NH_4^+ ,

Rb⁺ i Cs⁺ wiążą oni ze zbliżoną do K⁺ wielkością uwodnionego jonu, którego promień wynosi około 5Å (20). Podobne wyniki uzyskał Webster (72) badając wpływ kationów na aktywność znacznie oczyszczonej syntetazy acetylo-CoA z mitochondriów serca wołu. Stwierdził on, że jony potasu, amonu i rubidu silnie aktywują enzym, sód i lit aktywują lub hamują enzym zależnie od stężenia, a pojawianie się związanego z enzymem acetyloadenylnanu zależy od dodania kationów jednowartościowych. Jony Mg²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Fe²⁺ i Ca²⁺ są konieczne do enzymatycznej syntezy acetylo-CoA z octanu, ATP i CoA, oraz do tworzenia acetyloadenylnanu z octanu i ATP, natomiast zbędne przy syntezie acetyloadenylnanu z acetylo-CoA i AMP (71). Autor przypuszcza, że jony te potrzebne są do chelatowania ATP i PP_i. Potwierdza to także obserwacja, że stałe Michaelisa dla tych metali (około 0,9 mM) są zbliżone do K_m oznaczonej dla ATP (71). Kationy Fe²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺ i Cu²⁺ aktywują syntezę acetyloadenylnanu zarówno z octanu i ATP jak i acetylo-CoA i AMP, co sugeruje, że uczestniczą one w wiązaniu substratu lub substratów do enzymu. Udział kationów w aktywacji octanu przedstawia schemat 1.



Schemat 1. Udział jonów jedno- i dwuwartościowych w reakcji aktywacji octanu
 Jednowartościowe jony aktywujące (Me⁺): Na⁺, Rb⁺, NH₄⁺, Tris⁺, K⁺, Li⁺ Dwuwartościowe jony aktywujące (Me²⁺): Ni²⁺, F²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ E — syntetaza acetylo-CoA. Według Webstera (73)

2. Syntetaza acylo-koenzymu A (EC.6.2.1.2.)

Syntetaza acylo-CoA katalizuje reakcje aktywacji kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha acylowego. Enzym otrzymano ze szpinaku (46), wątroby wieprza (33), wątroby wołu (44) oraz wątroby i nerki człowieka (47). Syntetaza ta, podobnie jak enzym aktywujący octan, wymaga obecności ATP, jonów magnezu lub manganu i koenzymu A. Aktywność 10-krotnie oczyszczonej syntetazy z wyciągu z „proszków acetonowych” wątroby wołu znajdowano w frakcji elektroforetycznej, stanowiącej około 60% białka preparatu (44). Stała równowagi reakcji

3 wynosi około 1,5 (44). Enzym odznacza się względnie niską swoistością substratową. Aktywuje on kwasy tłuszczowe od C_4 do C_{12} wykazując największe powinowactwo do substratów zawierających 7 i 8 atomów węgla w łańcuchu acylowym (33, 44, 75). Działa również na benzoesan i jego pochodne, fenylooctan, 2,4-dwunitrochlorofenoksyoctan, *p*-amino-fenylooctan, winylooctan, fenylopropionian, cynamonian, nikotynian i szereg kwasów tłuszczowych o rozgałęzionym łańcuchu, a także na hydrokwasy i kwasy nienasycone o średniej długości łańcucha acylowego (33, 37, 44, 56). Stałe Michaelisa (K_m) dla kwasów tłuszczowych o łańcuchu nierozgałęzionym wynoszą od 10^{-4} do $10^{-3}M$. W wyższych stężeniach substratu enzym aktywuje nawet octan ($K_m = 2 \times 10^{-2}M$) (44). Glutathion zredukowany, kwas lipoinowy, semikarbazyd, imidazol, pirydyna, glicyna i cyjanek nie mogą służyć jako akceptory acylu (33).

Nie stwierdzono wyraźnego optimum *pH* działania tego enzymu. Aktywność syntetazy wzrasta między *pH* 7 a 10,5, nie wykazując jednak liniowej zależności od stężenia jonów wodorotlenowych (44).

Badania nad aktywacją kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha acylowego wykazały, że w nieobecności CoA z kwasu tłuszczowego, ATP i hydroksylaminy tworzą się kwas acylohydroksamowy, AMP i nieorganiczny pirofosforan (27, 33, 50). Wskazuje to na występowanie acylo-AMP jako produktu pośredniego. Reakcja hydroksylaminy z aktywowaną grupą acylową (acylo-AMP) prowadziła przynajmniej w części do tworzenia nietrwałych ortoacylohydroksamatów (29). Tłumaczy to rozbieżności pomiędzy wynikami pomiarów aktywności enzymu uzyskiwanych metodą hydroksamową oraz oznaczeniami pirofosforanu, uwalnianego z ATP w przebiegu reakcji. W porównaniu z syntetazą acetylo-CoA aktywność syntetazy acylo-CoA obserwuje się już przy niższych stężeniach hydroksylaminy, a nawet w obecności hydrazyny lub cysteiny, jako akceptorów acylu (33). Dowodzi to, że tworzące się w reakcji acyloadenylany wchodzi w reakcję z hydroksylaminą łatwiej niż acetylo-AMP.

Obok adenylanów kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha acylowego donatorami acylu dla koenzymu A, jak również adenylanu dla pirofosforanu mogą być: propionylo-, butyrylo-, kapronylo-, benzoilo-, fenacetylo-, a nawet acetylo-AMP (33, 37, 39, 40, 47, 48, 62).

W obecności kwasów tłuszczowych i syntetazy radioaktywny pirofosforan wymieniał piętno izotopowe z ATP. Wymianę znakowanego pirofosforanu z ATP obserwowano nawet w nieobecności substratów syntetazy, lecz kwasy tłuszczowe w stężeniach mikromolowych pobudzały reakcję wymiany izotopowej, a w stężeniach milimolowych wyraźnie ją hamowały (33, 39). Hydroksylamina znosi stymulujący wpływ kwasów tłuszczowych na wymianę izotopową. Nieorganiczny ortofosforan, ADP i AMP silnie hamują wymianę (44). Dializa preparatu, względnie traktowanie wersenianem, powoduje znaczne obniżenie aktywności synteta-

zy. Aktywność można przywrócić przez dodanie jonów magnezu (44). Enzym jest aktywowany przez związki tiolowe, a hamowany przez N-etylomaleimid, kwas jodoctowy i PCMB (33).

3. Syntetaza acylo-koenzymu A (EC.6.2.1.3)

Ta syntetaza acylo-CoA katalizuje reakcje aktywacji kwasów tłuszczowych o długim łańcuchu, zarówno nasyconych jak i nienasyconych. Enzym otrzymano z bakterii *Bacillus megaterium* (45), z mikrosomów wątroby świnki morskiej i szczura (38), mitochondriów wątroby tych zwierząt (67), mikrosomów jelit szczura (57), tkanki tłuszczowej szczura (59) oraz tętnicy głównej świni domowej (63). Nie udało się jednak oczyścić tej syntetazy (1, 38, 58, 59, 63). Enzym wykazuje największe powinowactwo do palmitynianu jako substratu (38, 57, 63). Aktywacja palmitynianu wymaga ATP, jonów magnezu i CoA. ATP nie można zastąpić GTP lub ITP, ani ADP i AMP (63). Te ostatnie, dodane do mieszaniny reakcyjnej zawierającej ATP, silnie hamują aktywność syntetazy palmitylo-CoA (63). Podobnie jak syntetaza acylo-CoA (EC.6.2.1.2), ligaza palmitylo-CoA jest aktywowana przez związki tiolowe, a hamowana przez kwas jodoctowy i PCMB (63). Wskazuje to na rolę grup-SH w czynności katalitycznej enzymu.

Do niedawna uważano, że enzymatyczna aktywacja długołańcuchowych kwasów tłuszczowych przebiega analogicznie do aktywacji octanu. Obserwowano bowiem syntezę palmitylo-CoA z palmitylo-AMP i CoA, tworzenie ATP z palmityloadenylnu i pirofosforanu, a także wymianę ^{32}P między pirofosforanem a ATP (7, 8, 67). Dowodzi to, że palmitylo-AMP jest produktem pośrednim reakcji. Udowodniono jednak, że uczestniczący w reakcji koenzym A jest związany z enzymem, czego nie obserwowano w reakcjach aktywacji octanu i kwasów tłuszczowych o średniej długości łańcucha. Bar-Tana i Shapiro (1) badając aktywację palmitynianu przez enzym z mikrosomów wątroby szczura wykazali, że najpierw tworzy się związek enzym-koenzym A, który następnie reaguje z palmitylo-AMP tworząc kompleks enzym-koenzym A-palmitylo-AMP.

Nowe światło na mechanizm aktywacji palmitynianu rzuciła także praca Farstada (21), który w supernatancie po odwirowaniu mikrosomów z różnych narządów szczura znalazł termolabilny czynnik stymulujący syntezę palmitylo-CoA z mitochondriów wątroby tego zwierzęcia. Autor sugeruje, że czynnikiem tym jest enzym-kinaza, katalizujący przy udziale ATP fosforylację nieczynnej postaci syntetazy palmitylo-CoA i przeprowadzenie jej w formę aktywną.

Rao i Johnston (49, 50) postulują, że związkiem pośredniczącym w syntezie trójglicerydów z palmitylo-CoA i monoglicerydu jest „związany CoA” (ang. *bound CoA*). Związek ten ma być zara-

zem akceptorem acylu z palmitylo-CoA i donatorem acylu dla monoglicerydu. Zauważono uderzające podobieństwo własności tego związku do otrzymanego wcześniej peptydu nazwanego białkowym nośnikiem acylu (ang. *acyl carrier protein*) (49, 50). Na podstawie badań nad syntezą trójglicerydów w homogenatach śluzówki jelita cienkiego chomika Rao i Johnston (51) postulują, że proces ten katalizowany jest przez „syntetazę trójglicerydową” która stanowi kompleks enzymów. W skład kompleksu wchodzić mają: „związany CoA”, syntetaza palmitylo-CoA oraz transferazy mono- i dwuglicerydowe (EC. 2.1.3). Rozdział częściowo oczyszczonej „syntetazy trójglicerydowej” na żelu poliakrylamidowym wykazał, że składa się ona z czterech białek. Nie udało się jednak rozdzielić aktywności enzymów — składników kompleksu ani na kolumnach wypełnionych żelem *Sephadex G-200*, *DEAE-Sephadex* i *CM-Sephadex*, ani za pomocą chromatografii na kolumnach z *DEAE*-celulozy i *CM*-celulozy. Aktywność enzymów znacznie zmniejszała się, gdy na oczyszczonej „syntetazę trójglicerydową” podziało dezoksychohanem sodu lub detergentami *Tween-80* i *Triton X-100* (51). Należałoby więc sądzić, że pod wpływem detergentów, a także rozdziału na kolumnach z wymieników jonowych i żelu *Sephadex* zachodzi „dysocjacja” wieloenzymowego kompleksu „syntetazy trójglicerydowej”, pociągająca za sobą utratę aktywności enzymów, składników kompleksu.

III. Aktywacja kwasów tłuszczowych przy udziale związków pośrednich tlenowej fosforylacji

Na możliwość aktywacji kwasów tłuszczowych bez udziału nukleozydotrójfosforanów zwrócili uwagę Wojtczak i wsp. (78, 79). Oparli się oni na spostrzeżeniu, że utlenianie kwasów tłuszczowych oraz ich wbudowywanie do fosfolipidów w nieobecności ATP niezależne było od funkcjonowania systemu oksydacyjnej fosforylacji. Badając wpływ inhibitorów oddychania tkankowego i tlenowej fosforylacji na utlenianie kwasów tłuszczowych w mitochondriach wątroby szczura zauważyli, że w nieobecności ATP proces ten był hamowany przez cyjanek, lecz nie był blokowany przez inhibitory tlenowej fosforylacji oligomycynę i azydek, zaś hamujące działanie dwunitrofenolu (DNP), który jest aktywatorem ATP-azy, było bardzo słabe. Autorzy ci przypuszczają, że w przypadku zablokowania produkcji ATP oligomycyną lub azydkiem powstaje niefosforylowany produkt pośredni tlenowej fosforylacji. Reaguje on z kwasem tłuszczowym dając jego „aktywne” wysokoenergetyczne połączenie. System ten mógłby umożliwiać produkcję „aktywnych” kwasów tłuszczowych bez udziału nukleozydotrójfosforanów.

W piśmiennictwie istnieją sprzeczne opinie o występowaniu tego systemu w mitochondriach wątroby szczura. Van den Bergh (65)

reprezentuje pogląd, że w mitochondriach istnieją tylko dwa układy aktywujące kwasy tłuszczowe: układ wykorzystujący ATP oraz układ, w którym aktywacja przebiega z rozszczepieniem GTP na GDP i nieorganiczny ortofosforan. Zdaniem tego autora wysokoenergetyczne pośredniki oksydacyjnej fosforylacji nie mogą aktywować kwasów tłuszczowych w mitochondriach wątroby szczura (66). Opisany przez Wojtczaka i współpracowników układ niewrażliwy na oligomycynę i słabo oddziaływający na dwunitrofenol jest całkowicie zależny od funkcjonowania cyklu kwasów trójkarboksylowych. Ponadto jest on hamowany przez małe stężenia arsenianów, które rozprzegają zależną od α -ketoglutaranu fosforylację substratową GDP (54). Dodatkowym faktem, który mógłby wskazywać, że układ mało wrażliwy na DNP jest identyczny z układem z mitochondriów wątroby aktywującym kwasy tłuszczowe z udziałem GTP (24, 55), było blokowanie niewrażliwego na DNP systemu aktywującego kwasy tłuszczowe przez ortofosforan.

Pewne jednak badania potwierdzają hipotezę Wojtczaka i wsp.. Beattie i Basford (2) dowiedli, że w mitochondriach mózgu nie występuje układ aktywujący kwasy tłuszczowe z udziałem GTP. Pomimo to zachodziło utlenianie kwasów tłuszczowych w nieobecności ATP przy równoczesnym zablokowaniu tlenowej fosforylacji oligomycyną. Autorzy sądzą, że system aktywujący kwasy tłuszczowe, w którym uczestniczą pośredniki tlenowej fosforylacji odgrywa w komórce znacznie mniejszą rolę niż system zużywający ATP i jest uruchamiany wtedy, gdy brakuje nukleozydotrójfosforanów lub gdy ich synteza jest upośledzona.

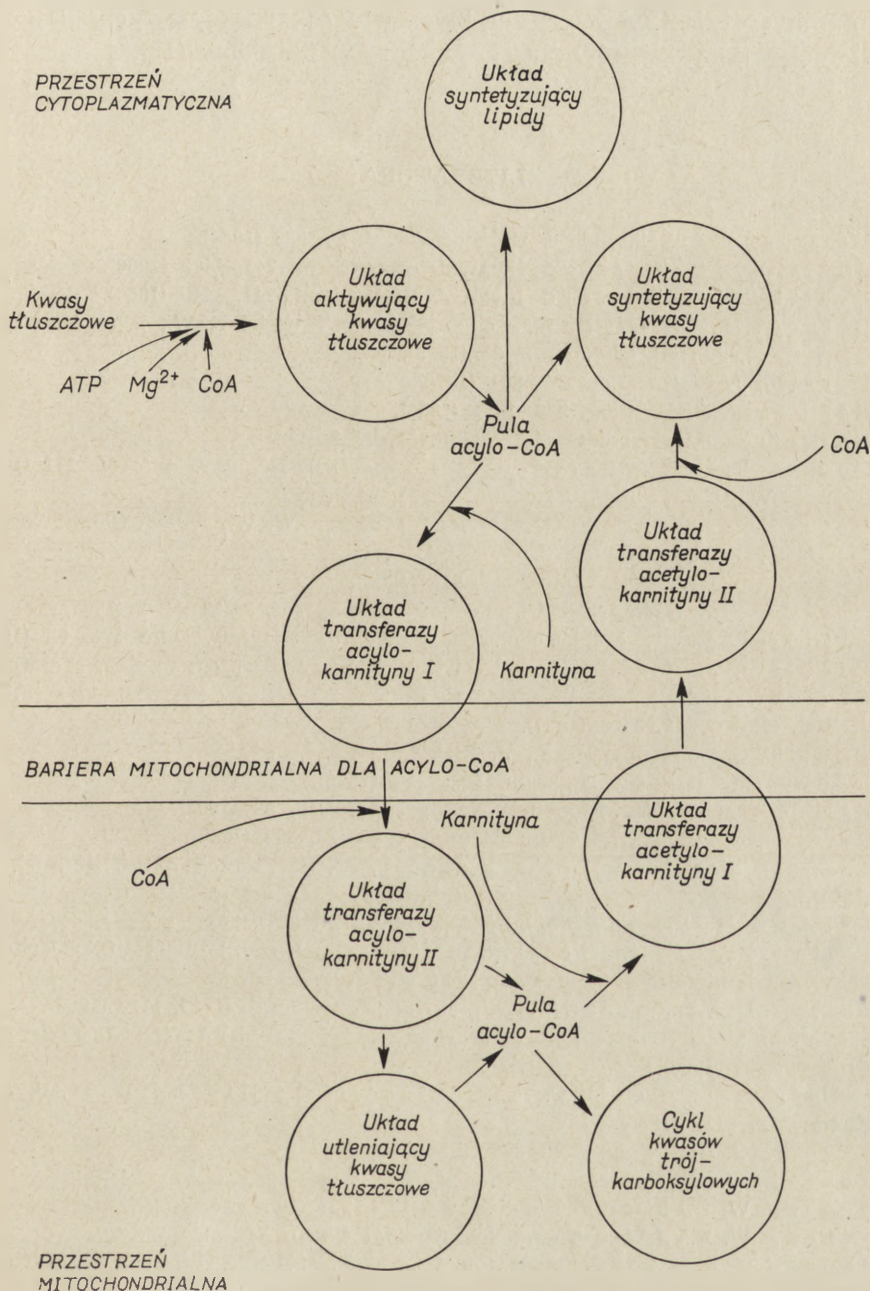
Omawiany wyżej mechanizm aktywacji kwasów tłuszczowych oraz ich włączania w szlaki metaboliczne nie ma uniwersalnego charakteru. Okazało się, że kwasy tłuszczowe aktywowane w mitochondriach mózgu przez wysokoenergetyczne związki pośrednie tlenowej fosforylacji nie mogą zostać wbudowane do fosfolipidów (3).

W przeciwieństwie do systemu z mitochondriów wątroby (79) wbudowywanie kwasów tłuszczowych do fosfolipidów w mitochondriach mózgu wymaga obecności ATP i CoA. Nukleotydy te nie są natomiast potrzebne do utleniania kwasów tłuszczowych (3). Wyniki tych badań nasuwają przypuszczenie o istnieniu alternatywnej drogi utleniania kwasów tłuszczowych bez udziału acylo-CoA i sugerują, że acyltioestry nie muszą brać udziału w obu procesach tj. w oksydacji kwasów tłuszczowych i syntezie lipidów.

IV. Rola acyltioestrów w metabolizmie komórki

Produktem reakcji aktywacji kwasów tłuszczowych są wybitnie reaktywne tiolowe estry acylów, odgrywające ważną rolę w metabolizmie komórki. Główne drogi metabolizmu tioestrów przedstawia schemat 2.

Najprostszy tioester, acetylo-CoA, może ulegać spalaniu w cyklu kwasów trójkarboksylowych, lub może być wykorzystany do syntezy kwasów tłuszczowych (43, 68) i cholesterolu (14). Wyższe acylotioestry są ważnymi metabolitami pośrednimi na drodze syntezy trójglicerydów i fosfolipidów



Schemat 2. Metabolizm acylotioestrów w komórce

(38, 43) oraz oksydacji kwasów tłuszczowych (43). Uczestniczą one w transporcie acylu przez błonę mitochondrialną (22, 23), a także jak dowiodły badania najnowsze, stanowią metaboliczne regulatory przemian lipidów (9, 12, 13, 15, 64, 77). Spośród różnorodnych funkcji, jakie spełniają wyższe acylotioestry koenzymu A w komórce wymienić należy regulację utleniania acetylo-CoA w cyklu kwasów trójkarboksylowych (61) oraz regulację syntezy kwasów tłuszczowych (77) i lipidów (13).

LITERATURA

1. Bar-Tana J., Shapiro B., *Biochem. J.* **93**, 533 (1964).
2. Beattie D. S., Basford R. E., *J. Biol. Chem.* **241**, 1412 (1966).
3. Beattie D. S., Basford R. E., *J. Biol. Chem.* **241**, 1419 (1966).
4. Beinert H., Green D. E., Hele P., Von Korff R. W., Ramakrishnan C. V., *J. Biol. Chem.* **203**, 35 (1953).
5. Berg P., *J. Biol. Chem.* **222**, 991 (1956).
6. Berg P., *J. Biol. Chem.* **222**, 1051 (1956).
7. Borgström B., *Acta Chem. Scand.* **12**, 1533 (1958).
8. Borgström B., Wheeldon L. W., *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 171 (1961).
9. Bortz W., Lynen F., *Biochem. Z.* **337**, 505 (1963).
10. Boyer P. D., Koeppe O. J., Luchsinger W. W., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 356 (1956).
11. Brady R. O., *J. Biol. Chem.* **217**, 213 (1955).
12. Brandes R., Shapiro B., *Biochim. Biophys. Acta* **137**, 202 (1967).
13. Brindley D. N., Hübscher G., *Biochim. Biophys. Acta* **125**, 92 (1966).
14. Brodie J. D., Wasson G., Porter J. W., *J. Biol. Chem.* **293**, 1346 (1964).
15. Butterworth P. H. W., Yang P. C., Bock R. M., Porter J. W., *J. Biol. Chem.* **242**, 3508 (1967).
16. Chou T. C., Lipmann F., *J. Biol. Chem.* **196**, 89 (1952).
17. Dann O., Sucker H., *Ann.* **601**, 216 (1956).
18. Eisenberg M. A., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 56 (1955).
19. Eisenberg M. A., *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 327 (1957).
20. Evans H. J., Clark R. B., Russel S. A., *Biochim. Biophys. Acta* **92**, 582 (1964).
21. Farstad M., *Biochim. Biophys. Acta* **146**, 272 (1967).
22. Fritz I. B., w *Advances in Lipid Research*, tom I, red. R. Paoletti, D. Kritchevsky, Academic Press, New York 1963, str. 319.
23. Fritz I. B., Marquis N. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 1126 (1966).
24. Galzigna L., Rossi C. R., Sartorelli L., Gibson D. M., *Federation Proc.* **25**, 339 (1966).
25. Galzigna L., Rossi C. R., Sartorelli L., Gibson D. M., *J. Biol. Chem.* **242**, 2111 (1966).
26. Hele P., *J. Biol. Chem.* **206**, 271 (1954).
27. Jencks W. P., *Federation Proc.* **12**, 703 (1953).
28. Jencks W. P., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 227 (1957).
29. Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4581 (1958).
30. Jencks W. P., w *The Enzymes*, tom VI, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, Academic Press, New York, 1960, str. 373.
31. Jencks W. P., w *Methods in Enzymology*, tom V, red. S. P. Colowick, N. O.

- Kaplan, Academic Press, New York, 1962, str. 467.
32. Jencks W. P., Cordes S., Carriuolo J., *J. Biol. Chem.* **235**, 3608 (1960).
 33. Jencks W. P., Lipmann F., *J. Biol. Chem.* **225**, 207 (1957).
 34. Jones M. E., *Federation Proc.* **12**, 708 (1953).
 35. Jones M. E., Black S., Flynn R. M., Lipmann F., *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 141 (1953).
 36. Jones M. E., Lipmann F., Hiltz H., Lynen F., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 3285 (1953).
 37. Kellerman G. M., *J. Biol. Chem.* **231**, 427 (1958).
 38. Kornberg A., Pricer W. E. Jr., *J. Biol. Chem.* **204**, 329 (1953).
 39. Lee Peng C. H., *Biochim. Biophys. Acta* **22**, 42 (1956).
 40. Lehninger A. L., Greville G. D., *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 188 (1956).
 41. Lipmann F., *J. Biol. Chem.* **115**, 55 (1944).
 42. Lipmann F., Jones M. E., Black S., Flynn R. M., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2384 (1952).
 43. Lynen F., w Annual Review of Biochemistry, tom 24, Annual Reviews Inc., Palo Alto 1955, str. 653.
 44. Mahler H. R., Wakil S. J., Bock R. M., *J. Biol. Chem.* **204**, 453 (1953).
 45. Massaro E. J., Lennartz W. J., *Biochemistry* **4**, 85 (1965).
 46. Millerd A., Bonner J., *Arch. Biochem. Biophys.* **49**, 343 (1954).
 47. Moldave K., Meister K., *J. Biol. Chem.* **229**, 463 (1957).
 48. Moyed H. S., Lipmann F., *J. Bacteriol.* **73**, 117 (1957).
 49. Rao G. A., Johnston J. M., *Biochim Biophys. Acta* **125**, 465 (1966).
 50. Rao G. A., Johnston J. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 694 (1966).
 51. Rao G. A., Johnston J. M., *Biochim. Biophys. Acta* **144**, 25 (1967).
 52. Rhodes W. C., Mc Elroy W. D., *J. Biol. Chem.* **233**, 1328 (1964).
 53. Rossi C. R., Gibson D. M., *J. Biol. Chem.* **238**, 1694 (1964).
 54. Sanadi D. R., Gibson D. M., Ayengar P., Qellet P., *Biochim. Biophys. Acta* **13**, 146 (1954).
 55. Sartorelli L., Galzigna L., Rossi C. R., Gibson D. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **26**, 90 (1967).
 56. Schachter D., Taggart J. W., *J. Biol. Chem.* **208**, 263 (1954).
 57. Senior J. R., Isselbacher K. J., *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 399 (1960).
 58. Shapiro B., w Annual Review of Biochemistry, tom 36, Annual Reviews Inc., Palo Alto, 1967, str. 247.
 59. Shapiro B., Chowes I., Rose G., w Biochemical Problems of Lipids, Butterworth, Londyn 1955, str. 347.
 60. Smith R. M., Russel C. R., *Biochem. J.* **102**, 39c (1967).
 61. Taketa K., Pogell B. M., *J. Biol. Chem.* **241**, 720 (1966).
 62. Talbert P. T., Huennekens F. M., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4671 (1956).
 63. Trzeciak W. H., *Ann. Med. Section Pol. Acad. Sci.* w druku.
 64. Valentine R. C., Wolfe R. S., *J. Biol. Chem.* **235**, 1948 (1960).
 65. Van den Bergh S. G., *Biochim. Biophys. Acta* **96**, 517 (1965).
 66. Van den Bergh S. G., *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 442 (1965).
 67. Vignalis P., Zabin J., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 263 (1958).
 68. Wakil S. J., Pugh E. L., Sauer F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 106 (1964).
 69. Webster L. T. Jr., *J. Biol. Chem.* **238**, 4010 (1963).
 70. Webster L. T. Jr., *J. Biol. Chem.* **240**, 4158 (1965).
 71. Webster L. T. Jr., *J. Biol. Chem.* **240**, 4164 (1965).
 72. Webster L. T. Jr., *J. Biol. Chem.* **241**, 5504 (1966).
 73. Webster L. T. Jr., *J. Biol. Chem.* **242**, 1232 (1967).
 74. Webster L. T. Jr., Campagnari F., *J. Biol. Chem.* **237**, 1050 (1962).

75. Webster L. T. Jr., Gerowin L. D., Rakita L., *J. Biol. Chem.* **240**, 29 (1965).
76. Whitehouse M., Moeski H., Gurin S., *J. Biol. Chem.* **226**, 813 (1957).
77. Wieland O., Weiss L., Eger-Neufeldt J., *Biochem. Z.* **339**, 501 (1964).
78. Wojtczak L., Proc. 6th Internatl. Congr. Biochem., New York, tom 10, 1964, str. 793.
79. Wojtczak L., Załuska H., Drahotá Z., *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 8 (1965).

STANISŁAW LEWAK *

Flawonoidy głogu

The Flavonoids of Hawthorn

Flavones, flavonols, their O- and C-glycosides as well as flavan derivatives present in hawthorn tissues are reviewed. Biosynthetic and chemotaxonomic conclusions of the studies on hawthorn flavonoids are pointed out.

Głóg (*Crataegus L.*) jest rośliną krzewiastą, występującą powszechnie w strefie klimatu umiarkowanego. Rośnie on w stanie dzikim zasiedlając pobocza lasów i poręby, zbocza i nieużytki, a również jest uprawiany jako roślina ozdobna. Na terenie Europy znanych jest pięć gatunków głogu, a mianowicie głóg jednoszyjkowy (*Cr. monogyna Jacq.*), głóg dwuszyjkowy (*Cr. oxyacantha L.*), głóg odgiętoszyjkowy (*Cr. curvisepala Lindm.*), głóg prostokielichowy (*Cr. calycina peterm.*) i głóg Palmstrucha (*Cr. Palmstruchii Lindm.*) jak również mieszańce niektórych tych gatunków.

Pospolitość występowania głogu oraz fakt, że zarówno medycyna ludowa jak i coraz częściej medycyna farmakopealna stosuje wyciągi z różnych organów tej rośliny w lecznictwie chorób wieńcowych i jako składnik leków sedatywnych (18, 37), spowodowały w latach 50-tych naszego stulecia wzmożone zainteresowanie związkami występującymi w głogu. Badania nad nimi prowadzono głównie w laboratoriach niemieckich i szwajcarskich, toteż uzyskane dane dotyczą liści, kwiatostanów i owoców gatunku najpowszechniej występującego na tych terenach, to znaczy *Crataegus oxyacantha* (4, 5, 41, 47). Prowadzone równolegle prace nad właściwościami farmakologicznymi wyodrębnianych związków zdawały się początkowo wskazywać, że aktywnych składników należy się spodziewać wśród kwasów trójterpenowych i ich pochodnych (37, 38, 42). Dopiero w latach 1954—55 Dorner i Kuschke (8), oraz Lübers i Kuschke (29) wykazali przekonująco brak działania leczniczego kwasów trójterpenowych wydzielonych z głogu. Natomiast badania związków fenolowych wyodrębnionych z tej samej rośliny wyraźnie wskazy-

* Doc. dr, Katedra Fizjologii Roślin, Uniwersytet Warszawski, Warszawa.

wały na czynność farmakologiczną takich składników jak antocyjany (43), glikozydy flawonowe (6), leukoantocyjany (10) czy (—) epikatechina (39). Prace te pozwoliły na stwierdzenie hypotensyjnego i inotropowo dodatniego działania kardiologicznego flawonoidów głogu. Poszczególne związki tej grupy posiadają wyraźne działanie detoksykacyjne w stosunku do digitoksyny, akonityny, chloroformu, etanolu i metanolu. Frakcja leukoantocyjanów wywiera działanie uspokajające znosząc pokoinowe pobudzenie ruchowe.

Badania nad działaniem leczniczym poszczególnych flawonoidów głogu prowadzone są do chwili obecnej (np. 34, 40). Nie pozwoliły one jeszcze na jednoznaczne wskazanie związku warunkującego czynność farmakologiczną preparatów z tej rośliny. Im jednak zawdzięczamy wszechstronne poznanie w ostatnich kilkunastu latach flawonoidów zawartych w głogu.

Badania nad flawonoidami głogu zostały zapoczątkowane w roku 1896 wykryciem kwercetyny w kwiatostanach *Crataegus oxyacantha* przez Perkin a i Hummela (33), którzy już wtedy sugerowali, że flawonol ten występuje w roślinie w postaci glikozydu. Przepuszczenie to potwierdziła dopiero po niemal 60-ciu latach Fiedler (12), która wyodrębniła z kwiatów, liści i owoców tego samego gatunku głogu glikozyd kwercetyny zidentyfikowany jako hyperozyd (3-galaktozyd kwercetyny). Autorka wykazała obecność w tych samych organach głogu również i wolnego aglikonu — kwercetyny (21).

Dalsze badania doprowadziły do wykrycia w tkankach głogu 15 różnych flawonów i flawonoli oraz ich pochodnych. Zestawienie tych połączeń znajduje się w tablicy 1. Kwercetyna jest jedynym flawonolem występującym w postaci wolnej, zresztą w stosunkowo bardzo małych ilościach. Pozostałe związki są O- lub C-glikozydowymi pochodnymi kwercetyny, apigeniny lub luteoliny. Zwracają uwagę różnice w składzie kompletu flawonoidów poszczególnych odmian głogu. Najlepiej poznane zostały flawonoidy dwóch gatunków: *Crataegus oxyacantha*, głównie dzięki pracom badaczy niemieckich (12, 16, 17, 21) i *Crataegus curvisepala* — w wyniku badań ośrodka charkowskiego (2, 3). Liście pierwszej z tych odmian zawierają siedem różnych pochodnych flawonoidowych, a liście drugiej — osiem. Tylko trzy związki — kwercetynę, hyperozyd i kwercytrynę wykryto w obu gatunkach, a i to obecność kwercytryny w *Cr. oxyacantha* jest kwestionowana przez Kranen-Fiedler (21).

We wszystkich badanych gatunkach głogu stwierdzono obecność glikozydów kwercetyny, natomiast skład glikozydów flawonowych wykazuje charakterystyczne różnice w zależności od gatunku. O-glikozydy apigeniny (7-glukozyd i 7-ramnozyd) oraz luteoliny (7-glukozyd) wykryto wyłącznie w liściach *Crataegus curvisepala*, natomiast C-glikozydy apigeniny są prawdopodobnie rozpowszechnione szerzej w obrębie rodzaju *Crataegus*. Witeksynę i jej pochodne glikozydowe powstałe przy udziale fenolowych grup hydroksylowych reszty apigeniny (4'-ramnozyd,

4'-ramnoglukozyd i 4',7-dwuglukozyd) wykryto wyłącznie w tkankach *Cr. oxyacantha*. W gatunku tym nie występuje natomiast kratenacyna i dezacetylokratenacyna, które są biozydami apigeniny (C-ramnozyloglukozydami).

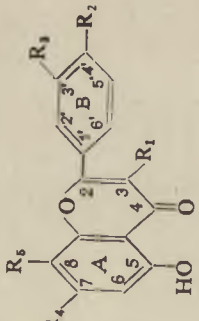
Reakcje glikozylacji stanowią ostatnie etapy biosyntezy glikozydów flawonoidowych (1, 19). Wydaje się, że w przypadku antocyjanów i flawonoli podstawienie resztą cukrową grupy hydroksylowej w pozycji 3 jest warunkiem dalszej glikozylacji grup fenolowych (44). Badania przeprowadzone na roślinach rodzaju *Streptocarpus*, *Vitis*, *Antirrhinum*, *Phaseolus*, *Prunus* i innych (1, 35) wskazują, że przekształceniem monoglikozydów w dwuglikozydy kieruje pojedynczy gen, podczas gdy powstanie biozydu może wymagać aktywności dwóch genów komplementarnych (19). Wydaje się prawdopodobnym, że wprowadzenie określonych reszt cukrowych w poszczególne pozycje układu flawonoidu jest uwarunkowane aktywnością pojedynczych genów.

Przegląd glikozydów kwercetyny zawartych w różnych gatunkach głogu (tablica 1) wskazuje, że żaden z dotychczas badanych gatunków nie jest zdolny do glikozylacji fenolowych grup hydroksylowych kwercetyny. Rośliny dwóch gatunków (*Cr. oxyacantha* i *Cr. curvisepala*) mogą syntetyzować 3-galaktozyd i 3-ramnozyd kwercetyny, dwóch innych (*Cr. pyracantha* i *Cr. monogyna*) — 3-ramnozyloglukozyd, a tylko jeden gatunek (*Cr. monogyna*) jest w stanie produkować 3-ramnozylogalaktozyd kwercetyny.

Pomimo, że drogi biosyntezy C-glikozydów flawonowych nie są tak dobrze poznane jak O-glikozydów tej samej grupy (11) prawdopodobna wydaje się następująca kolejność ich powstawania w roślinie: a) synteza układu flawonoidowego, b) C-glikozylacja i c) O-glikozylacja. Dane tablicy 1, aczkolwiek niepełne, zdają się wskazywać, że zdolność O-glikozylacji flawonów (apigeniny i luteoliny) posiada jedynie gatunek *Crataegus curvisepala*. C-glikozylacja apigeniny (przekształcenie jej w witeksynę) w tkance *Crataegus curvisepala* uniemożliwia przyłączanie reszt cukrowych do fenolowych grup wodorotlenowych flawonu. W tym gatunku głogu stwierdzono tylko C-biozydy apigeniny (kratenacynę i dezacetylokratenacynę) natomiast brak O-glikozydów. Inaczej przedstawiają się następstwa C-glikozylacji u gatunku *Crataegus oxyacantha*. Wydaje się, że dopiero powstanie C-glikozydu umożliwia przyłączanie reszt cukrowych do grup fenolowych flawonu. Wskazuje na to wykrycie w tym gatunku trzech różnych O-glikozydów witeksyny, a brak O-glikozydów apigeniny.

Brak jest danych o składzie flawonów i flawonoli mieszańców różnych gatunków głogu. Umożliwiłyby one wnioskowanie nie tylko o genetycznych uwarunkowaniach biosyntezy poszczególnych związków, lecz również o wartości poszczególnych flawonoidów jako znaczników chemotaksonomicznych w obrębie rodzaju *Crataegus*.

Flawony, flawonole i ich glikozydy wykryte w głogu

I 	Związek	Odmiana głogu	Pozycja literatury
<p>a. $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$ $R_5 = \text{H}$</p> <p>b. $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$ $R_1 = \beta\text{-O-D-galaktopyranozył}$ $R_5 = \text{H}$</p> <p>c. $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$ $R_1 = \alpha\text{-O-L-ramnozył}$ $R_5 = \text{H}$</p> <p>d. $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$ $R_1 = \alpha\text{-O-L-ramnozył}$ $R_5 = \text{H}$</p> <p>e. $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$ $R_1 = \alpha\text{-O-L-ramnozył}$ $R_5 = \text{H}$</p> <p>f. $R_1 = R_3 = R_5 = \text{H}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_4 = \beta\text{-O-D-glukofuranozył}$</p> <p>g. $R_1 = R_3 = R_5 = \text{H}$ $R_2 = \text{OH}$ $R_4 = \alpha\text{-O-L-ramnofuranozył}$</p>	<p>Kwercetyna 3', 4', 5, 7, czterohydroksyflawonol Hyperozyd 3-β-O-D-galaktopyranozyd kwercetyny</p> <p>3-rutinyzyd kwercetyny</p> <p>3-ramnozylogalaktozyd kwercetyny</p> <p>Kwercetyna 3-α-O-L-ramnopyranozyd kwercetyny</p> <p>Komosyna 7-β-O-D-glukofuranozyd apigeniny</p> <p>7-α-O-L-ramnofuranozyd apigeniny</p>	<p><i>Cr. ocyacantha</i> <i>Cr. curvisepala</i> <i>Cr. ocyacantha</i> <i>Cr. curvisepala</i></p> <p><i>Cr. pyracantha</i> <i>Cr. monogyna</i></p> <p><i>Cr. monogyna</i></p> <p><i>Cr. ocyacantha</i> <i>Cr. curvisepala</i></p> <p><i>Cr. curvisepala</i></p> <p><i>Cr. curvisepala</i></p>	<p>21, 33 3 12, 24 3</p> <p>32 14</p> <p>14</p> <p>16 3</p> <p>3</p> <p>3</p>

Tablica 1 (c.d.)

h. $R_1 = R_5 = H$ $R_2 = R_3 = OH$ $R_4 = \beta\text{-O-D-glukopyranozylo}$	<i>Cr. curvisepala</i>	3
i. $R_1 = R_3 = H$ $R_2 = R_4 = OH$ $R_5 = \beta\text{-C-D-glukopyranozylo}$	<i>Cr. oxyacantha</i>	21
j. $R_1 = R_3 = H$ $R_2 = \alpha\text{-O-L-ramnozylo}$ $R_4 = OH$	<i>Cr. oxyacantha</i>	17, 21, 24
k. $R_1 = R_3 = H$ $R_2 = \alpha\text{-O-L-ramnozylo-}\beta\text{-O-D-glukozylo}$ $R_4 = OH$	<i>Cr. oxyacantha</i>	24
l. $R_1 = R_3 = H$ $R_2 = R_4 = \beta\text{-O-D-glukozylo}$ $R_5 = \beta\text{-C-D-glukopyranozylo}$	<i>Cr. oxyacantha</i>	24
m. $R_1 = R_3 = H$ $R_2 = R_4 = OH$ $R_5 = \beta\text{-C-(6'-O-acetylo, 4-\alpha\text{-O-L-ramnoopyranozylo)-D-}$ $\text{-D-glukopyranozylo}$	<i>Cr. curvisepala</i>	2, 3
n. $R_1 = R_3 = H$ $R_2 = R_4 = OH$ $R_5 = \beta\text{-C-(4'-}\alpha\text{-O-L-ramnoopyranozylo)-D-}$ glukopyranozylo	<i>Cr. curvisepala</i>	3
o. $R_1 = R_3 = H$ $R_2 = \alpha\text{-O-L-ramnozylo}$ $R_4 = OH$ (O-acetyl) $R_5 = \beta\text{-C-D-glukopyranozylo}$	<i>Cr. monogyna</i>	13

7- β -O-D-glukopyranozyd luteoliny

Witekasyne

8- β -C-D-glukopyranozyd apigeniny

4'-ramnozyd witekasyne

4'-ramnozyloglukozyd witekasyne

4',7-dwuglukozyd witekasyne

Kratenacyne

6-O-acetylo-4'- α -O-L-ramnoopyrano-
zylowitekasyne

Dezacylokratenacyne

acetylo-4'-ramnozyd witekasyne

Flawony, flawonole i ich glikozydy nie są jedynymi flawonoidami tkanek głogu. Płatki kwiatów niektórych gatunków, a owoce wszystkich zawierają barwniki antocyjanowe, których budowa niemal nie była dotychczas badana. Wiadomo tylko, że podstawowy barwnik owoców głogu *Cr. oxyacantha* jest glikozydem pelargonidyny (28). Wszystkie dotychczas badane organy głogu, a więc liście, owoce, kwiatostany i drewno zawierają pochodne flawanu: katechiny, leukoantocyjany i wielko-cząsteczkowe połączenia tej grupy o charakterze garbników skondensowanych.

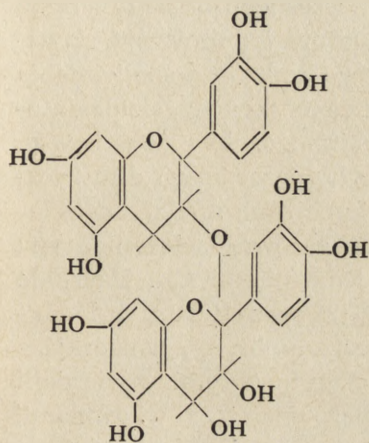
(—) Epikatechina jest jedynym flawanolem i jedyną prostą, to znaczy zbudowaną z trójpierścieniowego, piętnastowęglowego szkieletu pochodną flawanu znaną w głogu. Pozostałe połączenia tej grupy są związkami dimerycznymi, złożonymi z dwóch jednostek flawanowych, bądź też związkami wielko-cząsteczkowymi, w których skład wchodzi wiele układów C_{15} . Zarówno w strukturze dimerów jak i polimerów flawanowych głogu obok układów leukoantocyjanowych (flawandiole, flawantriole lub flawanonole) mogą występować jednostki (—)epikatechiny.

Na obecność związku o charakterze leukoantocyjanu w wyciągach z kwiatostanów głogu zwrócono uwagę po raz pierwszy w roku 1958 (10), stwierdzając równocześnie czynność farmakologiczną tego związku. Dalsze prace nad strukturą tego typu połączeń i nad ich rozmieszczeniem w roślinie były prowadzone przez dwa ośrodki: laboratorium K. Weinges a w Heidelbergu i przez naszą pracownię. W obu pracowniach przedmiotem badań były leukoantocyjany zawarte w tym samym gatunku głogu — *Crataegus oxyacantha*.

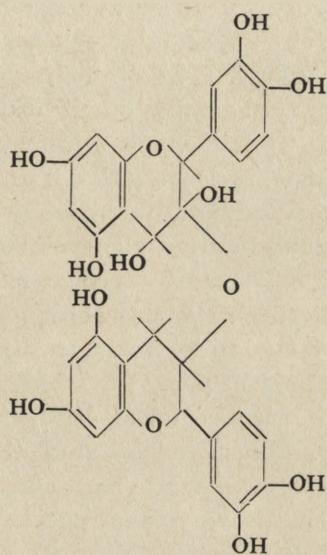
Prace nad strukturą garbników skondensowanych są znacznie mniej zaawansowane niż badania nad innymi naturalnymi związkami wielko-cząsteczkowymi jak białka, kwasy nukleinowe czy ligniny. Przyczyną tego są większe trudności metodyczne a także fakt, że rola biologiczna tych połączeń w organizmie roślinnym ciągle nie jest jeszcze wyjaśniona. Uzyskane dotychczas dane wskazują, że garbniki skondensowane tworzą przestrzenne struktury złożone z jednostek hydroksyflawanowych połączonych różnego typu wiązaniami (20). O charakterze tych wiązań można wnioskować badając naturalne dimery flawanowe, które są łatwiejsze do wyodrębnienia w stanie czystym a zarazem ich struktura jest prostsza. Nic więc zaskakującego, że pierwsze badania flawanów zawartych w głogu dotyczyły związków dimerycznych.

Freudenberg i Weinges (15, 45) opisali po raz pierwszy w roku 1961 dimeryczny leukoantocyjan wyodrębniony z owoców głogu, przypisując mu budowę 3',4',5,7-tetrahydroksyflawan-2,3,4-triolu połączonego przy udziale półacetalowej grupy hydroksylowej w pozycji 2 z resztą (—)epikatechiny (wzór II). Cztery lata później Lewak i Radomińska (27) wykazali, że związek ten posiada raczej budowę 3',4',5,7-tetrahydroksyflawan-on-3-olu-4 połączonego wiązaniem semike-

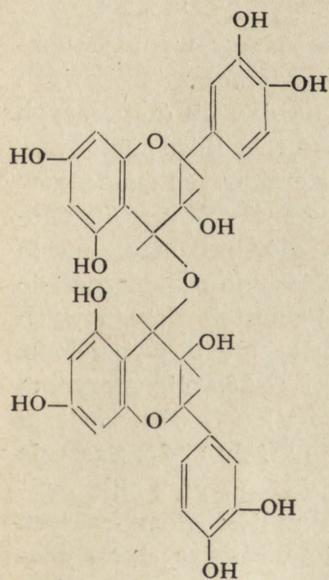
talowym z resztą (—)epikatechiny (wzór III). Równolegle prowadzono badania nad dimerycznym leukoantocyjanem z liści głogu (22, 23). Doprowadziły one do wydzielenia związku złożonego z dwóch reszt 3',4',5,7-tetrahydroksyflawan-3,4-diolu połączonych wiązaniem eterowym przy udziale drugorzędowych grup alkoholowych pierścieni heterocyklicznych (wzór IV). Porównanie leukoantocyjanów zawartych w liściach i owocach głogu wskazuje, że w obu tych tkankach znajdują się obie wspomniane leukocyjanidyny, lecz w różnych stosunkach ilościowych. Ponadto wykryto bliżej nie badany związek o charakterze dimerycznej leukopelargonidyny (27).



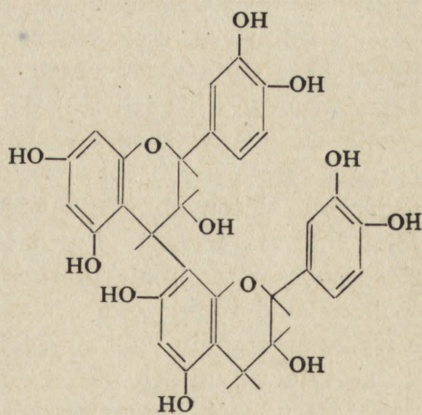
II



III



IV



V

Weinges i wsp. (46) proponują dla wszystkich dimerycznych leukoantocyjanów głogu strukturę uboższą o jeden atom tlenu, w której dwie jednostki (—)epikatechiny byłyby związane wiązaniem C-C między atomami węgla 4 i 6 lub 8 układu flawanowego jak na przykład we wzorze V. Na podstawie widm masowych i jądrowego rezonansu magnetycznego dimerycznych leukoantocyjanów wydzielonych z różnych roślin Weinges i wsp. przypuszczają, że tego typu wiązanie między resztami flawanowymi występuje powszechnie w garbnikach skondensowanych. Przypuszczenie to jest zgodne z wcześniejszymi sugestiami Creasy i Swaina (7), niemniej wydaje się, że nie ma wystarczającej podstawy do odrzucenia możliwości jednoczesnego udziału wiązań eterowych lub acetalowych w strukturze dimerów i polimerów flawanowych głogu. Przekonywujących dowodów tego rodzaju współistnienia dostarczyły badania dimerycznych i wielkocząsteczkowych leukoantocyjanów wydzielonych z innego materiału roślinnego. Mayer i wsp. (30) wydzielili na przykład z owoców *Aesculus hippocastanum* dimeryczną leukoantocyjanidynę i w jej cząsteczce stwierdzili na drodze degradacji oraz posługując się spektrometrią masową zarówno wiązania typu C-C jak i wiązanie eterowe między dwoma jednostkami C₁₅. Uzyskało to potwierdzenie w pracach Drewes i wsp. (9) oraz Roux i Paulusa (36), którzy badając dimeryczne leukofizetynidyny, zawierające wyłącznie wiązania C-C między elementami strukturalnymi, stwierdzili wyraźne różnice trwałości tych wiązań w porównaniu z wiązaniami, w których bierze udział atom tlenu. Z drugiej strony Morgan i Orsler (31) wykazali, że podstawowym układem wielkocząsteczkowych garbników drewna tekowego są jednostki 3',4',7-trójhidroksyflawan-3,4-diolu połączone mostkami eterowymi między atomami węgla 3 i 4.

Wyjaśnienie budowy dimerycznych leukoantocyjanów wymaga jeszcze wielu badań. Niemniej poglądy na strukturę wielkocząsteczkowych związków tej grupy oparte są niemal wyłącznie na danych dotyczących połączeń dimerycznych. Nie rozwiązano dotychczas zagadnień metodycznych: określania masy cząsteczkowej wielkocząsteczkowych garbników skondensowanych i ich frakcjonowania. Podejmowane próby frakcjonowania garbników skondensowanych opierały się głównie na metodach chromatograficznych i tym samym ich zastosowanie było ograniczone do związków złożonych z nie więcej niż siedmiu jednostek flawanowych (36). Podczas badania flawonoidowych składników głogu wydzielono, stosując sączenie molekularne na żelu *Sephadex G-35*, oligomeryczną leukocyjanidynę złożoną z około dziesięciu jednostek C₁₅ (26). Związki o wyższym stopniu polimeryzacji adsorbowały się na żelu *G-25*. Sączenie na acetylowanym żelu dekstranowym (*Sephadex LH-20*) pozwoliło ominąć tę trudność i doprowadziło do wydzielenia z liści głogu szeregu frakcji oligomerycznych i polimerycznych garbników różniących się między sobą nie tylko stopniem spolimeryzowania, lecz również i udziałem

elementów strukturalnych (25). Porównując wyniki sączenia na żelu *Sephadex LH-20* z danymi uzyskanymi za pomocą kolorymetrycznych metod określania stopnia polimeryzacji flawanów, wykazano, że oznaczenie kolejności wymywania garbników skondensowanych z żelu może być wartościową metodą oznaczania ich masy cząsteczkowej, pod warunkiem zastosowania odpowiednich wzorcowych substancji wielkocząsteczkowych.

Rozmieszczenie grup -OH w aromatycznych pierścieniach elementów strukturalnych garbników skondensowanych, występujących w głogu, jest takie samo jak we flawonach i flawonolach wykrytych w tej roślinie. Najczęściej pierścienie aromatyczne są podstawione grupami hydroksylowymi w pozycjach 3',4',5 i 7 (kwercetyna, luteolina, (—)epikatechina i leukocyjanidyny). Mniej rozpowszechnione jest rozmieszczenie grup fenolowych w pozycjach 4',5 i 7 (apigenina, leukopelargonidyna). Stanowi to jeszcze jedno potwierdzenie wspólnej drogi biosyntezy wszystkich flawonoidów niezależnie od stopnia utlenienia pierścienia heterocyklicznego. Liczba grup -OH i ich rozmieszczenie w pierścieniu B flawonoidów (jednostka C₆₊₃) są najprawdopodobniej determinowane przed utworzeniem piętnastowęglowego prekursora układu flawonoidowego.

Wyniki dotychczasowych prac nad flawonoidami głogu zdają się wskazywać, że działanie lecznicze tej rośliny jest uwarunkowane obecnością całego kompletu związków flawonoidowych.

Choć zainteresowanie czynnością farmakologiczną ekstraktów z głogu było główną przyczyną podjęcia badań nad flawonoidami, prace te dostarczyły także cennych danych o budowie i biosyntezie tych związków. Dalsze zaś porównawcze badania nad składem flawonoidów w różnych gatunkach głogu mogą być podstawą chemotaksonomii i wnioski o uwarunkowaniu genetycznym biosyntezy tych związków.

LITERATURA

1. Alston R. E. w *Biochemistry of Phenolic Compounds*, red. J. B. Harborne, Academic Press, Londyn 1964, str. 197.
2. Batjuk V. S., Czernobrovaja N. V., Prokopjenko A. P., *Chimija Prirodnich Sojedinienij* 1966, 90.
3. Batjuk V. S., Kolesnikow D. G., w *Fienolnyje sojedinienija i ich biologičeskije funkciji*, Nauka, Moskwa 1968, str. 45.
4. Bersin Th., Müller A., *Helv. Chim. Acta* **34**, 1868 (1951).
5. Bersin Th., Müller A., *Helv. Chim. Acta* **35**, 1891 (1952).
6. Bersin Th., Müller A., Schwarz H., *Arzneimittel-Forsch.* **5**, 490 (1955).
7. Creasy L. L., Swain T., *Nature* **208**, 151 (1965).
8. Dorner J., Kuschke H. J., *Arch. Exptl. Path. Pharm.* **240**, 23 (1954).
9. Drewes S. E., Roux D. G., Egger S. H., Feeney J., *J. Chem. Soc. (c)* str. 1217 (1967).

10. Duriasz H., Lewak St., Szreniawski Z., *Acta Physiol. Polon.* **9**, 379 (1958).
11. Dziewanowska K., Lewak St., *Wiadomości Chem.* **22**, 841 (1968).
12. Fiedler U., *Naturwiss.* **40**, 226 (1953).
13. Fisel J., *Arzneimittel-Forsch.* **15**, 1417 (1965).
14. Fisel J., *Arzneimittel-Forsch.* **16**, 80 (1966).
15. Freudenberg K., Weinges K., *Tetrahedron Letters* str. 267 (1961).
16. Gassner O., *Die Gift- u. Arzneipflanzen von Mitteleuropa*, Heidelberg 1953, str. 554.
17. Geissman T. A., Kranen-Fiedler U., *Naturwiss.* **43**, 226 (1956).
18. Graham J. D. P., *Quart. J. Pharm. Pharmacol.* **13**, 49 (1940).
19. Harborne J. B., w *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, red. T. A. Geissman, Pergamon Press, Londyn 1962, str. 593.
20. Haslam E., w *Chemistry of Vegetable Tannins*, Academic Press, Londyn 1966, str. 66
21. Kranen-Fiedler U., *Arzneimittel-Forsch.* **5**, 609 (1955).
22. Lewak St., *Roczniki Chem.* **38**, 1773 (1964).
23. Lewak St., *Bull. Acad. Polon. Sci., ser. sci. biol.* **13**, 121 (1965).
24. Lewak St., *Roczniki Chem.* **40**, 445 (1966).
25. Lewak St., *Phytochemistry* **7**, 665 (1968).
26. Lewak St., Dziewanowska K., *Roczniki Chem.* **40**, 2025 (1966).
27. Lewak St., Radomińska A., *Roczniki Chem.* **39**, 1839 (1965).
28. Lewak St., Radomińska A., dane niepublikowane.
29. Lübberts F., Kuschke H. J., *Arzneimittel-Forsch.* **5**, 603 (1955).
30. Mayer W., Goll L., von Arndt E. M., Mannschreck A., *Tetrahedron Letters* str. 429 (1966).
31. Morgan J. W. W., Orsler R. J., *Phytochemistry* **6**, 1007 (1967).
32. Paris R. R., Etchappare S., *Ann. Pharm. Franc.* **23**, 627 (1965).
33. Perkin A. G., Hummel J. J., *Chem. News* **74**, 278 (1896).
34. Rewerski W., Lewak St., *Arzneimittel-Forsch.* **17**, 490 (1967).
35. Ribereau-Gayon P., *Les composés phénoliques des végétaux*, Dunod, Paris 1968, str. 227, i nast.
36. Roux D. G., Paulus K., *Biochem. J.* **82**, 320 (1962).
37. Schimert G., *Z. Exptl. Med.* **113**, 113 (1943).
38. Schimert G., Blömer H., *Arch. Exptl. Pharm.* **217**, 337 (1953).
39. Schwabe W., Neu R., *Arzneimittel-Forsch.* **10**, 60 (1960).
40. Trunzler G., Schuler E., *Arzneimittel-Forsch.* **12**, 198 (1962).
41. Tschesche R., Fugman R., *Chem. Ber.* **84**, 810 (1951).
42. Ullsperger R., *Pharmazie* **8**, 596 (1953).
43. Ullsperger R., *Pharmazie* **8**, 923 (1953).
44. Ville A., Pachéco H., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**, 657 (1967).
45. Weinges K., *Chem. Ber.* **94**, 3032 (1961).
46. Weinges K., Kaltenhäuser W., Marx H. D., Nader E., Nader F., Perner J., Seiler J., *Liebigs Ann. Chem.* **711**, 184 (1968).
47. Zimmermann J., *Helv. Chim. Acta* **27**, 332 (1944).

JANINA H. ROGOZIŃSKA *

Struktura a aktywność cytokinin

Cytokinins' Structure and Activity

The relationships between the cytokinin activity of adenine derivatives as affected by the nature and location of the substituent groups is discussed.

Wkrótce po wyodrębnieniu i identyfikacji kinetyny (wzór I) (16), zsyntetyzowano kilkaset chemicznie pokrewnych jej związków i zbadano ich aktywność biologiczną. Do roku 1958 (36) uważano, że aktywność cytokinin (25) oznaczana testem tytoniowym (opartym na stymulacji cytokinezy) jest ograniczona do 6-podstawionych aminopuryn (wzór II). Świadczyły o tym także prace Okumury i wsp. (18, 19, 20, 21, 22) oraz Kuraishi i Okumury (9, 10), którzy badali wpływ cytokinin stosując test powiększania się krążków liści rzodkiewki. Natomiast Skinner i Shive (33), obserwując stymulujący wpływ cytokinin na kiełkowanie nasion sałaty, stwierdzili mniej ścisłą zależność między aktywnością tych związków a ich strukturą chemiczną. W zależności zatem od stosowanego biotestu cytokininy, mogą wykazywać różną aktywność względną (6, 9, 13, 33), co spowodowane jest prawdopodobnie tym, że mechanizm ich działania na poziomie molekularnym w poszczególnych biotestach jest różny.

W początkowym etapie badań prowadzonych w Uniwersytecie w Wisconsin (36) nie uwzględniano dostatecznie korelacji między stężeniem a aktywnością cytokinin. Dopiero opracowanie specjalnej pożywki (15, 17) i wprowadzenie różnych modyfikacji (24, 27) testu tytoniowego umożliwiło precyzyjniejsze porównawcze oznaczenia aktywności wielu cytokinin. W ulepszonym teście tytoniowym ledwo wykrywalny wzrost można zaobserwować zwykle już przy stężeniu $5 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-3} \mu\text{M}$, a maksymalny wzrost tkanek przy stężeniu $0,1 \mu\text{M}$ kinetyny (24, 35). Stosując ten test, Hamzi (5) przebadał w pracowni Skooga aktywność 56 związków, głównie pochodnych purynowych określając zależność mię-

*Dr, Zakład Dendrologii i Arboretum Kórnickie, Polska Akademia Nauk, Kórnik. Obecny adres: Katedra Fizjologii Roślin WSR, Poznań

dzy ich aktywnością a rodzajem i pozycją podstawionych grup w układzie purynowym. Aktywność dalszych 13 związków zbadali następnie Skoog i wsp. (35).

Badania nad syntezą i aktywnością analogów kinetyny i jej antagonistów zapoczątkowały prace nad mechanizmem działania tej grupy regulatorów wzrostu roślin (23). Poniżej przedyskutowano najważniejsze prace, omawiające zależność aktywności cytokinin od ich struktury chemicznej.

I. Wpływ struktury podstawnika na aktywność cytokinin

1. Wpływ długości nasyconego łańcucha alkilowego

N₆-adeniny alkilowe różnią się aktywnością, w zależności od długości łańcucha alkilowego. Według danych Stronga (36), cytokiny zarówno z krótkim (1—2 C) jak i z bardzo długim (powyżej 7 C) nasyconym łańcuchem nie wykazują aktywności. O zwiększaniu się aktywności cytokinin wraz z liczbą atomów węgla w łańcuchu alkilowym do 5 lub 6 świadczą zarówno wyniki testu tytoniowego (36), jak i testu sałaty (30, 31, 32). Kuraishi (9) stosując biotest liści rzodkiewki stwierdził wzrost aktywności wraz ze zwiększaniem długości łańcucha aż do 6-n-heksoaminopuryny i brak aktywności związków o 9, 10, 12 lub 18 atomach węgla w łańcuchu bocznym. Ostatnio (5, 35) określono dokładniej korelację między aktywnością związku a długością jego łańcucha: adeninę (II) można wykryć zaledwie w stężeniu 200 μM, 6-metylo-, 6-etylo-, 6-propylo- i 6-butyloaminopurynę w coraz niższych stężeniach, a 6-pentyloaminopurynę (wzór III) już w stężeniu około 0,001 μM. Mniejszą aktywność wykazują 6-hekso- i 6-heptyloaminopuryna, a minimalną 6-decyloaminopuryna. Wpływ długości łańcucha może mieć związek z właściwościami fizycznymi, ułatwiającymi pobranie związku lub jego dostęp do reaktywnych miejsc w komórce.

2. Wpływ wiązań podwójnych w podstawniku alkilowym

Podwójne wiązanie w łańcuchu bocznym znacznie zwiększa aktywność cytokinin (5). Przykładem może być 6-(γ,γ-dwumetyloalliloamino) puryna (wzór IV). Według Beauchesne i Goutarela (1) związek ten odznacza się mniejszą aktywnością od kinetyny. Jednakże badania przeprowadzone przez Rogozińską, w pracowni Skooga (28) wykazały, że jest ona około 10 razy aktywniejsza od kinetyny, co potwierdzili inni autorzy (5, 35), a także od 6-izoaminyloaminopuryny (wzór V). Należy ona obok zeatyny do najaktywniejszych cytokinin (13). Dużej aktywności wzrostowej 6-(γ,γ-dwumetyloalliloamino) puryny towarzyszy wybitna aktyw-

ność morfogenetyczna, znacznie przewyższająca aktywność kinetyny i innych badanych cytokinin (5, 26, 35). Wpływ 6-(γ,γ -dwumetyloalliloamino) puryny na wzrost i różnicowanie tkanek tytoniu w hodowli *in vitro* przedstawia rysunek 1. Biorąc pod uwagę dużą aktywność tego związku i to, że γ,γ -dwumetyloallil jest powszechnie występującym metabolitem roślinnym, Beauchesne i Goutarel (1) przypuszczali, że 6-(γ,γ -dwumetyloalliloamino) puryna może być endogenną cytokininą. Związek ten występuje w *Corynebacterium fascians* (7), a jego rybozyd (VI) — w drożdżach (4) oraz w grochu i szpinaku (3).

Zależność aktywności cytokininowej od długości bocznego łańcucha zawierającego podwójne wiązanie jest inna niż w przypadku nasyconych łańcuchów bocznych. 6-Farnezyloaminopuryna i 6-geranyloaminopuryna są aktywniejsze od 6-decyloaminopuryny. Nieoczekiwanie 6-geranyloaminopuryna jest znacznie mniej aktywna od 6-farnezyloaminopuryny mającej dłuższy łańcuch boczny. Natomiast aktywności 6-propyloaminopuryny (wzór VII) i 6-alliloaminopuryny (wzór VIII) prawie nie różnią się. Prawdopodobnie na małą aktywność związku o krótszym łańcuchu bocznym obecność podwójnego wiązania w tym łańcuchu wpływa nieznacznie.

Poza obecnością podwójnych wiązań również inne cechy strukturalne łańcucha bocznego mają wpływ na aktywność cytokinin. Na przykład związek zawierający grupy metylowe przy atomie węgla γ w łańcuchu allilowym jest znacznie aktywniejszy niż związek z grupą metylową przy atomie węgla α . Aktywność biologiczna cytokinin z nienasyconymi łańcuchami bocznymi zwiększa się od 6-alliloaminopuryny poprzez 6-(α,α -dwumetyloalliloamino) purynę do 6-(γ,γ -dwumetyloalliloamino) puryny.

Podwójne wiązanie w podstawniku mają także występujące w przyrodzie pochodne adeniny podstawione przy N_6 ugrupowaniem izoprenoidowym, które odznaczają się olbrzymią aktywnością cytokininową.

3. Wpływ grup hydroksylowych w podstawniku alkilowym

Aktywność cytokinin zmienia się po podstawieniu grup polarnych w ich łańcuchu bocznym. *Trans* zeatyna zawierająca jedną grupę hydroksylową (wzór IV) (14) jest nieco aktywniejsza od 6-(γ,γ -dwumetyloalliloamino) puryny, jak wykazał test tytoniowy (35) i inne biotesty (13). Natomiast 6-(2,3-dwuhydroksy-3-metylobutyloamino) puryna odznacza się znacznie mniejszą aktywnością (35). Fakt, że związki zawierające grupy hydroksylowe są aktywne, był dość nieoczekiwany wobec wcześniejszych doniesień Stronga (36), o warunkowaniu aktywności cytokinin przez podstawniki przy N_6 o charakterze niepolarnym.

W przyrodzie występują hydroksypochodne 6-(γ,γ -dwumetyloalliloamino) puryny zarówno *trans* jak i *cis*: zeatyna [6-(4-hydroksy-3-metylo-

butylo-*trans*-2-enyloamino) puryna] (IX), 6,4-hydroksy-3-metylobutylo-*cis*-2-enylo-amino)-9- β -*D*-rybofuranozylopuryna (X) wyodrębniona z kukurydzy, grochu i szpinaku (4) oraz (—) dwuhydrozeatyna [(—) 6-N-(4-hydroksy-3-metylobutyloamino) puryna] (XI) z niedojrzałych nasion łubinu (8).

4. Wpływ podstawników pierścieniowych

Kuraishi (9) próbował wyjaśnić znaczenie wiązań podwójnych w pierścieniu furfurylowym lub benzylowym dla aktywności cytokinin. Stwierdził on, że 6-N-cykloheksyloaminopuryna (XII) była prawie tak aktywna jak kinetyna (I) i 6-benzyloaminopuryna (XIII). Później okazało się, że wiązania podwójne zwiększają aktywność 6-aryloaminopuryn (5). Za pomocą testu tytoniowego wykazano, że 6-fenyloaminopuryna (XIV) była znacznie aktywniejsza od cykloheksyloaminopuryny (XII).

Z cytokinin podstawionych ugrupowaniem pierścieniowym najaktywniejsza okazała się benzyloaminopuryna (5). Jej działanie można było wykryć już przy stężeniu $8 \times 10^{-4} \mu\text{M}$, a jej stężenie optymalne wynosiło $0,07 \mu\text{M}$ (dla kinetyny $1,7 \times 10^{-3}$ i $0,1 \mu\text{M}$) (rysunek 2). Benzyloaminopuryna wykazywała pośrednią aktywność między kinetyną i 6- γ,γ -dwumetyloalliloamino) puryną w teście tytoniowym, a w chlorofilowym bioteście krążków liści rzodkiewki okazała się aktywniejsza także od 6-(γ,γ -dwumetyloalliloamino) puryny.

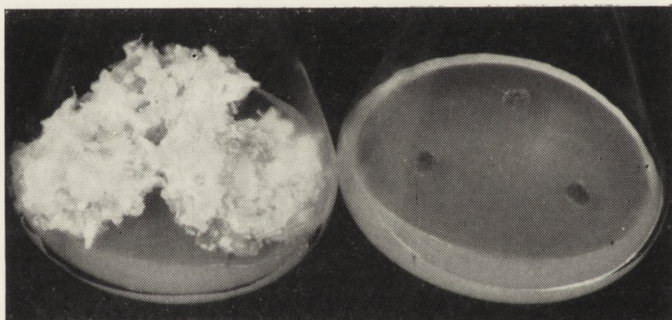
Podobnie jak pochodne alkilowe również pochodne adeniny z podstawnikami cyklicznymi w pozycji N₆ wykazują zatem większą aktywność w przypadku gdy podstawnik zawiera wiązanie podwójne; aktywność zależy także od wielkości podstawnika (2, 5, 35).

5. Wpływ grup polarnych w podstawniku pierścieniowym

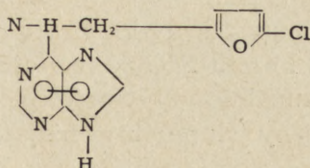
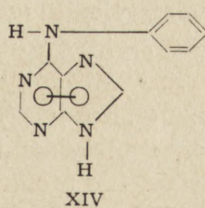
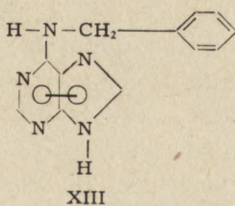
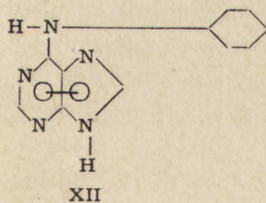
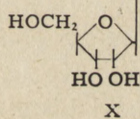
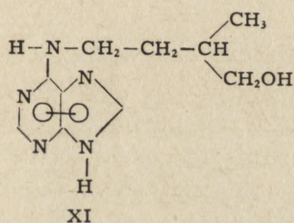
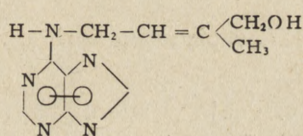
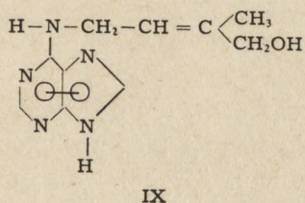
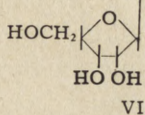
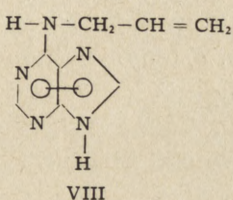
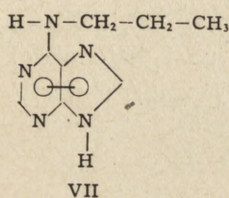
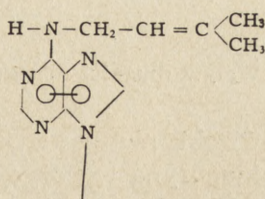
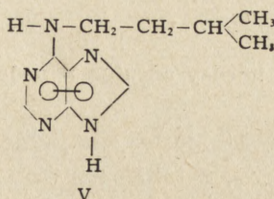
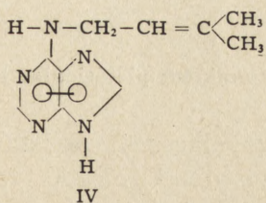
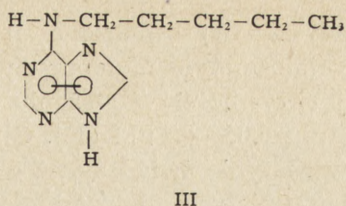
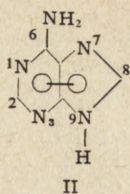
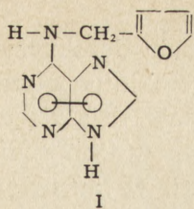
Związki zawierające heteroatomy N i Cl w podstawnikach wykazują mniejszą aktywność cytokininową. Na przykład 6-(2-pirydylometyloamino) puryna jest mniej aktywna od benzyloaminopuryny, a 6-(5-chlorofurfuryloamino) puryna (XV) od furfuryloaminopuryny. Zastąpienie atomu tlenu w grupie furfurylowej atomem siarki ma mały wpływ (35). Według Kuraishi (9) chlor w pozycji *orto* w pochodnych 6-benzyloaminopurynowych zwiększa aktywność cząsteczki, w pozycji *meta* ma mały wpływ, natomiast w pozycji *para* znacznie zmniejsza aktywność. Również grupa metylowa w pozycji *orto* zwiększa aktywność, a w pozycji *para* zmniejsza. Obecność innych grup przy podstawniku benzylowym (-OH, -OCH₃, -NO₂, -SO₃H, -NH₂) obniża aktywność (9).



Rys. 1. Wpływ 6-(γ,γ -dwumetyloalliloamino) puryny (0, 0,1, 0,5, 2,5, 12,5 μM) na różnicowanie tkanek tytoniu w hodowli *in vitro*, z których uzyskano następnie całkowicie rozwinięte rośliny (5, 26)



Rys. 2. Wzrost tkanek tytoniu przy optymalnym stężeniu kinetyny 0,1 μM (z lewej) w porównaniu z tkankami kontrolnymi bez kinetyny (z prawej)



W wyniku wprowadzenia silnie polarnego pierścienia dezoksyrybozy w pozycję 6-metyloaminopuryny powstaje aktywna cytokinina o maksymalnej aktywności w stężeniu 2.5—25 μM , a wyraźnie działająca już w stężeniu 0.02—0.1 μM (35). Obecność grup polarnych w tym związku, jak i w zeatynie świadczy, iż obecność grup polarnych w łańcuchu lub pierścieniu nie przeszkadza biologicznej aktywacji cytokinin.

6. Wpływ długości mostku między adeniną a podstawnikiem pierścieniowym

Związki nie zawierające grupy metylenowej łączącej podstawnik z aminopuryną w pozycji N₆, a także zawierające długie mostki, wykazują małą aktywność cytokininową. Jak podaje Kuraishi (9) spośród 6-N- ω -fenylo-alkilo-aminopuryn najaktywniejsze są związki o mostkach jedno- lub dwuczłonowych. 6-fenyloaminopuryna i 6-(fenoksy)-etyloaminopuryna są mniej aktywne niż kinetyna i wykazują około $\frac{1}{5}$ aktywności 6-benzyloaminopuryny. Także aktywność 6-[2-(2-furylo) etyloamino]puryny wynosi $\frac{1}{5}$ aktywności kinetyny (35).

II. Wpływ modyfikacji adeniny na aktywność cytokinin

Modyfikacje w adeninowym składniku cząsteczki obniżają aktywność cytokinin. Zastąpienie azotu w pozycji 6 pierścienia purynowego siarką znacznie zmniejsza aktywność cytokinin (9, 30, 31, 36). Hamzi (5) stwierdził, że 6-(γ,γ -dwumetyloallilolio) puryna (XVI) jest około 100 razy mniej aktywna od jej aminopochodnej (IV).

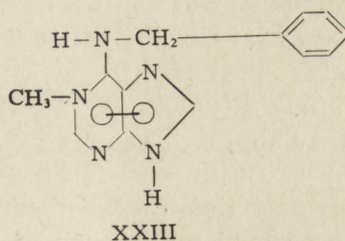
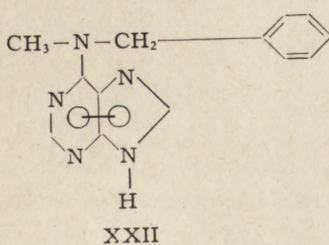
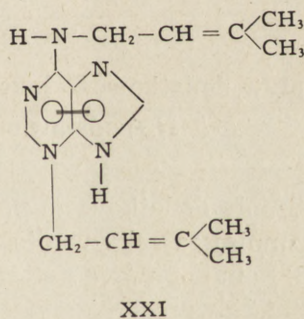
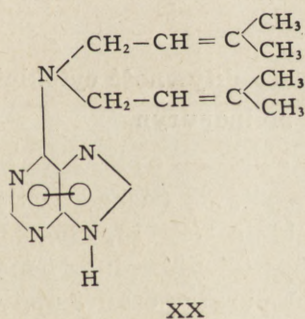
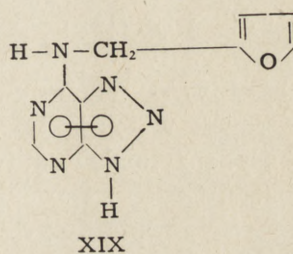
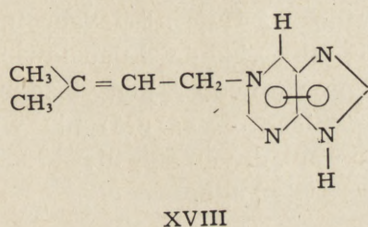
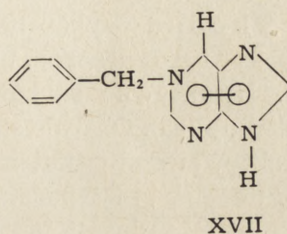
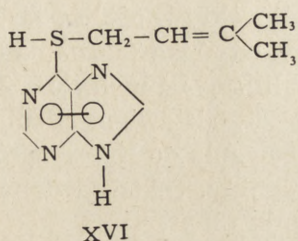
Usunięcie grupy 6-aminowej całkowicie niszczy aktywność. Takie pochodne puryn jak 1-benzylopuryna (XVII) i 1-(γ,γ -dwumetyloallilo) puryna (XVIII) są nieaktywne w testach, w których pochodne 1-adeniny wykazują aktywność (5). Prawdopodobnie usunięcie grupy -NH₂ z adeniny uniemożliwia przemianę tych związków na 6-podstawione pochodne.

Przez zastąpienie grupy -NH₂ grupą -OH i podstawienie łańcucha γ,γ -dwumetyloallilowego w pozycji 2 można utworzyć nieaktywny związek 2-(γ,γ -dwumetyloallilo) guaninę, wykazującą antagonistyczne działanie w stosunku do auksyn i mieszanin auksyn z kinetyną (1). Podobne antagonistyczne działanie w stosunku do aktywniejszych cytokinin wywiera 6-metyloaminopuryna (35).

Zastąpienie atomu węgla w pozycji 8 adeniny azotem (8-azakinetyna (XIX) i 6-benzylo-8-azapuryna) powoduje około 20-krotne zmniejszenie aktywności (5, 35). Natomiast związki pirazolowe (w których nastąpiła wymiana atomów węgla i azotu między pozycjami 7 i 8 pierścienia purynowego) nie wykazują zupełnie aktywności biologicznej, nawet jeśli zawierają taki łańcuch boczny jak najaktywniejsze cytokiny (36).

III. Wpływ lokalizacji podstawnika przy adeninie na aktywność cytokinin

Według wcześniej uzyskanych danych (9, 36) aktywność cytokinin wykazują jedynie 6-podstawione aminopuryny. Pochodne adeniny podstawione grupą alkilową lub aryłową w innej pozycji niż N₆ mogą wykazywać tak zwaną pozorną aktywność cytokininową, zależnie od miejsca podstawienia w pierścieniu purynowym i od stosowanego testu (28, 35). Ta aktywność pozorna uwarunkowana jest łatwością przegrupowywania



się tych związków na 6-pochodne aminopuryn podczas autoklawowania pożywki do biotestu (28). Hamzi i Skoog donieśli o pozornej aktywności 1-podstawionych aminopuryn. Dalsze badania (35) wykazały, że 1-benzyloadenina wykazuje rzeczywistą aktywność cytokininową, ale jedynie w dużych stężeniach.

Beauchesne i Goutarel (1) badając izomery z łańcuchem γ,γ -dwumetyloallilowym podstawionym w pozycji 3, 6, 7, 8 i 9 pierścienia purynowego wykryli następujące zależności: 3-(γ,γ -dwumetyloallilo) adenina wykazuje słabą aktywność, a izomery podstawione w pozycji 7, 8 lub 9 są nieaktywne; natomiast 6-(γ,γ -dwumetyloalliloamino) puryna jest aktywna, jednak mniej niż kinetyna. Prace przeprowadzone następnie w pracowni Skooga wykazały jednak, że aktywność 3-podstawionej aminopuryny jest tylko pozorna, uzależniona od przegrupowania do 6-pochodnej (28). Nieaktywne są również 3-allilo-, 3-furfurylo-, 3-fitylo-, i 3-benzyloadeniny (35). Okazało się dalej, że 9-podstawione adeniny mogą być również aktywowane wskutek przegrupowania do N_6 -izomerów, choć znacznie trudniej niż 1- i 3-podstawione adeniny. 7-Podstawione aminopuryny natomiast nie ulegają przegrupowaniu (35).

Leonard i wsp. (11) na podstawie wyników testu pobudzania kiełkowania nasion sałaty podają, że 2-amino- i 2-fluoro-6-podstawione-aminopuryny są aktywne, choć mniej niż odpowiednie 6-podstawione-aminopuryny. Jednak w teście tytoniowym zarówno 2-benzyloadenina jak i 2-*m*-metoksybenzyloadenina (w stężeniach 1—64 μM) nie wykazują aktywności (35). Czy 2 i 8 podstawione adeniny mogą ulegać aktywacji wskutek przegrupowania dotychczas nie wiadomo.

IV. Wpływ dodatkowego łańcucha na aktywność cytokininową N_6 -podstawionych aminopuryn

Wprowadzenie dodatkowego podstawnika do pochodnych 6-aminopurynowych zmniejsza aktywność cytokinin (1, 18, 36). Jak podaje Strong (36) aminopuryny z dwoma podstawnikami: 6-(1-metyloamylamino)- i 6-(1,3-dwumetyloamylamino) puryny oraz 2-metylo-6-furfurylo-, 2-amino-6-furfurylo- i 2-amino-6-benzyloaminopuryny, wykazują mniejszą aktywność od kinetyny, a 6-hydrazynopuryna i 6-(1,2-dwukarboksyetyloamino) puryna — brak aktywności. Okumura i wsp. (18) stwierdzili, że 6-(dwumetylo)-, 6-(dwuetylo)- i 6-(dwubutylo) aminopuryny wywierają tylko nieznaczne działanie stymulujące. Według Beauchesne i Goutarela (1), bis- γ,γ -dwumetyloallilo-6-adenina (XX) i bis- γ,γ -dwumetyloallilo-3,6-adenina (XXI) są również mniej aktywne niż 6-monopodstawiony związek (IV). Należy wspomnieć, że podstawnik

9-rybozylowy (VI) w małym stopniu wpływa na aktywność cytokininową.

Badania przeprowadzone w pracowni Skooga (5, 35) potwierdziły niektóre dane dorzucając nowych. Okazało się, że 9-rybozyd kinetyny i 6-(γ,γ -dwumetyloalliloamino) puryny jest 2—5 razy mniej aktywny niż odpowiednie wolne zasady. Obecność grupy metylowej w pozycji N₆ kinetyny lub 6-benzyloaminopuryny (XXII) powoduje przynajmniej 100-krotne obniżenie aktywności. Podobnie zmniejszona jest aktywność pochodnych dwubenzylowych, podstawionych w pozycjach 6, 7 oraz 6, 9 adeniny. Obecność drugiego podstawnika w pozycjach 1- lub 3- w N₆-pochodnych adeniny (XXIII) drastycznie zmniejsza (1,6-dwubenzyloadenina) lub nawet całkowicie eliminuje (6,6-dwumetylo 1,3,4,5a,9-pentaaza-5a, 6,7,8-czterohydro-3H-benz [o] inden) aktywność cytokinin. Wskazuje to na istotne dla aktywności cytokinin znaczenie pozycji 1- i 3- w układzie purynowym, które muszą być wolne. Dwupodstawione pochodne adeniny, 1,9-dwubenzyloadenina i 1,7-dwubenzyloadenina wykazywały pewną aktywność, ale przypuszczalnie wskutek przegrupowania do odpowiednich N₆-pochodnych (5, 35).

Wydaje się, że związki wykazujące aktywność cytokininową muszą zawierać w swoim składzie adeninę, choć znane są pewne wyjątki jak 6-(γ,γ -dwumetyloallilotio) puryna, oraz 8-aza-pochodne kinetyny i 6-benzyloaminopuryny. Badania nad pochodnymi pirymidynowymi i pochodnymi mocznika, omawiane przez Skooga i wsp. (35) wskazują, że nawet nie zawierające układu purynowego substancje mogą wykazywać aktywność podobną do kinetyny. Jednakże mechanizm ich działania jest prawdopodobnie inny.

Określając elementy struktury cytokinin warunkujące ich aktywność Strong (36) wysunął sugestię o roli łańcucha bocznego: ze względu na jego różnorodną budowę funkcją jego mogłoby być nadawanie adeninie „odpowiednich właściwości fizycznych, być może rozpuszczalności”, co pozwala na przeniknięcie związku do pewnych miejsc w komórce. Próbując wyjaśnić zależność między aktywnością cytokinin a ich strukturą chemiczną, Kuraishi (9) przypuszcza, że część lipofilna (łańcuch boczny) umożliwi zaadsorbowanie się cząsteczki w określonym miejscu w komórce, w którym część hydrofilna (układ purynowy) oddziałuje w jakiś sposób na pewne procesy metaboliczne.

Nowych, niezmiernie interesujących danych dostarczają ostatnie badania wykazujące obecność cytokinin w tRNA (3, 4, 12, 29, 34, 37). Sugerują one specyficzną rolę cytokinin w kontrolowaniu wbudowywania się aminokwasów do białek. Czy cytokininy funkcjonują w tym procesie jako wolne zasady, czy też jako komponenty RNA nie wiadomo. Dalsze badania w tej dziedzinie mogą rzucić nowe światło na zagadnienia regulacji hormonalnej wzrostu i rozwoju roślin.

LITERATURA

1. Beauchesne G., Goutarel R., *Physiol. Plantarum* **16**, 630 (1963).
2. Gunning B. E. S., Barkley W. K., *Nature* **199**, 262 (1963).
3. Hall R. H., Csonka L., David H., Mc Lennan B., *Science* **156**, 69 (1967).
4. Hall R. H., Robins M. J., Stasiuk L., Thedford R., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2614 (1966).
5. Hamzi Q. H., Ph. D., Thesis, The University of Wisconsin (1965).
6. Hamzi Q. H., Skoog F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 76 (1964).
7. Klämbt D., Thies G., Skoog F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 52 (1966).
8. Koshimizu K., Kusaki T., Mitsui T., Matsubara S., *Tetrahedron Letters* **14**, 1317 (1967).
9. Kuraishi S., *Sci. Papers Coll. Gen. Educ., Univ., Tokyo* **9**, 67 (1959).
10. Kuraishi S., Okumura F. S., *Bot. Mag. Toyko* **69**, 300 (1956).
11. Leonard E. O., Skinner C. G., Shive W., *Arch. Biochem. Biophys.* **92**, 33 (1961).
12. Letham D. S., *Life Sci.* **5**, 1999 (1966).
13. Letham D. S., *Planta* **74**, 228 (1967).
14. Letham D. S., Shannon J. S., Mc Donald I. R., *Proc. Chem. Soc. str.* **230** (1964).
15. Linsmaier E. M., Skoog F., *Physiol. Plantarum* **18**, 100 (1965).
16. Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., Von Saltza M. H., Strong F. M., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1375 (1956).
17. Murashige T., Skoog F., *Physiol. Plantarum* **15**, 473 (1962).
18. Okumura F. S., Enishi N., Itoh H., Masumura M., Kuraishi S., *Bull. Chem. Soc. Jap.* **32**, 886 (1959).
19. Okumura F. S., Kotani Y., Ariga T., Masumura M., Kuraishi S., *Bull. Chem. Soc. Jap.* **32**, 883 (1959).
20. Okumura F. S., Kusaka H., Takematsu T., *Bull. Chem. Soc. Jap.* **33**, 1471 (1960).
21. Okumura F. S., Kusaka H., Takematsu T., *J. Biochem. (Tokyo)* **49**, 133 (1961).
22. Okumura F. S., Masumura M., Motoki T., Takahashi T., Kuraishi S., *Bull. Chem. Soc. Jap.* **30**, 194 (1957).
23. Osborne D. J., Mc Calla D. R., *Plant Physiol.* **36**, 219 (1961).
24. Rogozińska J. H., *Acta Soc. Bot. Pol.* **35**, 425 (1966).
25. Rogozińska J. H., *Post. Biochem.* **12**, 265 (1966).
26. Rogozińska J. H., *Praca habilitacyjna* (1966).
27. Rogozińska J. H., *Wiad. Bot.* **11**, 77 (1967).
28. Rogozińska J. H., Helgeson J. P., Skoog F., *Physiol. Plantarum* **17**, 165 (1964).
29. Rogozińska J. H., Legocki A. B., *Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Sci. Biol.* **17**, 1 (1969).
30. Skinner C. G., Claybrook J. R., Talbert F. D., Shive W., *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 567 (1956).
31. Skinner C. G., Claybrook J. R., Talbert F. D., Shive W., *Plant Physiol.* **32**, 117 (1957).

32. Skinner C. G., Shive W., *Plant Physiol.* **32**, 500 (1957).
33. Skinner C. G., Shive W., *Plant Physiol.* **34**, 1 (1959).
34. Skoog F., Armstrong D. J., Cherayil J. D., Hampel A. C., Bock R. M., *Science* **154**, 1354 (1966).
35. Skoog F., Hamzi Q. H., Szweykowska A. M., Leonard N. J., Carraway K. L., Fujii T., Helgeson J. P., Loeppky R. N., *Phytochemistry* **6**, 1169 (1967).
36. Strong F. M., w *Topics in Microbial Chemistry* str. 98—157 Wiley, New York 1958.
37. Zachau H. G., Dütting D., Feldmann H., *Angew. Chem.* **78**, 392 (1966).

JACEK ŚLIWOWSKI *

Mechanizmy reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami

A. Podstawy teoretyczne

Mechanisms of enzyme reactions with two or more substrates and products

A. Theoretical basis

A nomenclature and a shorthand notation for writing down mechanisms of enzyme reactions with two or more substrates and products are presented. Methods for deriving the full steady state rate equations for these mechanisms are explained.

Kilka lat temu ukazały się w *Postęпах Biochemii* artykuły (9, 13), w których zajmowano się kinetyką układów: jeden substrat, jeden kompleks enzym-substrat, jeden produkt.

Lata sześćdziesiąte przyniosły jednak szybki rozwój badań w tej dziedzinie. Równania Michaelisa-Mentena i Briggs-Haldane'a (3) opisujące takie wyidealizowane proste układy enzymatyczne zastąpiono równaniami szybkości reakcji w układach obejmujących po kilka substratów i produktów oraz izomeryzujących form enzymu. Ułatwiło to poznanie mechanizmów reakcji: ustalenie kolejności w jakiej substraty przyłączają się do miejsca aktywnego enzymu, składu tworzących się kompleksów oraz kolejności w jakiej produkty odłączają się od powierzchni enzymu (8).

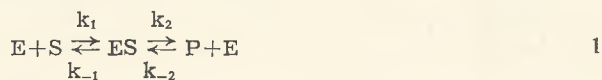
Artykuł ten jest pierwszym z dwóch poświęconych kinetyce złożonych reakcji enzymatycznych. Omówiono w nim podstawy teoretyczne zagadnienia, natomiast stosowane obecnie techniki badania mechanizmów reakcji enzymatycznych oraz wyniki otrzymane przy zastosowaniu tych technik przedstawione zostaną w drugim artykule. Wprowadzając czytelnika w podstawy teoretyczne autor będzie starał się ułatwić zrozumienie pewnych trudniejszych, w znacznym stopniu zmatematyzowanych pojęć podając tam gdzie to możliwe ilustrujące przykłady jak i wyprowadzenia niektórych wzorów.

* Mgr, Zakład Biochemii Roślin, Katedra Biochemii, Uniwersytet Warszawski

I. Wprowadzenie

Rzeczony kinetyki reakcji enzymatycznych rozpoczął się od rozpatrywania układów najprostszych i przyjmowania założeń bardzo ograniczonych, reprezentujących specjalne przypadki.

Rozpatrzmy równanie:



gdzie E — enzym

S — substrat

ES — kompleks enzym-substrat

P — produkt

Szybkość zużywania substratu w takiej reakcji zależy od stężeń: enzymu i kompleksu enzym-substrat. Oznaczając więc stężenia wyrażone w molach nawiasem kwadratowym otrzymuje się:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = k_1[E] \cdot [S] - k_{-1}[ES] \quad 2$$

Aby wyznaczyć szybkość zużywania substratu w reakcji enzymatycznej należy znać stężenie wolnego enzymu i stężenie kompleksu enzym-substrat. Szybkość z jaką ES powstaje jest równa $k_1[E] \cdot [S] + k_{-2}[E][P]$ a szybkość z jaką kompleks ten jest rozkładany zarówno do E i S jak i do E i P wynosi $k_{-1}[ES] + k_2[ES]$.

Równanie opisujące zmiany stężenia kompleksu ES ma więc postać:

$$v = \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E] \cdot [S] + k_{-2}[E] \cdot [P] - (k_{-1}[ES] + k_2[ES]) \quad 3$$

Ponieważ $[E_t] = [ES] + [E]$ gdzie symbolem $[E_t]$ oznaczono całkowite stężenie enzymu, zatem stężenie wolnego enzymu można wyrazić jako:

$$[E] = [E_t] - [ES] \quad 4$$

Po podstawieniu tego wyrażenia zamiast E do równania 3 wzór przyjmie postać:

$$v = \frac{d[ES]}{dt} = k_1([E_t] - [ES]) \cdot [S] + k_{-2}([E_t] - [ES]) [P] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad 5$$

Z danych eksperymentalnych wynika, że zależność pomiędzy szybkością reakcji enzymatycznej a stężeniem substratu przyjmuje na wykresie (V — oś rzędnych, S — oś odciętych) kształt hiperboli (3). Aby wypro-

wadzone równanie szybkości reakcji enzymatycznej odpowiadało takiej zależności, v musi być funkcją $[S]$ ($[P]$ chwilowo, dla uproszczenia, pomija się) opisywaną przez równanie typu:

$$v = \frac{a \cdot [S]}{b + [S]} \text{ gdzie } a, b \text{ stałe} \quad 6$$

Aby od równania 2 i równania 5 przejść do równania hiperboli (równanie 6) należy przyjąć pewne upraszczające założenia (inaczej jednoznaczne rozwiązanie tego problemu jest niemożliwe). Michaelis i Menten przyjęli, że E i S są w równowadze z ES, czyli że ES powstaje z E i S z taką samą szybkością z jaką dysocjuje na E i S, co jest równoważne algebraicznej zależności:

$$k_1[E] \cdot [S] = k_{-1}[ES] \quad 7$$

Przy założeniu, że $k_2 \ll k_{-1}$ (k_2 jest znacznie mniejsze od k_{-1}) otrzymali oni równanie szybkości reakcji enzymatycznej w postaci:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{k_2[E_t] \cdot [S]}{\frac{k_{-1}}{k_1} + [S]} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad 8$$

W tym równaniu oznaczono dla określonej ilości enzymu:

$$V_{\max} = k_2[E_t]; \quad K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

gdzie V_{\max} — szybkość maksymalna reakcji, K_m — stała, nazwana stałą Michaelisa.

Ogólniejsze założenie przyjęli Briggs i Haldane. Założyli oni, że kompleks ES powstaje z E i S zasadniczo tak szybko, jak szybko jest rozkładany, zarówno przez ponowne przekształcenie do E i S jak i przez przekształcenie do E i P — co jest równoważne algebraicznej zależności:

$$k_1[S] \cdot [E] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad 9$$

Przy takim założeniu równanie szybkości reakcji enzymatycznej przyjęło postać

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{k_2[E_t][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} = \frac{V_{\max}[S]}{K'_m + [S]} \quad 10$$

w równaniu 10 oznaczono:

$$V_{\max} = k_2[E_t], \quad K'_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad 11$$

Należy tu zwrócić uwagę na dwa zagadnienia:

- w obu przypadkach definicje stałej Michaelisa są różne
- założenie Briggsa i Haldane'a jest rzeczywiście ogólniejsze od założenia Michaelisa-Mentona, gdyż wystarczy w równaniu 9 przyjąć $k_2 = 0$ aby otrzymać równanie 7.

Przypadek jeszcze ogólniejszy otrzymano pomijając założenie, że reakcja enzymatyczna przedstawiona w równaniu 1 jest rozpatrywana w położeniu dalekim od stanu równowagi, tj. zanim nagromadzą się mierzalne ilości produktów.

Poniżej dla przykładu przedstawiono wyprowadzenie równania szybkości dla takiej jednosubstratowej, odwracalnej reakcji enzymatycznej uwzględniając założenia stanu stacjonarnego, a mianowicie

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \quad 12$$

oraz

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad 13$$

Stężenie ES przyjęto jako stałe dla znacznej części czasu trwania reakcji, wyłączając początkowe stadium, w czasie którego stężenie to szybko wzrasta. Pełniejsze omówienie zastosowania pojęcia stanu stacjonarnego w kinetyce reakcji enzymatycznych podał Grabowski (9). Porównując równania 5 i 13 otrzymano zależność:

$$k_1([E_t] - [ES]) \cdot [S] + k_{-2}([E_t] - [ES]) \cdot [P] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad 14$$

z której wyznaczono [ES]

$$[ES] = \frac{(k_1[S] + k_{-2}[P]) \cdot [E_t]}{k_1[S] + k_{-2}[P] + k_{-1} + k_2} \quad 15$$

Wartości [E] z równania 4 i [ES] z równania 15 wstawiono do równania 2 uzyskując wyrażenie:

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \left\{ k_1[S] - (k_1[S] + k_{-1}) \cdot \frac{k_1[S] + k_{-2}[P]}{k_1[S] + k_{-2}[P] + k_{-1} + k_2} \right\} [E_t] \quad 16$$

Dzieląc licznik i mianownik ułamka w równaniu 16 przez $(k_{-1} + k_2)$ otrzymano:

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \left[k_1[S] - \frac{(k_1[S] + k_{-1}) \left(\frac{k_1[S]}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2} \right)}{1 + \frac{k_1[S]}{k_{-1} + k_2} + \frac{k_{-2}[P]}{k_{-1} + k_2}} \right] \cdot [E_t] \quad 17$$

Zdefiniowano, że:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad 18$$

$$K_p = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} \quad 19$$

gdzie K_m — stała kinetyczna odpowiadająca stałej Michaelisa w równaniu Michaelisa-Mentena (dla reakcji „naprzód”, K_p — stała kinetyczna wprowadzona w wyniku przyjęcia założenia, że reakcja enzymatyczna jest odwracalna (dla reakcji „wstecz”), a wtedy po odpowiednim przekształceniu

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{\left(\frac{k_2[S]}{K_m} - \frac{k_{-1}[P]}{K_p} \right) [E_t]}{1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[P]}{K_p}} \quad 20$$

Z kolei zdefiniowano, że:

$$V_s = k_2[E_t] \quad 21$$

$$V_p = k_{-1}[E_t] \quad 22$$

gdzie V_s — szybkość maksymalna (w określonych warunkach) dla reakcji enzymatycznej przebiegającej w kierunku „naprzód”; V_p — szybkość maksymalna (w określonych warunkach) dla reakcji enzymatycznej przebiegającej „wstecz”, a wówczas

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_s \frac{[S]}{K_m} - V_p \frac{[P]}{K_p}}{1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[P]}{K_p}} \quad 23$$

Równanie 23 jest pełnym równaniem opisującym szybkość reakcji enzymatycznej, w której uczestniczy jeden substrat, powstaje jeden kompleks enzym-substrat i w wyniku rozpadu tego kompleksu otrzymujemy jeden produkt oraz zregenerowany enzym. Widać więc, że nawet tak rozbudowane równanie opisuje przypadek bardzo prosty. W większości znanych reakcji enzymatycznych bierze jednak udział dwa lub więcej substratów, tworzy się dwa lub więcej kompleksów pośrednich, uwalniane są dwa lub więcej produktów.

II. Mechanizmy reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami

1. Terminologia

Terminologia, która tu zostanie przedstawiona pochodzi od Cleland (4). Jej zwartość i przejrzystość zadecydowały o coraz powszechniejszym użyciu.

Substraty będą oznaczane literami: A, B, C..., w kolejności w jakiej przyłączają się do enzymu.

Produkty będą oznaczone literami: P, Q, R..., w kolejności, w której odłączane są od powierzchni enzymu.

Stabilnymi formami enzymu nazwano formy enzymu niezdolne do jednocząsteczkowej reakcji przebiegającej z uwolnieniem substratu lub produktu a także niezdolne do izomeryzacji w formy enzymu o podanych wyżej własnościach. Stabilne formy enzymu oznaczono E, F, G,....

Przejściowymi kompleksami nazwano formy enzymu zdolne do jednocząsteczkowej reakcji przebiegającej z uwolnieniem substratu lub produktu albo zdolne do izomeryzacji w formy enzymu o podanych wyżej własnościach. Przejściowe kompleksy są także zdolne do przyłączenia substratu lub produktu. Przejściowe kompleksy oznaczono grupami liter reprezentujących ich skład np. EA, FA czy EAB.

Centralnymi kompleksami (są to kompleksy o własnościach postulowanych przez Michaelisa) nazwano kompleksy niezdolne do przyłączania ani substratów ani produktów. Takie kompleksy ulegają wyłącznie jednocząsteczkowej degradacji z uwolnieniem substratów lub produktów, lub też następuje ich izomeryzacja do kompleksów ulegających takiej degradacji. Dla odróżnienia ich od nieposiadających tych własności, innych przejściowych kompleksów, symbole oznaczające kompleksy centralne ujęte są w nawiasy np. (EAB) lub (EAB-EPQ).

Nazwa „reaktant” oznaczać będzie substrat lub produkt.

Liczba biorących udział w reakcji enzymatycznej substratów lub produktów oznaczana będzie liczebnikiem głównym: jeden, dwa, trzy. Na przykład reakcję enzymatyczną z trzema substratami i dwoma produktami określa się jako reakcję enzymatyczną, trzy-dwa.

Ze względu na kolejność przyłączania się do enzymu substratów i uwalniania z powierzchni enzymu produktów będziemy wyróżniali następujące typy mechanizmów reakcji enzymatycznych:

- 1) mechanizmy sekwencyjne
- 2) mechanizmy typu ping-pong.

Mechanizmami sekwencyjnymi nazwano takie mechanizmy, w których wszystkie substraty biorące udział w reakcji muszą dołączyć się do enzymu, zanim z powierzchni enzymu uwolniony zostanie pierwszy produkt. Mechanizmami typu ping-pong nazwano takie mechanizmy reakcji enzymatycznych, w których jeden lub więcej produktów oddysocjowuje z powierzchni enzymu, zanim do enzymu dołączą się wszystkie substraty biorące udział w reakcji. Enzym występuje więc w dwóch lub więcej stabilnych formach, pomiędzy którymi oscyluje w czasie reakcji.

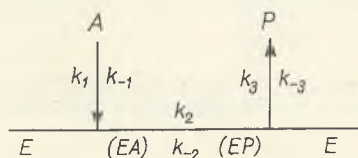
Wśród mechanizmów sekwencyjnych wyróżniono:

- a) mechanizmy uporządkowane
- b) mechanizmy o dowolnej kolejności

Mechanizm sekwencyjny jest uporządkowany jeżeli substraty dołączają się do enzymu w określonej kolejności i powstałe w czasie reakcji enzymatycznej produkty są również uwalniane z powierzchni enzymu w określonej kolejności.

W mechanizmie sekwencyjnym o dowolnej kolejności substraty nie przyłączają się do enzymu w określonym porządku i powstałe w czasie reakcji enzymatycznej produkty mogą być uwalniane z powierzchni enzymu w dowolnej kolejności. W mechanizmie tego typu występują więc alternatywne sekwencje reakcji.

Jeżeli izomeryzacja stabilnej formy enzymu jest częścią sekwencji reakcji do nazw mechanizmów takich reakcji dołącza się przedrostek „izo” np. mechanizm izouporządkowany lub mechanizm izo-ping-pong. Cleland (5) zaproponował również system graficznego zapisu mechanizmów złożonych reakcji enzymatycznych. Enzym reprezentowany jest przez poziomą linię. Dołączenie do enzymu substratu i uwolnienie z powierzchni enzymu produktu oznacza się pionowymi strzałkami. Substraty, produkty i formy enzymu oznaczone są literami lub grupami liter według przedstawionych wyżej reguł. Stałe szybkości pisze się obok strzałek: po lewej stronie — stałe szybkości dla reakcji „naprzód”, po prawej zaś — dla reakcji „wstecz”. Najprostszy przykład zapisu graficznego wg Clelanda dla reakcji o mechanizmie jeden-jeden przedstawiono na schemacie 1.



Schemat 1. Mechanizm jeden-jeden, dwa centralne kompleksy

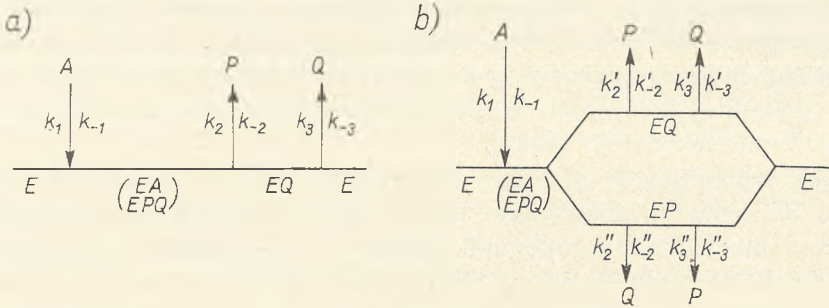
2. Typowe mechanizmy reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami

Schemat 2 ilustruje różnicę pomiędzy mechanizmami sekwencyjnymi, uporządkowanym (a) i o dowolnej kolejności (b) dla reakcji enzymatycznej z jednym substratem i dwoma produktami (reakcja jeden-dwa).

Uporządkowany mechanizm reakcji dwa-dwa przedstawia schemat 3. Dla porównania w schemacie tym obok zapisu graficznego wg Clelanda (schemat 3a) przedstawiono też zapis tradycyjny (schemat 3b) tego samego mechanizmu tej samej reakcji.

Schemat 4 przedstawia mechanizm sekwencyjny, izouporządkowany reakcji dwa-dwa. W tym i następujących przykładach dla uproszczenia na schematach mechanizmów pominięto stałe szybkości.

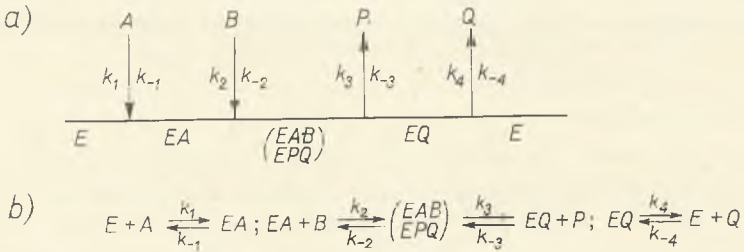
W mechanizmie zapisanym na schemacie 4 zachodzi izomeryzacja wolnego enzymu. Równanie szybkości dla rozpatrywanej reakcji enzymatycznej przyjmuje wówczas inną postać niż w przypadku mechanizmu upo-



Schemat 2. Mechanizm sekwencyjny, jeden-dwa

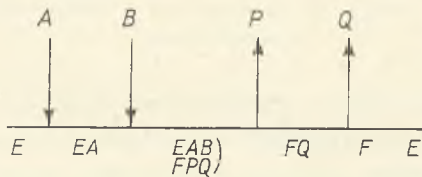
a) uporządkowany, b) dowolna kolejność

rządkowanego, dwa-dwa (schemat 4) co pozwala na odróżnienie tych mechanizmów.



Schemat 3. Zapis reakcji enzymatycznej o mechanizmie uporządkowanym, dwa-dwa

a) graficzny wg. Clelanda, b) tradycyjny



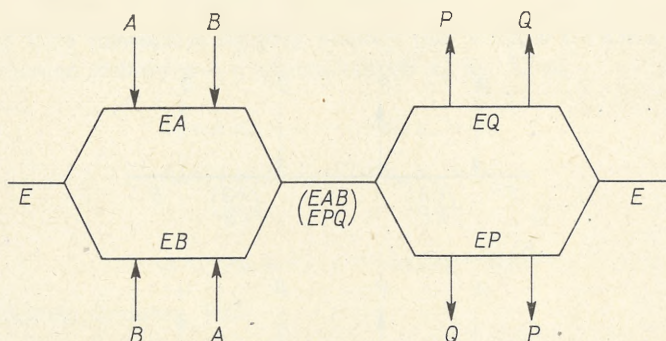
Schemat 4. Mechanizm sekwencyjny, izuporządkowany, dwa-dwa

Mechanizm sekwencyjny o dowolnej kolejności dla reakcji dwa-dwa przedstawia schemat 5.

Natomiast schemat 6 (a, b i c) przedstawia mechanizmy typu ping-pong dla reakcji dwa-dwa. W mechanizmie 6a enzym oscyluje między dwiema stabilnymi formami (formą E i formą F). Sekwencja tak przedstawionej

reakcji enzymatycznej może być rozpoczęta zarówno formą enzymu E jak i formą enzymu F.

W analogiczny sposób można przedstawić dwa różne mechanizmy trzy-dwa otrzymane przy założeniu, że nie występuje izomeryzacja stabilnej formy enzymu, występują centralne kompleksy i nie ma alterna-



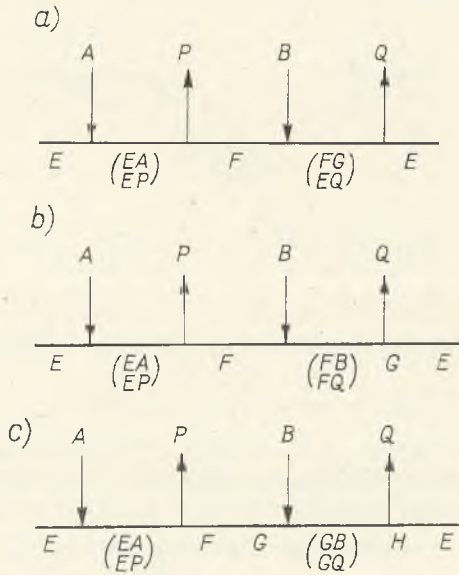
Schemat 5. Mechanizm sekwencyjny, dowolna kolejność, dwa-dwa

tywnych sekwencji reakcji. Przy tych samych założeniach są możliwe cztery różne mechanizmy dla reakcji enzymatycznych cztery-cztery i dziewięć mechanizmów dla reakcji pięć-pięć. Oczywiście przy pominięciu podanych wyżej założeń liczba możliwych mechanizmów dla reakcji enzymatycznych z 3, 4, 5 substratami i produktami jest jeszcze większa.

3. Metody wyprowadzania równań szybkości dla reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami

Równania szybkości dla reakcji enzymatycznych są wyprowadzone przy założeniu stanu stacjonarnego. Jak już wspomniano w stanie stacjonarnym stężenia produktów pośrednich (kompleksy przejściowe i kompleksy centralne) są stałe, wobec tego pochodna ze stężeń tych kompleksów względem czasu jest równa zero (równanie 13). Aby otrzymać równanie szybkości dla reakcji enzymatycznej z dwoma lub więcej substratami i produktami należy napisać dla każdej formy enzymu (wolny enzym lub kompleksy enzymu z substratami czy produktami) występującej w rozpatrywanym mechanizmie reakcji, wyrażenie opisujące szybkość zmiany stężenia tej formy enzymu w czasie. Takie wyrażenia zawierają stałe szybkości charakteryzujące przemiany zachodzące w reakcji oraz stężenia reaktantów i form enzymu. Zgodnie z przyjętym założeniem stanu stacjonarnego wyrażenia te przyrównuje się do zera. Otrzymuje się w ten sposób serię n równań liniowych dla n form enzymu. Otrzymany układ równań liniowych nie jest niezależny. Jedno z równań układu można wyeliminować korzystając z faktu, że suma stężeń wszystkich

występujących w danym mechanizmie form enzymu jest równa $[E_t]$. Rozwiązanie tak zdefiniowanego układu $(n-1)$ równań wyznacza stężenia stacjonarne wszystkich form enzymu występujących w rozpatrywanym mechanizmie. Znajomość stężeń stacjonarnych dla form enzymu pozwala na bezpośrednie wyprowadzenie równania szybkości dla rozpatrywanej reakcji enzymatycznej.



Schemat 6. Mechanizm dwa-dwa typu ping-pong

a) normalny, b) izo-ping-pong, c) dwuizo-ping-pong

Ilustracją omawianej metody będzie wyprowadzenie równania szybkości dla mechanizmu reakcji enzymatycznej przedstawionego na schemacie 1. Występują tu trzy formy enzymu: E, EA oraz EP. Wyrażenia opisujące szybkość zmiany stężeń tych form enzymu w czasie reakcji przedstawiają wzory 24 i 25, przy czym, z założenia stanu stacjonarnego pochodne stężenia każdego z kompleksów względem czasu są równe zero.

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_1[E] \cdot [A] + k_{-2}[EP] - k_{-1}[EA] - k_2[EA] = 0 \quad 24$$

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_2[EA] + k_{-3}[E][P] - k_3[EP] - k_{-2}[EP] = 0 \quad 25$$

Ponieważ zaś

$$[E_t] = [E] + [EA] + [EP] \quad 26$$

zatem

$$[E] = [E_t] - [EA] - [EP] \quad 27$$

Podstawiając prawą stronę równania 27 do równań 24 i 25 i porządkując te równania otrzymano układ dwóch równań z dwiema niewiadomymi, którymi są [EP] oraz [EA]:

$$(k_{-2} - k_1[A])[EP] - (k_1[A] + k_{-1} + k_2)[EA] = -k_1[A][E_t] \quad 28$$

$$-(k_{-3}[P] + k_{-2} + k_3)[EP] + (k_2 - k_{-3}[P]) \cdot [EA] = -k_{-3}[P][E_t] \quad 29$$

Równania tego typu rozwiązuje się przy pomocy tzw. wzorów Cramera (12).

Układ n równań liniowych o n niewiadomych x_1, x_2, \dots, x_n

$$a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots + a_{1n}x_n = b_1$$

$$a_{21}x_1 + a_{22}x_2 = \dots + a_{2n}x_n = b_2 \quad 30$$

$$\dots \dots \dots \quad (i)$$

$$a_{n1}x_1 + a_{n2}x_2 + \dots + a_{nn}x_n = b_n$$

nazywa się układem Cramera, jeśli

$$\det A = \det [a_{jk}] \neq 0 \quad 31$$

gdzie $\det A$ jest wyznacznikiem układu (i), zaś macierz $[A] = a_{jk}$ jest macierzą tego układu.

Każdy zespół liczb x_1, x_2, \dots, x_n , który spełnia układ (i) nazywa się rozwiązaniem układu (i). Według twierdzenia Cramera układ Cramera ma dokładnie jedno rozwiązanie. Dane jest ono wzorem:

$$x_k = \frac{\det A_k}{\det A} \quad (k = 1, 2, \dots, n) \quad 32$$

gdzie macierz A_k powstaje z macierzy A przez zastąpienie k -tej kolumny przez b_1, b_2, \dots, b_n .

Ilustracją powyżej przytoczonych definicji oraz twierdzenia będzie zastosowanie ich do rozwiązania wyprowadzonego układu równań (równanie 28 i 29). Macierz $[A]$ tego układu równań ma postać:

$$[A] = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{bmatrix} \quad 33$$

gdzie

$$a_{11} = k_{-2} - k_1[A]; \quad a_{12} = -(k_1[A] + k_{-1} + k_2)$$

$$a_{21} = -(k_{-3}[P] + k_{-2} + k_3); \quad a_{22} = k_2 - k_{-3}[P]$$

oraz:

$$b_1 = -k_1[A] \cdot [E_t]; \quad b_2 = -k_{-3}[P][E_t]$$

Wyznacznik rozpatrywanego układu ma więc postać:

$$\det A = \begin{vmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{vmatrix} = a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21} = (k_{-2} - k_1[A])(k_2 - k_{-3}[P]) - (k_1[A] + k_{-1} + k_2)(k_{-3}[P] + k_{-2} + k_3) \neq 0 \quad 34$$

Stacjonarne stężenia form enzymu EP i EA są wobec tego równe odpowiednio:

$$\begin{aligned}
 [\text{EP}] &= \frac{\begin{vmatrix} b_1 & a_{12} \\ b_2 & a_{22} \end{vmatrix}}{\det A} = \frac{b_1 a_{22} - b_2 a_{12}}{a_{11} a_{22} - a_{12} a_{21}} = \\
 &= \frac{-k_1[A][E_t] \cdot (k_2 - k_{-3}[P]) - k_{-3}[P] \cdot [E_t] \cdot (k_1[A] + k_{-1} + k_2)}{(k_{-2} - k_1[A])(k_2 - k_{-3}[P]) - (k_1[A] + k_{-1} + k_2)(k_{-3}[P] + k_{-2} + k_3)} \quad 35
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 [\text{EA}] &= \frac{\begin{vmatrix} a_{11} & b_1 \\ a_{21} & b_1 \end{vmatrix}}{\det A} = \frac{a_{11} b_2 - b_1 a_{21}}{a_{11} a_{22} - a_{12} a_{21}} = \\
 &= \frac{-(k_{-2} - k_1[A]) \cdot k_{-3}[P] \cdot [E_t] - k_{-1}[A][E_t](k_{-3}[P] + k_{-2} + k_3)}{(k_{-2} - k_1[A])(k_2 - k_{-3}[P]) - (k_1[A] + k_{-1} + k_2)(k_{-3}[P] + k_{-2} + k_3)} \quad 36
 \end{aligned}$$

Po uporządkowaniu otrzymano:

$$[\text{EP}] = \frac{\{k_1 k_2 [A] + k_{-3} (k_{-1} + k_2) [P]\} \cdot [E_t]}{k_3 (k_{-1} + k_2) + k_{-1} k_{-2} + k_1 (k_3 + k_2 + k_2) [A] + k_3 (k_{-2} + k_{-1} + k_2) [P]} \quad 37$$

$$[\text{EA}] = \frac{\{k_1 (k_{-2} + k_3) [A] + k_{-2} k_{-3} [P]\} \cdot [E_t]}{k_3 (k_{-1} + k_2) + k_{-1} k_{-2} + k_1 (k_3 + k_{-2} + k_2) [A] + k_{-3} (k_{-2} + k_{-1} + k_2) [P]} \quad 38$$

Ogólne równanie szybkości dla rozpatrywanej reakcji enzymatycznej (schemat 1) wyprowadzono w następujący sposób:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_3 [\text{EP}] - k_{-3} [E] \cdot [P] \quad 39$$

[EP] wyznaczono powyżej (równanie 37). [E] wyznacza się korzystając z równań 27 i równań 37 i 38. Po podstawieniu wartości [E] i [EP] do równania 39 otrzymano ogólne równanie opisujące szybkość tworzenia się produktu lub zużywania substratu w reakcji enzymatycznej przedstawionej w schemacie 1.

$$v = \frac{\{k_1 k_2 k_3 [A] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} [P]\} [E_t]}{k_3 (k_{-1} + k_2) + k_{-1} k_{-2} + k_1 (k_3 + k_{-2} + k_2) [A] + k_{-3} (k_{-2} + k_{-1} + k_2) [P]} \quad 40$$

Po zdefiniowaniu następujących stałych kinetycznych (interpretowanych analogicznie jak w równaniu 23):

$$V_A = \frac{k_2 k_3 [E_t]}{k_2 + k_{-2} + k_3} \quad 41$$

$$V_P = \frac{k_{-1} k_2 [E_t]}{k_{-1} + k_2 + k_{-3}} \quad 42$$

$$K_m = \frac{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3}{k_1 (k_3 + k_{-2} + k_2)} \quad 43$$

$$K_p = \frac{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3}{k_{-3} (k_{-1} + k_2 + k_{-2})} \quad 44$$

można równanie 40 zapisać w postaci:

$$v = \frac{V_A \frac{[A]}{K_m} - V_P \frac{[P]}{K_p}}{1 + \frac{[A]}{K_m} + \frac{[P]}{K_p}} \quad 45$$

Z przytoczonego przykładu wynikają następujące wnioski:

a) wyznaczenie stężeń stacjonarnych wolnego enzymu oraz kompleksów enzym-substrat i enzym-produkt metodą wzorów Cramera choć proste w koncepcji jest bardzo żmudne i kłopotliwe w realizacji,

b) gdy rozpatrujemy równania szybkości dla mechanizmów złożonych reakcji enzymatycznych konieczne staje się zdefiniowanie więcej niż jednej stałej Michaelisa i więcej niż jednej szybkości maksymalnej.

Powstaje problem wyboru definicji dla stałych kinetycznych. Muszą one być tak zdefiniowane aby równanie szybkości dla reakcji enzymatycznej przyjęło postać możliwie najprostszą i najdogodniejszą do interpretacji.

4. Schematyczna metoda wyprowadzania równań szybkości dla reakcji enzymatycznych

Metoda, którą poniżej przedstawiono opracowana została przez Kinga i Altmana (10). Opiera się ona na algebraicznych własnościach wyznaczników. Posługiwanie się metodą Kinga i Altmana przy wyprowadzaniu równań szybkości dla reakcji enzymatycznych nie wymaga jednak znajomości tego działu matematyki wyższej.

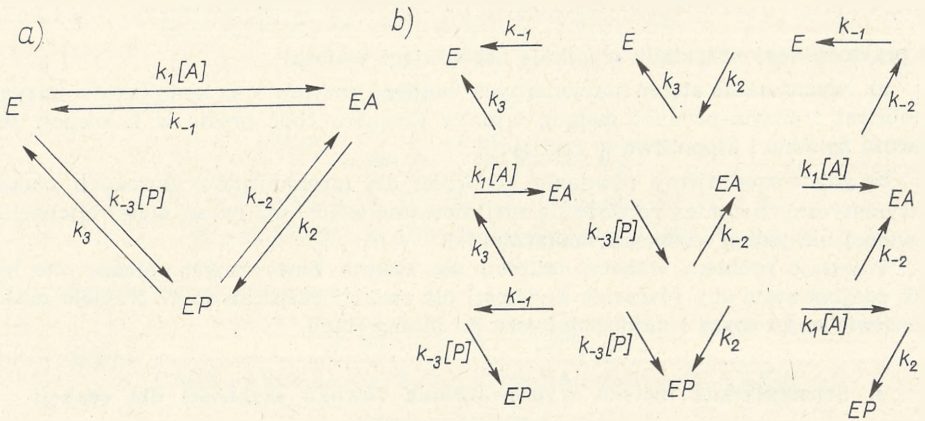
Założmy, że mechanizm reakcji enzymatycznej obejmuje trzy formy enzymu (ogólnie „n” form enzymu) na przykład E, EA i EP (schemat 1).

Zauważono, że wyrażenie opisujące stężenie stacjonarne każdej formy enzymu występującej w dowolnym mechanizmie dowolnej reakcji enzymatycznej (taką dowolną formę enzymu można oznaczyć jako EX) jest ilorazem dwóch sum szeregu członów będących iloczynami stałych szybkości i stężeń reaktantów, pomnożonym przez całkowite stężenie enzymu (E_t) (równania 37 i 38). Każdy człon licznika mianownika takiego wyrażenia jest iloczynem dokładnie (n-1) stałych szybkości gdy mechanizm reakcji obejmował „n” form enzymu. Wobec tego jeżeli w mechanizmie reakcji występują trzy formy enzymu wtedy każdy człon jest iloczynem dwóch stałych szybkości i stężeń reaktantów.

Każdy człon w liczniku wyrażenia opisującego stężenie stacjonarne dowolnej formy enzymu, czyli [EX] obejmuje tylko te stałe szybkości i stężenia tylko tych reaktantów, które prowadzą do powstania formy enzymu EX. Dla ilustracji tych rozważań wykorzystano mechanizm reakcji przedstawiony na schemacie 1, zapisany jednak w innej postaci (schemat 7a).

Ponieważ człony licznika i mianownika wyrażeń opisujących [E], [EA], [EP] mogą zawierać dokładnie dwie stałe szybkości, więc dla me-

chanizmów reakcji z trzema formami enzymu należy rozpatrywać dwu-
 etapowe przemiany prowadzące do powstania tych form enzymu. Dwu-
 etapowe przemiany prowadzące do wytworzenia E, EA i EP obrazuje
 schemat 7b. (Ze schematu tego wynika, że graficzne przedstawienia czło-



Schemat 7. Mechanizm jeden-jeden-dwa centralne kompleksy,
 a) zapis graficzny reakcji, b) graficzne przedstawienie członów reakcji

nów są takie same dla każdej formy enzymu. Różnica polega tylko na
 miejscu, w którym są wprowadzone główki strzałek) Wobec tego liczniki
 wyrażeń opisujących $[E]$, $[EA]$, $[EP]$ są równe odpowiednio:

$$\text{dla formy E} \quad k_{-1}k_3 + k_2k_3 + k_{-1}k_{-2} \quad 46$$

$$\text{dla formy EA} \quad k_1k_3[A] + k_{-2}k_{-3}[P] + k_1k_{-2}[A] \quad 47$$

$$\text{dla formy EP} \quad k_{-1}k_{-3}[P] + k_2k_{-3}[P] + k_1k_2[A] \quad 48$$

Stwierdzono również, że mianownik wyrażenia opisującego $[EX]$ jest
 sumą liczników pochodzących z wyrażeń opisujących stężenia stacjonarne
 wszystkich form enzymu danej reakcji. Tak więc mianowniki wyrażeń
 na $[E]$, $[EA]$ i $[EP]$ są jednakowe i równe sumie przedstawionych powyżej
 liczników:

$$k_3(k_{-1} + k_2) + k_{-1}k_{-2} + k_1(k_3 + k_{-2} + k_2)[A] + k_{-3}(k_{-2} + k_{-1} + k_2)[P] \quad 49$$

Wpisując odpowiednio tak otrzymane liczniki pomnożone przez całkowite
 stężenie enzymu $[E_0]$ i mianownik otrzymamy dla $[EA]$ i $[EP]$ wyrażenia
 identyczne z wyrażeniami wyprowadzonymi po skomplikowanych i żmud-
 nych przekształceniach metodą wyznacznikową (równania 37 i 38).

Pełniejszy wykład metody Kinga i Altmana można znaleźć w litera-
 turze (1, 10, 11, 14).

5. Stosowanie stałych kinetycznych w równaniach szybkości dla reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami

Równania szybkości reakcji enzymatycznych wyrażone przy użyciu stałych szybkości reakcji mogą być przekształcone w równoważne im równania zawierające wyłącznie dające się zmierzyć eksperymentalnie stałe kinetyczne. W tym celu dla równań szybkości reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami należy zdefiniować większą liczbę stałych kinetycznych niż to było potrzebne dla równań szybkości reakcji enzymatycznych z jednym substratem i jednym produktem. W tym ostatnim przypadku zdefiniowano cztery stałe kinetyczne tak jak to było przykładowo pokazane w równaniach 23 i 45.

Wysunięto szereg propozycji odnośnie sposobu definiowania stałych kinetycznych. Bloomfield, Peller i Alberty (2) definiowali stałe kinetyczne oddzielnie dla każdego członu występującego w mianowniku pełnego równania szybkości reakcji enzymatycznej. Nie jest to metoda wygodna, gdyż np. mechanizm uporządkowany trzy-trzy ma w mianowniku równania szybkości już 27 członów co wymaga wprowadzenia 27 stałych kinetycznych. Cleland (4) zaproponował wprowadzenie dwóch stałych kinetycznych dla każdego z reaktantów występujących w reakcji enzymatycznej: stałej Michaelisa dla danego reaktanta i tzw. stałej inhibitorowej. Metoda Clelanda definiowania stałych kinetycznych uznana jest za najlepszą spośród dotychczas zaproponowanych, dlatego też zostanie omówiona dokładniej. Dla uporządkowanych mechanizmów bez alternatywnych sekwencji reakcji metoda Clelanda umożliwia zapisanie pełnych równań szybkości reakcji przy użyciu tylko dwóch maksymalnych szybkości (jednej dla reakcji enzymatycznej „na-przód”, drugiej dla reakcji przebiegającej w kierunku „wstecz”), jednej stałej Michaelisa i jednej stałej inhibitorowej dla każdego reaktanta oraz termodynamicznej stałej równowagi reakcji.

Zasady definiowania stałych kinetycznych zostaną wyjaśnione na przykładzie równania szybkości dla reakcji enzymatycznej przebiegającej według mechanizmu uporządkowanego jeden-dwa przedstawionego już na schemacie 2. Aby wyprowadzić pełne równanie szybkości metodą Kinga, Altmana mechanizm ten zapisano jednak w innej formie (schemat 8a), przedstawiając też graficznie człony występujące w wyrażeniach opisujących stacjonarne stężenia form enzymu: [E], [EA] i [EQ]. (schemat 8b. Wyrażenie opisujące stacjonarne stężenie enzymu w formie niezwiązanej ma postać:

$$[E] = \frac{(k_{-1}k_3 + k_2k_3 + k_{-1}k_{-2}[P])[E_t]}{k_3(k_{-1} + k_2k_3 + k_{-1}k_{-2}[P]) + k_1k_3[A] + k_1k_{-2}[A][P] + k_2k_{-3}[P][Q] + (k_{-1}k_{-3}[Q] + k_1k_2[A] + k_2k_{-3}[Q])} \quad 50$$

Po uporządkowaniu zaś

$$[E] = \frac{\{k_3(k_{-1} + k_2) + k_{-1}k_{-2}[P]\} [E_t]}{k_3(k_{-1} + k_2) + k_1(k_2 + k_3)[A] + k_{-1}k_{-2}[P] + k_{-3}(k_{-1} + k_2)[Q] + k_1k_{-2}[A][P] + k_2k_{-3}[P][Q]} \quad 51$$

W analogiczny sposób wyznaczono stężenia EA i EQ

52

$$[EA] = \frac{(k_1 k_3 [A] + k_1 k_{-2} [P][A] + k_{-2} k_{-3} [P][Q]) \cdot [E_t]}{k_3 (k_{-1} + k_2) + k_1 (k_2 + k_3) [A] + k_{-1} k_{-2} [P] + k_{-3} (k_{-1} + k_2) [Q] + k_1 k_{-2} [A][P] + k_{-2} k_{-3} [P][Q]}$$

53

$$[EQ] = \frac{(k_{-1} k_{-3} [Q] + k_1 k_2 [A] + k_2 k_{-3} [Q]) [E_t]}{k_3 (k_{-1} + k_2) + k_1 (k_2 + k_3) [A] + k_{-1} k_{-2} [P] + k_{-3} (k_{-1} + k_2) [Q] + k_1 k_{-2} [A][P] + k_{-2} k_{-3} [P][Q]}$$

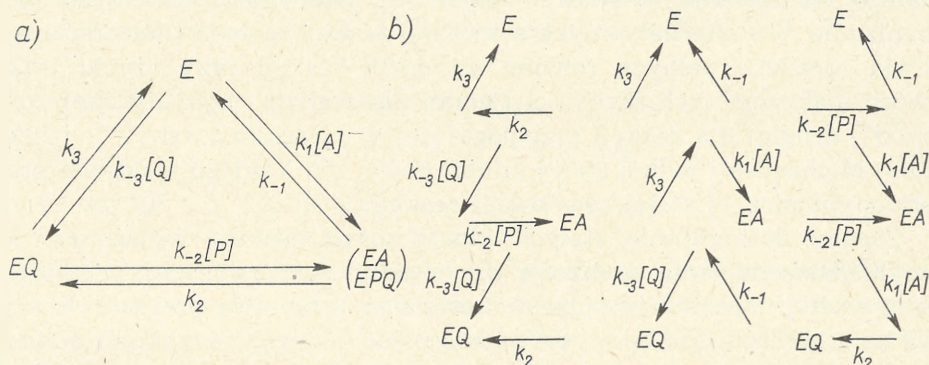
Szybkość zużywania substratu A w rozpatrywanej reakcji enzymatycznej można opisać równaniem:

$$v = - \frac{d[A]}{dt} = k_1 [E][A] - k_{-1} [EA] \quad 54$$

Po podstawieniu do równania 54 wyznaczonych wartości [E] i [EA] (równanie 51 i 52) oraz po wymnożeniu i uproszczeniu otrzymano:

$$v = \frac{(k_1 k_2 k_3 [A] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} [P][Q]) [E_t]}{k_3 (k_{-1} + k_2) + k_1 (k_2 + k_3) [A] + k_{-1} k_{-2} [P] + k_{-3} (k_{-1} + k_2) [Q] + k_1 k_{-2} [A][P] + k_{-2} k_{-3} [P][Q]} \quad 55$$

Równanie 55 jest pełnym równaniem szybkości reakcji przebiegającej według mechanizmu uporządkowanego jeden-dwa.



Schemat 8. Reakcja jeden-dwa przebiegająca wg mechanizmu sekwencyjnego uporządkowanego

a) zapis graficzny reakcji, b) graficzne przedstawienie członów reakcji

Pełne równania szybkości dla reakcji enzymatycznych są zawsze wyrażeniami złożonymi z licznika i mianownika. W liczniku występują z reguły dwa człony (na przykład równanie 55 lub 40). Człon dodatni jest iloczynem stałych szybkości i stężeń reaktantów (substratów) biorących udział w reakcji „naprzód”. Człon ujemny jest iloczynem stałych szyb-

kości i stężeń reaktantów (produktów) biorących udział w reakcji „wstecz”. Mianownik składa się z większej liczby członów niż licznik. W równaniu 55 występuje na przykład sześć członów. Każdy człon mianownika jest iloczynem stałych szybkości lub sum poszczególnych stałych szybkości i stężeń różnej liczby reaktantów.

Okazało się, że dla celów interpretacji wygodne jest zapisywanie pełnych równań szybkości złożonych reakcji enzymatycznych przy użyciu współczynników, w których są zebrane wszystkie stałe szybkości. Współczynniki członów licznika zostały oznaczone jako (licznik 1) i (licznik 2) odpowiednio dla dodatniego i ujemnego członu. Współczynniki członów mianownika otrzymały nazwę od występujących w tych członach substratów czy produktów. Równanie 55 może być zapisane w opisanej powyżej postaci współczynnikowej w sposób następujący:

$$v = \frac{\text{licznik}}{\text{mianownik}} \quad 56$$

gdzie: licznik = {(licznik 1) [A] - (licznik 2) [P] [Q] [E]_t}

mianownik = (stała) + (współcz. A) [A] + (współcz. P) [P] + (współcz. Q) [Q] + (współcz. PQ) [P] [Q] + (współcz. AP) [A] [P]

Maksymalne szybkości reakcji w każdym z dwóch kierunków (kierunek „naprzód” i kierunek „wstecz”) definiuje Cleland jako ilorazy współczynnika członu licznika dla reakcji w danym kierunku i współczynnika członu mianownika zawierającego iloczyn stężeń wszystkich substratów dla reakcji w tym samym kierunku pomnożony przez [E]_t. Szybkości maksymalne oznaczono V₁ i V₂ odpowiednio dla reakcji „naprzód” i reakcji „wstecz”. Wyrażają one szybkość reakcji enzymatycznej przy założeniu, że wszystkie substraty dla reakcji w danym kierunku są w stężeniu nasycającym, zaś wszystkie produkty w stężeniu zerowym.

Dla mechanizmu uporządkowanego, jeden-dwa zatem:

$$V_1 = \frac{(\text{licznik 1}) \cdot [E_t]}{(\text{współcz. A})} = \frac{k_1 k_2 k_3 [E_t]}{k_1 (k_2 + k_3)} = \frac{k_2 k_3 [E_t]}{k_2 + k_3} \quad 57$$

$$V_2 = \frac{(\text{licznik 2}) \cdot [E_t]}{(\text{współcz. PQ})} = \frac{k_{-1} k_{-2} k_{-3} [E_t]}{k_{-2} k_{-3}} = k_{-1} \cdot [E_t] \quad 58$$

V₁ i V₂ mierzą zmiany stężenia na jednostkę czasu, zaś $\frac{V_1}{[E_t]}$ i $\frac{V_2}{[E_t]}$ są liczbami obrotów dla reakcji „naprzód” i „wstecz”. Cleland zaproponował również aby stałe Michaelisa i stałe inhibitorowe były definiowane jako ilorazy członów mianownika. Stałe Michaelisa będą oznaczane K_a, K_p, K_q, stałe inhibitorowe zaś jako K_{ia}, K_{ip}, K_{iq}. Stałe Michaelisa i stałe inhibitorowe mają wymiar stężeń. Jako regułę przyjęto, że wyrażenie na stałą

Michaelisa ma ten sam mianownik co wyrażenie na szybkość maksymalną w kierunku, w którym rozpatrywany reaktant jest substratem. Tak więc dla reakcji enzymatycznej przebiegającej według mechanizmu uporządkowanego jeden-dwa stałe Michaelisa zostały zdefiniowane jako:

$$K_a = \frac{\text{stała}}{\text{współcz. A}} = \frac{k_3(k_{-1}+k_2)}{k_1(k_2+k_3)} \quad 59$$

$$K_p = \frac{\text{współcz. Q}}{\text{współcz. PQ}} = \frac{k_{-3}(k_{-1}+k_2)}{k_{-3}k_{-2}} = \frac{(k_{-1}+k_2)}{k_{-2}} \quad 60$$

$$K_q = \frac{\text{współcz. P}}{\text{współcz. PQ}} = \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_{-3}k_{-2}} = \frac{k_{-1}}{k_{-3}} \quad 61$$

Należy pamiętać, że zdefiniowane w ten sposób stałe Michaelisa są stałymi granicznymi. Gdy np. stężenie A jest zmieniane, K_a jest osiągnięte tylko wtedy, gdy wszystkie inne substraty (gdy w reakcji bierze udział więcej niż jeden substrat) są w stężeniach nasycających. W innych warunkach można wyznaczyć tzw. pozorną stałą Michaelisa dla substratu A (K_a'). Wartość K_a' jest niższa od wartości K_a . Definicje stałych inhibitorowych wybiera Cleland spośród pozostałych możliwych ilorazów członów mianownika, tak aby współczynniki tych członów mogły być wyrażone przy użyciu stałych kinetycznych, gdy równanie szybkości w formie współczynnikowej jest pomnożone przez odpowiedni mnożnik. Tym mnożnikiem jest (licznik 2) podzielony przez iloczyn dwóch członów mianownika użytych w definiowaniu szybkości maksymalnych. Dla mechanizmu uporządkowanego jeden-dwa ten mnożnik ma postać:

$$\frac{(\text{licznik 2}) \cdot [E_t]}{\text{współcz. A} \cdot \text{współcz. PQ}} = \frac{k_{-1}k_{-2}k_{-3}[E_t]}{k_1(k_2+k_3)k_{-2}k_{-3}} = \frac{k_{-1} \cdot [E_t]}{k_1(k_2+k_3)} \quad 62$$

Poniżej przedstawiono stałe inhibitorowe dla reakcji enzymatycznej przebiegającej według rozpatrywanego mechanizmu:

$$K_{ia} = \frac{\text{współcz. P}}{\text{współcz. AP}} = \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_1k_{-2}} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad 63$$

$$K_{ip} = \frac{\text{współcz. A}}{\text{współcz. AP}} = \frac{k_1(k_2+k_3)}{k_1k_{-2}} = \frac{k_2+k_3}{k_{-2}} \quad 64$$

$$K_{iq} = \frac{\text{stała}}{\text{współcz. Q}} = \frac{k_3(k_{-1}+k_2)}{k_{-3}(k_{-1}+k_2)} = \frac{k_3}{k_{-3}} \quad 65$$

Stałą termodynamiczną równowagi oznaczoną K_{eq} zdefiniowano następującym wyrażeniem:

$$K_{eq} = \frac{\text{Licznik 1}}{\text{Licznik 2}} \quad 66$$

które dla rozpatrywanego mechanizmu przyjmuje postać:

$$K_{eq} = \frac{k_1k_2k_3}{k_{-1}k_{-2}k_{-3}} \quad 67$$

Zdefiniowane różne stałe kinetyczne nie są wielkościami niezależnymi. Łącznie ze stałą równowagi termodynamicznej połączone są one zależnością zwaną zależnością Haldane'a. Wyraża to równanie w postaci:

$$K_{eq} = \left(\frac{V_1}{V_2} \right)^n \frac{K_{(p)} \cdot K_{(q)} \cdot K_{(r)} \cdots}{K_{(a)} \cdot K_{(b)} \cdot K_{(c)} \cdots} \quad 68$$

gdzie $K_{(a)}$ można oznaczać albo K_a , albo K_{i_a} itd. Pełniejsze przedyskutowanie zależności Haldane'a czytelnik znajdzie w literaturze źródłowej (4, 8). Zależność Haldane'a obejmuje stałe Michaelisa lub stałe inhibitorowe dla każdego reaktantu reakcji enzymatycznej. Zawsze jest przynajmniej jedna zależność Haldane'a choć zwykle jest ich więcej. Dla reakcji przebiegającej według mechanizmu uporządkowanego jeden-dwa są dwie zależności Haldane'a:

$$K_{eq} = \frac{V_1}{V_2} \cdot \frac{K_{i_p} K_q}{K_{i_a}} \quad 69$$

$$K_{eq} = \frac{V_1}{V_2} \cdot \frac{K_p K_{i_q}}{K_a} \quad 70$$

Podstawiając konkretne wartości zamiast stałych kinetycznych występujących w zależnościach Haldane'a czytelnik sprawdzi z łatwością, że zależności te są prawdziwe. Dalej, korzystając z definicji szybkości maksymalnych, stałych Michaelisa i stałych inhibitorowych czytelnik może również sprawdzić prawdziwość podanych niżej zależności pomiędzy stałymi szybkości dla poszczególnych przemian reakcji enzymatycznej a mierzalnymi w doświadczeniu stałymi kinetycznymi:

$$k_1 = \frac{V_2}{K_{i_a} \cdot [E_t]} \quad 71$$

$$k_{-1} = \frac{V_2}{[E_t]}; \quad \frac{1}{k_2} = \frac{[E_t]}{V_1} - \frac{1}{k_3}; \quad 72$$

$$k_{-2} = \frac{k_{-1} + k_2}{K_p} \quad 73$$

$$k_3 = \frac{K_{i_q} V_2}{K_q [E_t]}; \quad k_{-3} = \frac{V_2}{k_q [E_t]} \quad 74$$

Widać teraz, że również pełne równanie szybkości dla złożonych reakcji enzymatycznych można przedstawić tylko przy pomocy mierzalnych w doświadczeniu stałych kinetycznych (4). Ogólna metoda jest następująca: równanie szybkości reakcji w formie współczynnikowej należy pomnożyć przez zdefiniowany powyżej mnożnik. W ogólnym przypadku licznik równania szybkości przyjmuje wtedy postać:

$$V_1 V_2 [A][B][C] \cdots - \frac{V_1 V_2}{K_{eq}} [P][Q][R] \cdots \quad 75$$

zaś człony mianownika zawierają V_2 albo $\frac{V_1}{K_{eq}}$

Następnie jeżeli chcemy rozpatrywać reakcję „naprzód” należy podzielić równanie 75 przez V_2 . Człony $\frac{V_1}{V_2 K_{eq}}$ można wyeliminować korzystając z odpowiedniej zależności Haldane'a. Licznik przyjmuje wtedy postać:

$$V_1 \left([A][B][C] \dots - \frac{[P][Q][R] \dots}{K_{eq}} \right) \quad 76$$

zaś człony mianownika oprócz stężeń reaktantów zawierają tylko stałe Michaelisa i stałe inhibitorowe.

Przedstawiona powyżej metoda prowadząca do zapisu pełnych równań szybkości złożonych reakcji enzymatycznych wyłącznie przy pomocy stałych kinetycznych mierzalnych eksperymentalnie stosuje się tylko do uporządkowanych mechanizmów z dowolną ilością produktów i substratów. Pełniejsza dyskusja równań szybkości dla mechanizmów typu ping-pong znajduje się w pracach Clelanda (4, 5).

Opisaną metodę zastosowano poniżej do przekształcenia równania szybkości dla reakcji przebiegającej według mechanizmu uporządkowanego jeden-dwa. Mnożąc licznik i mianownik równania szybkości w postaci współczynnikowej przez $\frac{(\text{Licznik } 2) \cdot [E^1]}{(\text{współcz. A}) (\text{współcz. PQ})}$ otrzymano:

$$V = \frac{\frac{(\text{licznik } 1) (\text{licznik } 2)[A]}{(\text{współcz. A}) (\text{współcz. PQ})} - \frac{(\text{licznik } 2)^2 [P] \cdot [Q]}{(\text{współcz. A}) (\text{współcz. PQ})}}{\frac{\text{stała} \cdot \text{licznik } 2}{(\text{współcz. A}) \cdot (\text{współcz. PQ})} + \frac{(\text{współcz. A})[A] \cdot \text{licznik } 2}{(\text{współcz. A}) \cdot (\text{współcz. PQ})} + \frac{(\text{współcz. P})[P] \cdot \text{licznik } 2}{(\text{współcz. A}) \cdot \text{współcz. PQ}} + \dots} \quad 77$$

po uporządkowaniu i skorzystaniu z odpowiednich definicji otrzymano:

$$v = \frac{V_1 V_2 \left([A] - \frac{[P][Q]}{K_{eq}} \right)}{K_a V_2 + V_2 [A] + \frac{K_q V_1 [P]}{K_{eq}} + \frac{K_p V_1 [Q]}{K_{eq}} + \frac{V_1 [P][Q]}{K_{eq}} + \frac{V_2 [A][P]}{K_{ip}}} \quad 78$$

Jest to pełne równanie szybkości reakcji dla mechanizmu uporządkowanego jeden-dwa wyrażone całkowicie w stałych kinetycznych mierzalnych eksperymentalnie.

Zakończenie

Czytelnikowi może się nasunąć pytanie jakimu celowi ma służyć wyprowadzanie pełnych równań szybkości dla mechanizmów reakcji enzymatycznych o dwóch lub więcej substratach, produktach i formach enzymu. Częściowo postaram się odpowiedzieć na to pytanie już w chwili

obecnej, częściowo odpowiedź wyniknie z następnego artykułu poświęconego technikom badania mechanizmów reakcji enzymatycznych wypracowanych w oparciu o naszkicowaną powyżej teorię (5, 7, 8) oraz wynikiom prac nad mechanizmami reakcji enzymatycznych wykonanych przy użyciu tych technik (8).

Pełne równanie szybkości reakcji enzymatycznej opisuje zachowanie się systemu enzymatycznego w dowolnym czasie, zarówno blisko jak i daleko od punktu równowagi. Jeżeli reakcja jest badana w warunkach stężeń dalekich od stanu równowagi ujemny człon lub człony w liczniku równania szybkości możemy opuścić, jednakże warunek, że reakcja jest daleko od stanu równowagi nie pozwala opuścić jakiegokolwiek z członów mianownika. Dysponując pełnym równaniem można łatwo otrzymać równanie uproszczone jakiego wymagają potrzeby doświadczenia, gdy stężenie jednego lub kilku reaktantów jest równe zeru.

Również rozpatrując hamowanie produktami oraz początkowe szybkości nie potrzebujemy wyprowadzać dodatkowych równań. Uproszczenie czy modyfikacja pełnego równania szybkości daje od razu poszukiwaną zależność.

LITERATURA

1. Amdur I., Hammes G. G., *Chemical Kinetics: Principles and Selected Topics*, New York, 1966.
2. Bloomfield V., Peller L., Alberty R. A., *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 4367 (1962).
3. Christensen H. N., Palmer G. A., *Enzyme Kinetics, a learning program for students of the biological and medical sciences*, Philadelphia and London, 1967.
4. Cleland W. W., *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 104 (1963).
5. Cleland W. W., *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 173 (1963).
6. Cleland W. W., *Biochim. Biophys. Acta* **67**, 188 (1963).
7. Cleland W. W., *Nature* **198**, 463 (1963).
8. Cleland W. W., *Ann. Rev. Biochem.* **35**, 85 (1966).
9. Grabowski Z. R., *Post. Biochem.* **8**, 3 (1963).
10. King E. L., Altman C. J., *J. Phys. Chem.* **60**, 1375 (1956).
11. Mahler H. R., Cordes E. H., *Biological Chemistry*, New York, 1966.
12. Mostowski A., Stark M., *Elementy algebry wyższej*, Warszawa, 1965.
13. Sikorska E. A., *Post. Biochem.* **9**, 393 (1963).
14. Volkenstein M. V., Goldstein B. N., *Biochim. Biophys. Acta* **115**, 471 (1966).

Laureaci nagrody Nobla w 1968 roku R. W. Holley, H. G. Khorana, M. W. Nirenberg

Nagrodę Nobla za rok 1968 w dziedzinie nauk przyrodniczych otrzymali wspólnie: Robert W. Holley z Instytutu Salka, Har Gobind Khorana z Uniwersytetu stanu Wisconsin oraz Marshall W. Nirenberg z *National Institutes of Health* (wszyscy z USA). Choć nagroda jest wspólna, a i dziedzina ich aktywności naukowej ta sama, to jednak badacze ci nie stanowią jednego zespołu. Pracowali i czynili swoje odkrycia niezależnie, tyle tylko, że odkrycia te doskonale uzupełniają się wzajemnie.

Pierwszym dużym osiągnięciem Nirenberga było otrzymanie, wspólnie z Matthaei pracującym teraz w Instytucie Maxa Plancka w Getyndze, układu bezkomórkowego z *Escherichia coli*, włączającego aminokwasy do białka *in vitro*. Układ ten, dziś już klasyczny i nadal powszechnie stosowany, reagował na dodatek RNA zwiększeniem poziomu włączania aminokwasów do polipeptydu. Był to jeden z koronnych dowodów na rzecz teorii Jacoba i Monoda, że DNA nie sam jest matrycą w syntezie polipeptydów, lecz spełnia tę rolę poprzez cząsteczkę odpowiedniego RNA, który jest jego repliką. Dalej — Nirenberg wykorzystuje odkryty wcześniej przez Marię Grunberg-Manago enzym, fosforylaze polinukleotydom, do syntezy sztucznej matrycy, homopolinukleotydu złożonego wyłącznie z reszt kwasu urydylowego. Kwas poliurydylowy okazuje się niezmiernie aktywną matrycą, stymulującą prawie wyłącznie włączanie jednego tylko aminokwasu, fenyloalaniny, przy czym powstaje homopolipeptyd, polifenyloalanina. Moment ten jest jednoznaczny z odkryciem pierwszego kodonu. Odtąd wiadomo już było, że miejsce fenyloalaniny w białku określane jest przez odcinek mRNA zawierający wyłącznie reszty U. Z innych laboratoriów nadeszły wyniki prac nad kwasem poliadenylowym i policytydylowym (kodują odpowiednio lizynę i prolinę).

Inaczej jest z polinukleotydami złożonymi z więcej niż jednego rodzaju nukleotydów. Fosforylaza polinukleotydoma syntetyzuje polinukleotyd bezładnie, a enzymu odwzorowującego sekwencję DNA, czyli syntetazy RNA zależnej od DNA, nie można było do tych celów wykorzystać, przede wszystkim z braku polidezoksyrybonukleotydów o znanej sekwencji zasad w łańcuchu. Nie potrafiono też określać kolejności występowania nukleotydów w cząsteczce RNA, chyba, że byłyby to oligonukleotyd odpowiednio krótki. Ten właśnie moment wykorzystuje Nirenberg i tworzy, wraz z Lederem, nową metodę badania kodu genetycz-

nego w oparciu o interakcję ^{14}C -aminoacylo-tRNA z kompleksem rybosom-oligonukleotyd. Drogą hydrolizy RNA otrzymuje Nirenberg oligonukleotydy złożone z 2, 3, 4 i więcej reszt. Po rozdziale chromatograficznym i otrzymaniu czystych frakcji stosunkowo łatwo jest określić w nich tak rodzaj, jak i kolejność występowania nukleotydów. Odpowiednie homogenne pod względem składu zasad i długości frakcje oligonukleotydowe łączono z rybosomami na sączkach nitrocelulozowych. Następnie przez sączek taki przepuszczano roztwory ^{14}C -aminoacylo-tRNA. Tylko ten aminoacylo-tRNA był zatrzymywany na sączku, który przyłączył się do kompleksu oligonukleotydu z rybosomem, przyłączenie zaś jest możliwe jedynie wtedy gdy antykodon tRNA ma skład zasad komplementarny (wg. reguł Watsona i Cricka) do nukleotydów danego oligonukleotydu — kodonu. Dzięki tej technice dowiedziono ostatecznie słuszności wielu założeń teoretycznych Cricka, takich jak jego hipoteza adaptorowa, tryplet jako jednostka kodująca, uniwersalność kodu genetycznego, nie nakładanie się trypletów kodu na siebie, dzięki niej wreszcie określono skład i sekwencję zasad trójnukleotydów kodujących wszystkie występujące w białku aminokwasy. Słowem — ustalono cechy kodu genetycznego.

Wkrótce po odkryciu biologicznej funkcji tRNA, polegającej na przyłączaniu aminokwasów (Hoagland i współpracownicy) oraz przenoszeniu ich do aparatu syntetyzującego białko, scharakteryzowano dość dokładnie tę grupę związków, zresztą bardzo homogenną pod względem wielkości cząstek. Stwierdzono, że cząsteczka tRNA ma duży stopień uporządkowania, liczba występujących w niej nukleotydów nie przekracza 100, a pomimo iż każdy aminokwas ma swój „własny” rodzaj tRNA — to jednak wszystkie tRNA mają na końcu akceptorowym łańcucha charakterystyczny trójnukleotyd ...CCA. Wiedzano też, że jakiś trójnukleotydowy fragment łańcucha tRNA musi spełniać funkcję antykodonu, czyli mieć strukturę komplementarną wobec kodonu dla danego aminokwasu, ale by go znaleźć trzeba było przedtem poznać budowę pierwszorzędową cząsteczki tRNA. I tego właśnie dokonał zespół Roberta Holley'a. Warunkiem podstawowym było otrzymanie czystych frakcji tRNA specyficznych dla określonych aminokwasów. Otrzymano je stosując metodę rozdziału w przeciwnym kierunku. Następnie Holley posłużył się odpowiednimi enzymami nukleolitycznymi, zastosował więc metodykę koncepcyjnie zbliżoną do tej, którą Sanger, wykorzystując proteazy, opracował dla białek. Holley używał RNazę T1 z takadiastazy oraz RNazę z trzustki. Oba te enzymy cechuje pewna wybiórczość w działaniu. RNaza T1 hydrolizuje wiązania fosfodwuestrowe w sąsiedztwie reszty kwasu guanilowego, trzustkowa zaś w sąsiedztwie reszt kwasów urydylowego i cytydylowego. Dodatkowym czynnikiem zwiększającym selektywność działania nukleolitycznego RNazy T1 była temperatura. Ciąg dalszy pracy zespołu Holley'a to rozdzielanie produktów enzymatycznej hydrolizy tRNA, określe-

nie sekwencji nukleotydów w poszczególnych fragmentach i wreszcie część najtrudniejsza, odtworzenie z tych fragmentów całego łańcucha tRNA. Aby docenić skalę trudności tego przedsięwzięcia wystarczy uzmysłowić sobie, że istnieją tysiące kombinacji, w jakich z szeregu małych cząstek zestawień można pewną całość, a przecież jedna tylko z nich będzie prawdziwa. Holley wykorzystał też fakt, że tRNA zawiera dość dużo nietypowych zasad, takich jak pseudouracyl, dwuhydrouracyl, kwas 4-tiourydylowy, kwas rybotymidylowy i inne, które rozmieszczone wzdłuż łańcucha były niejako wyznacznikami podczas „składania” zbadanych fragmentów w całość. W efekcie latem 1965 roku dowiedzieliśmy się, że budowa cząsteczki pierwszego biologicznie czynnego kwasu rybonukleinowego została rozszyfrowana. Był to tRNA specyficzny dla alaniny, pochodzący z drożdży. Metoda Holley’a, aczkolwiek trudna i złożona, nie należy jednak do rzędu tych, których powtórzenie udaje się jedynie ich autorom. Przeciwnie, przejęto ją z sukcesem w szeregu laboratoriów, w wyniku czego określono strukturę pierwszorzędową kilku dalszych rodzajów tRNA, jak również tzw. RNA 5S oraz pewnych fragmentów rybosomowego RNA.

Trzeci z laureatów nagrody Nobla, pochodzący z Indii Har Gobind Khorana, tematycznie bliższy Nirenbergowi, jest chemikiem i w pracach jego metody biologiczne splatają się z czysto chemicznymi. Khorana doprowadził do doskonałości sposoby chemicznej syntezy polidezoksyrybonukleotydów; uzyskuje produkt o żądanej wielkości oraz składzie i sekwencji nukleotydów. Można to chyba nazwać pierwszymi próbami syntezy genów *in vitro*. Następnie, wprowadzając syntezę RNA zależną od DNA, otrzymuje on repliki syntetyzowanych polidezoksyrybonukleotydów — nici RNA o własnościach mRNA. Przystosowując tę metodę do syntezy matryc polinukleotydowych złożonych z powtarzających się, naprzemiennie ułożonych oligonukleotydów Khorana doskonale uzupełnił wyniki prac Nirenberga, ugruntował ponadto definicje szeregu innych cech charakterystycznych kodu genetycznego. Dzięki jego pracom poznano ostatecznie kierunek odczytywania łańcucha mRNA w procesie translacji. Wreszcie bez opanowanej przez niego metody syntezy kopolinukleotydów złożonych z powtarzających się, takich samych i znanych fragmentów, trudno byłoby badać szerzej zjawisko dwuznaczności kodu genetycznego. Khorana rozstrzygnął także większość problemów związanych z kodowaniem aminokwasów bezpośrednio przez łańcuch DNA, z pominięciem matrycy RNA. Specyficzność kodonów złożonych z reszt dezoksyrybonukleotydów okazała się identyczna z tą, jaką obserwujemy w przypadku matrycy RNA i to w odniesieniu do wszystkich aminokwasów. Odczytywanie zdenaturowanego DNA jako bezpośredniej matrycy wymaga obecności neomycyny w układzie, a *in vivo* zapewne nie zachodzi nigdy, jednak jego teoretyczne znaczenie dla poznania prawidłowości kodu genetycznego było bardzo duże. Ostatnio Khorana doniósł

o planach zsyntetyzowania łańcucha takiego polidezoksyrybonukleotydu, który, po skopiowaniu go przez syntetazę RNA, dałby cząsteczkę odpowiedniego tRNA. A więc — jednak synteza genów *in vitro*.

W ostatnich latach dość często, jak się wydaje, występowało zjawisko pewnego rozdziewu między stroną koncepcyjną a eksperymentalną określonych problemów. Jest to zresztą naturalną konsekwencją burzliwego rozwoju jakiegokolwiek dziedziny wiedzy, a tym bardziej dziedziny tak trudnej i złożonej, jak kod genetyczny i mechanizm biosyntezy białka. Na tym tle ze szczególną ostrością rysuje się jedna zwłaszcza cecha, wspólna całej trójce laureatów. Jest nią dar rewolucjonizowania nie tylko koncepcji, lecz także i metody. Terminologia kodu genetycznego zawiera, między innymi, takie pojęcia, jak „tryplet bezsensowny” lub „tryplet znaczący”. W tygodniku *Science*, pani Maxine F. Singer pisze o Holley’u, Khoranie i Nirenbergu, że razem stanowią oni „a triplet of great sense”. Myślę, że z tym określeniem zgodzimy się wszyscy.

S. Klita

RECENZJE

Advances in Enzyme Regulation, red. G. Weber, tom V. Pergamon Press,
Londyn 1967; str. 469, cena £ 6 10 s.

Tom ten jest dalszym ciągiem cennego wydawnictwa, które zawiera publikację wykładów i dyskusji wygłaszanych na dorocznie odbywających się sympozjach w Indianapolis, U.S.A. Tematem obrad piątego sympozjum, które odbyło się w październiku 1966 roku była biochemia regulacji aktywności i syntezy enzymów w normalnych i nowotworowych tkankach ssaków.

Sesja pierwsza, której przewodniczył Sir H. A. Krebs dotyczyła mikrofluorymetrycznych oznaczeń stężenia zred. NAD w poszczególnych frakcjach komórkowych oraz badań *in vitro* i *in vivo* nad biosyntezą NAD z różnych prekursorów w wątrobie. Tematem drugiej sesji, prowadzonej przez R. E. Olsona oraz sesji ósmej, której przewodniczył H. A. Lardy był wpływ hormonów na regulację aktywności enzymatycznej w różnych narządach. H. G. Williams-Ashman przewodniczył sesji trzeciej, traktującej o kontroli metabolizmu glutaminy w mitochondriach nerek, wątroby i mózgu oraz regulacji syntezy amoniaku w nerkach szczura. Sesja czwarta (przewodniczący V. R. Potter) była poświęcona regulacji metabolizmu poprzez indukcję lub hamowanie biosyntezy enzymu jak to ma miejsce w przypadku oksydoreduktazy glukozy-6-fosforan: NADP oraz enzymów biorących udział w syntezie seryny w wątrobie. Piąta sesja, której przewodniczył N. Kretchmer dotyczyła roli enzymów w ontogenezie. Omówiono system katalizujący syntezę tauryny w rozwoju zarodka jaja kurzego oraz aktywność polimerazy RNA i szybkość syntezy RNA w wątrobie w czasie rozwoju szczura. C. F. Cori przewodniczył sesji szóstej, która stanowiła przegląd porównawczy mechanizmów regulacji enzymów u ssaków i mikroorganizmów. Zagadnieniom kontroli glukoneogenezy, ketogenezy i glikolizy była poświęcona sesja siódma (przewodniczący G. F. Cahill Jr.). W sesji dziewiątej, prowadzonej przez W. E. Knoxa omówiono regulujący wpływ witaminy E na aktywność fosfotransferazy ATP: kreatyna w osoczu krwi królika oraz rolę izoenzymów 6-fosfotransferazy ATP: glukoza. W tej sesji również, rozpatrywano teoretycznie pojęcie sprzężenia zwrotnego. W sesji dziesiątej (przewodniczący S. Weinhouse) zajmowano się regulacją enzymów w tkankach nowotworowych. Przedstawiono badania *in vivo* nad wpływem czynników rakotwórczych na aktywność polimerazy RNA oraz wpływ głodzenia, glukagonu i naświetlania na aktywność aminotransferazy tyrozynowej i pirolazy tryptofanowej u szczura. Ostatnia, jedenasta sesja, której przewodniczył Sir H. A. Krebs dotyczyła badań nad ustaleniem stosunku stężeń NAD i zred. NAD w cytoplazmie i mitochondriach wątroby szczura oraz czynników regulujących ten układ oksydoredukcyjny.

Tom V jest źródłem dalszych, nowych informacji z dziedziny badań nad regulacją metabolizmu. Wartość jego podnosi dodatkowo wykaz literatury, załączony do każdego wykładu.

K. Bełżecka

Urea as a Protein Supplement red. Michael H. Briggs, Pergamon Press, Oxford, 1967; stron 466, cena \$ 8.00

Badania omówione w niniejszej książce mają na celu znalezienie nowych dróg hodowli żywca, które mogłyby zapewnić dostarczenie takiej ilości białka zwierzęcego, jaka będzie niezbędna naszej gwałtownie rosnącej populacji, przewidzianej na 6—7 miliardów pod koniec XX wieku. Z badań ostatnich lat wynika, że mocznik wytwarzany syntetycznie w prawie dowolnych ilościach otwiera nowe, korzystne perspektywy. Wydaje się, że dokarmianie mocznikiem bydła domowego, conajmniej przez 7 miesięcy w roku może wystarczająco zabezpieczyć rosnące zapotrzebowanie ludzkości na zwierzęce białko, bez powiększenia areału rolniczego przewidzianego dla hodowli.

26 specjalistów z 11 krajów (między innymi R. Ryś, Instytut Zootechniki, Kraków) przedstawia zbiór poglądów i doświadczeń nad użytkowaniem mocznika jako uzupełniającego źródła azotu w żywieniu zwierząt przeżuwających. Omówione są między innymi zagadnienia dotyczące przemian azotowych związków niebiałkowych w przewodzie pokarmowym przeżuwaczy, wpływ tych przemian na metabolizm bakterii, warunki przyswajania mocznika i jego toksyczność. Najwięcej miejsca poświęcono stosowaniu mocznika u przeżuwaczy, aczkolwiek nie pominięto badań dotyczących drobiu, świń i owiec. Prace te dostarczyły szczególnie dużo danych o mikrobiologii i biochemii przemian w żwaczu.

Książka stanowi przegląd badań ogłoszonych do 1965 roku włącznie i obejmuje około 1500 odnośników do światowego piśmiennictwa. Piękny i przystępny styl, wzorowa szata zewnętrzna to dodatkowe zalety tego podstawowego przewodnika w studiach nad wykorzystaniem mocznika jako cennego dodatku paszowego dla wykarmiania bydła domowego.

Książkę można zalecić wszystkim pracownikom zajmującym się teoretycznymi i praktycznymi aspektami hodowli zwierząt domowych, nie wyłączając fizjologów, mikrobiologów i biochemików.

I. Reifer

SPRAWOZDANIA I KOMUNIKATY

Symposium Biochemii Wirusów Roślin

Kraków 2—7.VII.1968 roku

Problemy biochemii wirusów roślinnych budzą obecnie żywe zainteresowanie wirusologów. W Polsce zajmuje się tymi zagadnieniami między innymi Pracownia Wirusologii Roślin przy Zakładzie Fizjologii Roślin PAN w Krakowie, kierowana przez Prof. dr A. Kozłowską. Ośrodek ten nawiązał dzięki stażom naukowym liczne kontakty z instytutami naukowymi zagranicą. Doceniając znaczenie bezpośredniej dyskusji i wymiany poglądów dla rozwoju badań postanowiono zorganizować symposium poświęcone tematowi „Biochemia wirusów”.

Symposium odbyło się w dniach 2—7 lipca 1968 r. w Oddziale PAN w Krakowie pod protektorem V Wydziału PAN i Rektora Wyższej Szkoły Rolniczej w Krakowie Prof. dr T. Ruebenbauera. W Symposium wzięło udział kilkadziesiąt osób, w tym kilkunastu uczestników z zagranicy. Naczelnymi problemami omawianymi na Symposium były: 1) synteza wirusa w komórce roślinnej w aspekcie biochemiczno-fizjologicznym, 2) zagadnienia związane z wirusologią ogólną. W czasie Symposium wygłoszono 24 referaty, w czym 11 referatów gości zagranicznych. Spośród uczestników z zagranicy należy wymienić znanego biochemika roślin dr Venekampa z Holandii, który jako pierwszy wprowadził metodę chromatograficznego czyszczenia różnych wirusów roślinnych w dwufazowym systemie polimerów, wybitnego wirusologa Prof. dr Klinkowskiego z Aschersleben z NRD, Prof. dr Schustera z NRD, dr Pincka i dr Perdrizet z Francji, dr Cockinga z Nottingham z Anglii. Ten ostatni przedstawił piękną pracę z zakresu prowadzonych przez niego i jego współpracowników badań nad infekcją wirusową na izolowanych protoplastach z pomidorów. Dr Esanu z Rumunii omówił wyniki prowadzonych już od kilku lat interesujących prac nad metabolizmem energetycznym (fosforylacją) w roślinach zakażonych wirusami w porównaniu ze zdrowymi. Wirusologów z Czechosłowacji reprezentowali: dr Pozdena, dr Marcinka i dr Kormancikova. Z polskich naukowców między innymi brali udział Prof. dr Górski z Krakowa, Prof. dr Przesmycki i Prof. dr Bryll z Warszawy, Prof. dr Błaszczak z Poznania oraz Dyrektor Instytutu Ziemiaka w Boninie Doc. dr Gabriel.

Na podkreślenie zasługuje udział w tym Symposium polskich naukowców związanych bezpośrednio z praktyką rolniczą.

M. Kamińska-Żyła

Międzynarodowe Sympozjum „Biosynteza białka — struktura i funkcja makromolekuł i elementów subkomórkowych”

Olsztyn 25—27.VII.1968 roku

Sympozjum połączone było z VI Krajowym Zjazdem P. T. Bioch., który odbył się w dniach 25—27 lipca 1968 r. w Olsztynie.

Obrady Zjazdu rozpoczęły się plenarną sesją Sympozjum. Uczestników Sympozjum, wśród których znalazło się wielu zagranicznych wybitnych specjalistów w dziedzinie kwasów nukleinowych i biosyntezy białek powitał prof. dr Przemysław Szafrąński. Sympozjum odbyło 3 plenarne posiedzenia, na których wygłoszono 22 referaty. Tematyka obrad była bardzo szeroka i różnorodna, dominowały jednak 2 główne problemy:

1. Kwasy nukleinowe — struktura i funkcja
2. Rybosomy, enzymy i kofaktory procesów biosyntezy białek.

W takiej kolejności chciałbym pokrótce omówić poszczególne zagadnienia referowane i dyskutowane na Sympozjum.

Ad 1. Problem zależności pomiędzy strukturą a funkcją przenoszących kwasów nukleinowych nie został dotąd wyjaśniony, jakkolwiek sprawom tym poświęca się ostatnio wiele uwagi. Znalazło to także odbicie w referatach sympozjalnych. Z a c h a u (Monachium) przedstawił szereg danych wskazujących na to, że odcinki jednoniciowe cząsteczki tRNA odpowiedzialne są za rozpoznawanie niektórych enzymów, jak np. pirofosforylaza-CCA (CCA — końcowy fragment akceptorowej części tRNA), a także rybosomów. Niewielkie zmiany konformacyjne pętli zawierającej antykodon prowadzą do utraty zdolności rozpoznawania kodonu. Za specyficzną interakcję aminoacylo-tRNA syntetazy z przenoszącym RNA odpowiedzialny jest odcinek dwuniciowy, a według danych Chambersa (Nowy Jork) jedynie 3 pierwsze pary zasad. Do takiego wniosku prowadzą bowiem wyniki doświadczeń nad inaktywacją tRNA^{ala} przez promienie UV. Działaniu UV na tRNA i warunkom w jakich powstaje kompleks enzym-tRNA poświęcił również swój referat Kisielew (Moskwa). W dalszym ciągu nie wiadomo jakie fragmenty łańcucha tRNA uczestniczą w reakcji z aminoacylo-tRNA transferazami i transferazą peptydylową. Postęp w tej dziedzinie zależy głównie od dalszego rozwoju badań nad strukturą tRNA. Nawiązaniem do tego typu badań było doniesienie Legockiego (Legocki, Pawełkiewicz i inni — Poznań) na temat konformacji tRNA^{ileu} w podwyższonych temperaturach. Autor omówił również zagadnienie różnicowania się roślinnych tRNA.

Informacyjny RNA był tematem kilku referatów i doniesień. Samarina (Samarina, Kriczewskaja, Łukanidin i Georgiew — Moskwa) omówiła zagadnienie form występowania jądrowego D-RNA (ang. DNA-like RNA) — prekursora cytoplazmatycznego mRNA i jego transportu z jądra do cytoplazmy. W jądrze komórki zwierzęcej D-RNA występuje w połączeniu z białkiem zwanym informoferem. Informofer ma własności zasadowe, różni się jednak od histonów jądra komórkowego i białek rybosomowych. Połączeń mRNA — białko nie obserwuje się u drobnoustrojów, gdzie transkrypcja sprzężona jest bardzo ściśle z translacją nowopowstałego mRNA. W odniesieniu do operonu histydyny u *Salmonella typhimurium* procesy transkrypcji omówił Venetianer (Budapeszt). Trwałość powstających *in vitro* kompleksów naturalnego mRNA z rybosomami *E. coli* i zagadnienie hamującego wpływu sRNA na ten proces były tematem doniesienia Perzyńskiego (Perzyński i Szafrąński — Warszawa).

Wiele uwagi poświęcono zagadnieniom struktury rRNA w nawiązaniu do funkcji rybosomów. Z danych Hadjiolowa (Sofia) wynika, że zarówno 18S

jak 28S RNA ssaków są niejednorodne i zawierają odcinki z przewagą guaniny i cytozyny jak i odcinki bogate w adeninę i uracyl. Rozmieszczenie tych fragmentów w obrębie nici rRNA nie jest przypadkowe, co może wskazywać na odmienną funkcję spełnianą przez określone odcinki. Z wielkim zainteresowaniem przyjęty został referat Cox'a (Londyn) omawiający nowsze badania nad strukturą II rzędową rRNA. Jak się okazuje, struktura II rzędowa rybosomowego RNA zarówno wewnątrz rybosomu jak i po usunięciu białka jest podobna. Wielkość segmentu o charakterze podwójnej spirali nie jest dokładnie znana, natomiast ilość pętli dla RNA z mniejszej podjednostki wynosi 40—60, dla większej zaś 80—120. Przy tworzeniu się nici rybonukleoproteidowej poszczególne białka rybosomowe łączą się ze ściśle określonymi odcinkami rRNA. Heterogenna powierzchnia rybosomu posiada wiele, funkcjonalnie różnych miejsc wiążących: mRNA, tRNA i liczne enzymy uczestniczące w syntezie białek. Integralność rRNA jest niezbędna dla funkcji rybosomu (Kučan — Zagrzeb). Inaktywacja rybosomu zachodzi jednakże tylko w tym przypadku jeśli przerwaniu wiązań międzynukleotydowych w rRNA towarzyszy zmiana struktury III rzędowej (Szekely — Budapeszt).

Biosyntezę kwasów rybonukleinowych u drożdży w zależności od warunków hodowli i stanu fizjologicznego komórek, jak również perspektywy dalszych badań nad biosyntezą RNA przedstawił Gniazdowski (Gniazdowski, Lorenc i Filipowicz — Łódź).

Tematyka referatów poświęconych DNA dotyczyła wielu różnorodnych zagadnień. Chorąży (Gliwice) omówił problem wewnątrz i międzycząsteczkowej heterogenności DNA na przykładzie DNA faga λ i DNA ssaków oraz możliwości i perspektywy badań w tej dziedzinie. Dalsze wyniki badań nad dAT kraba były tematem referatu Baranowskiego (Baranowski, Baranowska i Laskowski Sr. — Wrocław i Buffalo), a w szczególności proces renaturacji polimeru i wpływu jonów magnezu na renaturację. Polimer dAT okazał się dogodnym modelem dla badań biologicznych mechanizmów rozszczepienia i rekonstrukcji podwójnej spirali DNA. Na Sympozjum omawiana była również informacyjna rola mitochondrialnego DNA (Deutsch — Gif-sur-Yvette).

Tematycznie z kwasami nukleinowymi związany był referat Shugara (Janion i Shugar — Warszawa) dotyczący mutagennego działania hydroksylaminy. Na podstawie przytoczonych danych autorzy postulują, że pojawiająca się pod wpływem hydroksylaminy hydroksycytosyna jest przyczyną mutacyjnego działania tego związku na układy genetyczne.

Funkcja rybosomów i enzymów w biosyntezie białka była przedmiotem kilku referatów sympozjalnych. Obszerny referat na temat struktury i roli rybosomów przedstawił Hayes (Paryż). Funkcja obu komponentów rybosomu, a w szczególności indywidualnych białek rybosomowych nie jest wyjaśniona. Wiadomo jednak, że białko rybosomowe uczestniczy, jakkolwiek nie bezpośrednio, w wiązaniu mRNA do rybosomów, w asocjacji podjednostek rybosomu, a także stabilizuje kompleks aminoacylo-tRNA-mRNA-rybosom. Badania nad składem białek rybosomów wolnych i związanych z błoną retikulum endoplazmatycznego komórek wątroby nie wykazują wyraźnych różnic jakościowych (Gaal — Budapeszt), co sugeruje ciągłą wymianę pomiędzy wolnymi i związanymi rybosomami.

W świetle ostatnich badań nad końcowymi etapami biosyntezy białka, przedstawionych na Sympozjum przez Matthaei (Getynga) można wyróżnić 3 fazy biosyntezy: 1. faza zapoczątkowywania syntezy łańcucha polipeptydowego (ang. *initiation*), 2. wydłużania polipeptydu (ang. *elongation*) i 3. faza zakończenia syntezy (ang. *termination*). W fazie 1 biorą udział trzy czynniki białkowe. Czynniki F_3 bierze udział w wiązaniu mRNA do podjednostki 30S (40S) rybosomu, F_1 i F_2 zaś w przyłączaniu N-formylo-metionilo-tRNA do kodonu startowego AUG lub GUG kompleksu 30S-mRNA. W układach heterologicznych zawierających wirusowy RNA

jako mRNA i bakteryjne rybosomy proces inicjacji syntezy przebiega nieco inaczej (Bosch—Leiden), jakkolwiek w obu przypadkach bierze udział N-formylo-metionyl-tRNA. W dalszym ciągu niewiele wiadomo o zapoczątkowywaniu biosyntezy białek w komórkach zwierzęcych.

Wydłużanie peptydu jest procesem złożonym. Biorą w nim udział transferazy I i II odpowiedzialne za przyłączanie aminoacylo-tRNA do rybosomów (T-I) i proces translokacji (T-II) (Gąsior—Lublin), oraz transferaza peptydylowa katalizująca syntezę wiązania peptydowego. Vazquez (Vazquez i Monro—Madryt) oraz Černa (Černa i Rychlik—Praga) przedstawili dalsze dowody wskazujące na podjednostkę 50S bakteryjnych rybosomów jako miejsce lokalizacji transferazy peptydylowej.

Proces zakończenia syntezy polipeptydu związany jest z obecnością kodonu(ów) „zakończającego” (UAA u *E. coli*), a jego odłączanie od tRNA katalizowane jest przez odpowiedni enzym (ang. *releasing factor*).

Problem wbudowywania aminokwasów do białka w nieobecności rybosomów, tRNA, ATP i GTP przedstawił Szafranski (Szafranski, Passent i Klita—Warszawa). Przy użyciu supernatantu (170 000 g) otrzymanego ze środkowej partii gruczolu przedniego jedwabnika morwowego *Bombyx mori* wykazano włączanie ¹⁴C-tryptofanu w N-końcowe położenie w łańcuchu polipeptydowym. Wiele danych wskazuje, że źródłem energii dla tego procesu może być połączenie tiostrowe.

Kontrolę syntezy białka w komórkach ssaków na etapie translacji kodu omówiła von der Decken (Sztokholm). Autorka zwróciła uwagę na możliwość występowania w cytoplazmie komórek zwierzęcych inhibitorów, których poziom zależy od takich czynników jak rodzaj diety, stress itp.

W doniesieniach sympozjalnych wygłoszonych w znacznej części przez polskich uczestników dominowały zagadnienia związane z biosyntezą białka.

Obrady Sympozjum cieszyły się olbrzymim zainteresowaniem, czego wyrazem była duża frekwencja uczestników jak i ożywiona dyskusja po każdym referacie.

Pełne teksty referatów posiedzeń plenarnych ukazały się w materiałach sympozjalnych w formie odrębnej publikacji.

Doniesienia zjazdowe na tematy wolne reprezentowały bardzo różnorodną tematykę, obejmującą prawie wszystkie dziedziny biochemii. Zwracała uwagę dość liczna grupa komunikatów dotyczących enzymologii. Zjazd był przeglądem dorobku naukowego większości ośrodków biochemicznych i kierunków badawczych biochemii w Polsce.

E. Gąsior

VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Olsztyn 25—27.VII.1968 roku

W dniach 25—27 lipca 1968 r. odbył się na terenie Wyższej Szkoły Rolniczej w Olsztynie VI doroczny Zjazd P. T. Bioch., połączony z Międzynarodowym Sympozjum na temat biosyntezy białek. W Zjeździe wzięło udział 353 biochemików z różnych ośrodków krajowych oraz 63 biochemików z laboratoriów zagranicznych, w tym 16 zaproszonych wykładowców.

Zjazd rozpoczął się zebraniem plenarnym, na którym zostały wręczone dyplomy członków honorowych Towarzystwa wybitnym biochemikom i zasłużonym działaczom PTBioch.: prof. dr Włodzimierzowi Mozołowskiemu, prof. dr Józefowi Hellerowi i prof. dr Włodzimierzowi Niemierce.

Podczas Zjazdu i Sympozjum wygłoszono 22 referaty i 29 doniesień sympozjalnych oraz 124 doniesienia zjazdowe, których tematyka obejmowała głównie enzymatykę i biochemię białek.

Liczba referatów i doniesień z poszczególnych ośrodków wynosiła: Warszawa — 51, Łódź — 17, Poznań — 14, Białystok — 12, Wrocław — 9, Gliwice i Olsztyn — po 7, Lublin — 6, Szczecin — 4, Śląsk — 4, Gdańsk i Kraków — po 2. Należy podkreślić liczny udział w Zjeździe młodych pracowników naukowych, którzy przedstawiali wyniki swoich prac eksperymentalnych.

W pierwszym dniu Zjazdu Przewodniczący Wojewódzkiej Rady Narodowej podjął uczestników Zjazdu lampką wina na Zamku Olsztyńskim.

Sprawny przebieg Zjazdu i koleżeńska atmosfera były zasługą wszystkich pracujących w Komitecie organizacyjnym kolegów z Olsztyńskiego Oddziału PTBioch. a w szczególności doc. dr W. Minakowskiego, przewodniczącego Komitetu Organizacyjnego i dr J. Kiszy, sekretarza Zjazdu. Naukowym organizatorem Sympozjum był prof. dr P. Szafrąński z Warszawy.

Streszczenia referatów i komunikatów zostały wydrukowane przed Zjazdem, natomiast w opracowaniu jest odrębne wydanie książkowe pełnych tekstów referatów sympozjalnych. Redaktorami tego tomu są: prof. P. Szafrąński, doc. R. Maślowski i dr S. Klita.

Koszty organizacji Zjazdu i Sympozjum oraz wydawnictw zostały częściowo pokryte z dotacji PAN i UNESCO.

Z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizował dla członków Towarzystwa kurs elektroforezy na żelu poliakrylamidowym. W opracowaniu programu kursu wzięli udział: dr Mirosława Weber, doc. dr Karol Taylor, doc. dr Zdzisław Szafran, doc. dr Stanisław Lewak, dr Henryk Panusz, dr Jerzy Kopona, mgr Anna Rychterowa, dr Waław Madaliński i mgr Hanna Tilgnez.

Kurs odbył się w dniach 28.I—1.II. 1969 r. z udziałem 90 uczestników (w tym 45 spoza Warszawy). Poza zajęciami praktycznymi z elektroforezy białek odbyły się następujące wykłady:

1. dr H. Panusz Technika analitycznej elektroforezy na żelu poliakrylamidowym
2. dr W. Madaliński Preparatywna elektroforeza na żelu poliakrylamidowym (wraz z pokazem)
3. doc. J. Kowalczyk Teoria rozdziału elektroforetycznego na żelu poliakrylamidowym
4. dr M. Weber Zastosowanie elektroforezy na żelu poliakrylamidowym do rozdziału białek
5. doc. K. Taylor Elektroforeza kwasów nukleinowych na żelu poliakrylamidowym
6. doc. Z. Szafran Zastosowanie elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w badaniach klinicznych
7. mgr A. Rychterowa Wykrywanie enzymów na elektroforetogramach na żelu poliakrylamidowym (wraz z pokazem)
8. doc. S. Lewak Zastosowanie elektroforezy na żelu poliakrylamidowym do badania białek roślinnych.

Zarząd Główny P. T. Bioch. zorganizował w kwietniu 1968 r. kurs podstaw biochemii (50 godz.) dla nauczycieli biologii klas licealnych szkół ogólnokształcących. W kursie wzięło udział 95 nauczycieli z różnych ośrodków z wyłączeniem miasta Warszawy i województwa warszawskiego. Program kursu opracował Zarząd Główny w porozumieniu z Centralnym Ośrodkiem Metodycznym Ministerstwa Oświaty i Szkolnictwa Wyższego. Wykładowcami byli koledzy z Warszawy (16 osób) oraz Łodzi (2 osoby) i Gdańska (1 osoba).

W roku bieżącym następny Kurs Podstaw Biochemii dla nauczycieli biologii odbędzie się w maju w oparciu o zeszlóroczny program.

Zarząd Główny wspólnie z kołem NOT przy Instytucie Przemysłu Fermentacyjnego rozpoczął w lutym Kurs Podstaw Biochemii (30 godz.) dla pracowników tegoż Instytutu. Wykładowcami są koledzy z Oddziału Warszawskiego.

SPIS TREŚCI

T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski, M. Rytel — Biochemia powstania i rozwoju mitochondriów	323
A. B. Wojtczak — Utlenianie bursztynianu w mitochondriach	339
A. Koj — Mechanizm utleniania tiosiarczanu w tkankach zwierzęcych	357
A. Gardas — Żelazo niehemowo związane w enzymach oksydoredukcyjnych	371
J. Skangiel-Kramaska — Własności i biologiczna rola izoenzymów	385
A. K. Drabikowska — Biosynteza ubichinonu w tkankach zwierzęcych	397
W. H. Trzeciak — Enzymatyczna aktywacja kwasów tłuszczowych	411
S. Lewak — Flawonoidy głogu	425
J. H. Rogozińska — Struktura a aktywność cytokinin	435
J. Śliwowski — Mechanizmy reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami A. Podstawy teoretyczne	447
Laureaci nagrody Nobla z dziedziny nauk przyrodniczych w 1968 roku, R. W. Holley, H. G. Khorana, M. W. Nirenberg (<i>S. Klita</i>)	469
Recenzje książek (<i>K. Bełżecka, I. Reifer</i>)	473
Sympozjum „Biochemia Wirusów Roślin”, Kraków, 1968 (<i>M. Kamińska-Zyła</i>)	475
Międzynarodowe Sympozjum „Biosynteza białka — struktura i funkcja makromolekuł i elementów subkomórkowych”, Olsztyn, 1968 (<i>E. Gąsior</i>)	476
VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Olsztyn, 1968	478
Z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	479

W 4-tym zeszycie tego tomu ukazał się:

1. Metabolizm zwierząt stałocieplnych a metabolizm izolowanych tkanek — *R. Jusiak, P. Poczopko*
2. Mechanizmy reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami. B. Metody badania — *J. Śliwowski*
3. O możliwości występowania oddziaływań donorowo-akceptorowych w układach biologicznych — *K. Szyborski*
4. Stabilność struktury drugorzędowej DNA — *S. Szala, J. Filipski*
5. Regulacja translacji genów u zwierząt — *I. Szumiel*
6. Teorie mutagenезy chemicznej w świetle badań nad mutagenicznym działaniem hydroksylaminy — *C. Janion*

POSTĘPY BIOCHEMII

July 1969

ARTICLES IN POLISH

Volume 15

Number 3

T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski, M. Rytel—Biochemistry of Genesis and Development of Mitochondria (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	323
A. B. Wojtczak—Succinate Oxidation in Mitochondria (Dep. Biochem. Nencki Inst. Exptl. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	339
A. Koj—The Mechanism of Thiosulphate Oxidation in Animal Tissues (Dep. Biochem. Biophys. Univ., Kraków)	357
A. Gardas—Non-hem Iron in Red-ox Enzymes (Dep. Biochem. Univ., Warszawa)	371
J. Skangiel-Kramska—Properties and Biological Function of Izoenzymes (Dep. Biochem. Nencki Inst. Exptl. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	385
A. K. Drabikowska—Biosynthesis of Ubiquinone in Animal Tissues (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	397
W. H. Trzeciak—Enzymic Fatty Acid Activation (Clin. Lab., IV. Military Hospital, Wrocław)	411
S. Lewak—The Flavonoids of Hawthorn (Dep. Plant Physiol. Univ., Warszawa)	425
J. H. Rogozińska—Cytokinins' Structure and Activity (Dep. Dendrol. Arboretum in Kórnik, Pol. Acad. Sci., Kórnik)	435
J. Śliwowski—Mechanisms of Enzymes Reactions with Two or More Substrates and Products. A. Theoretical Basis (Dep. Biochem. Univ., Warszawa)	447
Chronicle	469

Należy podawać kolejno: L. p., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginale), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorađ 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, wydawcę, miejsce i rok wydania; np.: Baranowski T., *Podręcznik Biochemii*, PZWL, Warszawa 1963. 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, Academic Press, New York 1957, str. 680.

SPIS TREŚCI

T. Gołaszewski, J. W. Szarkowski, M. Rytel — Biochemia powstawania i rozwoju mitochondriów	323
A. B. Wojtczak — Utlenianie bursztynianu w mitochondriach	339
A. Koj — Mechanizm utleniania tiotioarozanu w tkankach zwierzęcych	357
A. Gardas — Żelazo niehemowo związane w enzymach oksydoredukcyjnych	371
J. Skangiel — Kramska — Własności i biologiczna rola izoenzymów	385
A. K. Drabikowska — Biosynteza ubichinonu w tkankach zwierzęcych	397
W. H. Trzeciak — Enzymatyczna aktywacja kwasów tłuszczowych	411
S. Lewak — Flawonoidy głogu	425
J. H. Rogozińska — Struktura a aktywność cytokinin	435
J. Sliwowski — Mechanizmy reakcji enzymatycznych z dwoma lub więcej substratami i produktami A. Podstawy teoretyczne	447
Laureaci nagrody Nobla z dziedziny nauk przyrodniczych w 1968 roku, R. W. Holley, H. G. Khorana, M. W. Nirenberg (<i>S. Klita</i>)	469
Recenzje książek (<i>K. Bełżecka, I. Reifer</i>)	473
Sympozjum „Biochemia Wirusów Roślin”, Kraków, 1968 (<i>M. Kamińska-Żyła</i>)	475
Międzynarodowe Sympozjum „Biosynteza białka — struktura i funkcja makromolekuł i elementów subkomórkowych”, Olsztyn, 1968 (<i>E. Gąsior</i>)	476
VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Olsztyn, 1968	478
Z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	479