

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1971
tom 17
nr 3

KWARTALNIK

INFORMACJA DLA AUTORÓW

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z ZASIĘKU POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 1
tom XVII
zeszyt 3

KWARTALNIK

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Członkowie: J. Chmiel (Poznań), B. Filipowicz (Łódź),
W. Gajewski (Warszawa), Z. Kasprzyk (Warszawa), W. Mejb-
baum-Katzenellenbogen (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poz-
nań), T. Szczepkowski (Kraków), J. Trojanowski (Lublin),
K. L. Wierzchowski (Warszawa)

Komitet Redakcyjny
Redaktor — Zofia Lassota
Sekretarz — Maria Monika Jeżewska

Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1971

Nakład 2130 (2001+129)	Oddano do składania 30.IV.1971 r.
Ark. wyd. 11,5, druk. 9,5+5 wkł.	Podpisano do druku w sierpniu 1971 r.
Papier ilustr. kl. V, 70×100	Druk ukończono we wrześniu 1971 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 652/71 U-104

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŃDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

DOROTA SOŁTYSIAK-PAWLUCZUK *

Budowa wieloskładnikowych kompleksów enzymatycznych

Organization of the Multienzyme Complexes

Organization of the multienzyme α -ketoacid dehydrogenase and fatty acid synthetase complexes are reviewed. Role and function of these enzyme systems are pointed out.

Coraz więcej danych świadczy o tym, że enzymy komórkowe występują w uorganizowanych zespołach. Te zespoły są związane z błonami komórkowymi albo występują w tzw. rozpuszczalnej frakcji cytoplazmy lub organelli subkomórkowych. W ostatnich latach wykazano, że enzymy z frakcji rozpuszczalnych komórki tworzą wieloskładnikowe kompleksy enzymatyczne o masie kilku milionów, katalizujące kilkietapowe procesy metaboliczne. Kompleksy te są zaliczane do kompleksów rozpuszczalnych, ponieważ występują w supernatancie po odwirowaniu frakcji komórkowych przez godzinę przy 100 000 *g*. W artykule niniejszym zostaną omówione kompleksy dehydrogenaz α -ketokwasów i kompleksy syntetazy kwasów tłuszczowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich struktury.

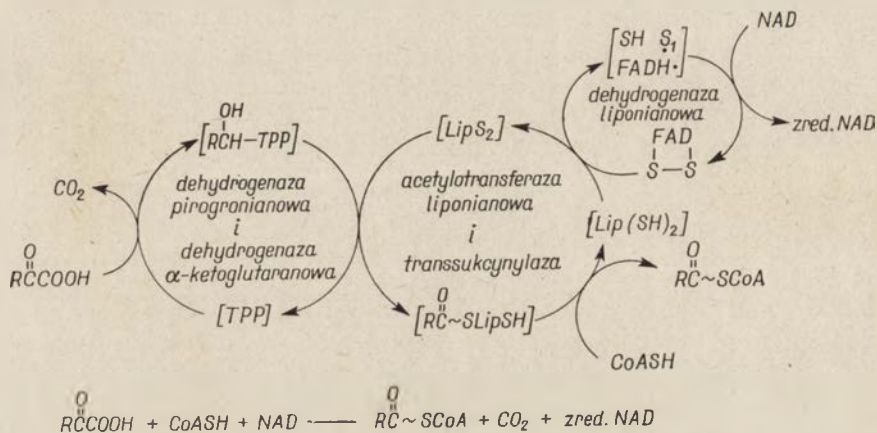
I. Kompleksy dehydrogenaz α -ketokwasów

Główną drogą utleniania pirogronianu i α -ketoglutaranu w organizmach zwierzęcych i bakteriach jest reakcja oksydacyjnej dekarboksylacji, przedstawiona na schemacie 1. Reakcja zachodzi przy udziale CoASH i NAD i jest katalizowana przez trzy enzymy, które tworzą rozpuszczalne kompleksy o masie cząsteczkowej kilku milionów. Wyróżnia się dwa rodzaje kompleksów, jeden specyficzny dla pirogronianu i drugi dla α -ketoglutaranu. W komórkach bakterii występują one w rozpuszczalnej frakcji cytoplazmy, a w tkankach zwierzęcych w rozpuszczalnej frakcji

* Mgr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa.

* Wykaz stosowanych skrótów. TPP — pirofosforanu tiaminy, LipS₂ i Lip(SH)₂ — kwas lipo-
nowy i forma zredukowana, FAD i zredu.FAD — dwunukleotyd flawinoadeninowy i forma zre-
dukowana, CoASH — koenzym A, NAD i zredu.Nad — dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy
i forma zredukowana

mitochondrialnej. Charakterystyczną cechą reakcji oksydacyjnej dekarboksylacji jest fakt, że pośredniki reakcji są powiązane kowalencyjnie z enzymami kompleksu. W ten sposób z kompleksów uwalniają się tylko końcowe produkty reakcji. W obu kompleksach enzym pierwszy katalizuje dekarboksylację odpowiedniego α -ketokwasu, a następnie redukcyjną acylację kwasu liponowego. Z tego względu enzymy te nazywa się obecnie dehydrogenazami α -ketokwasów (99), a nie, jak poprzednio, dekarboksylazami α -ketokwasów (55).

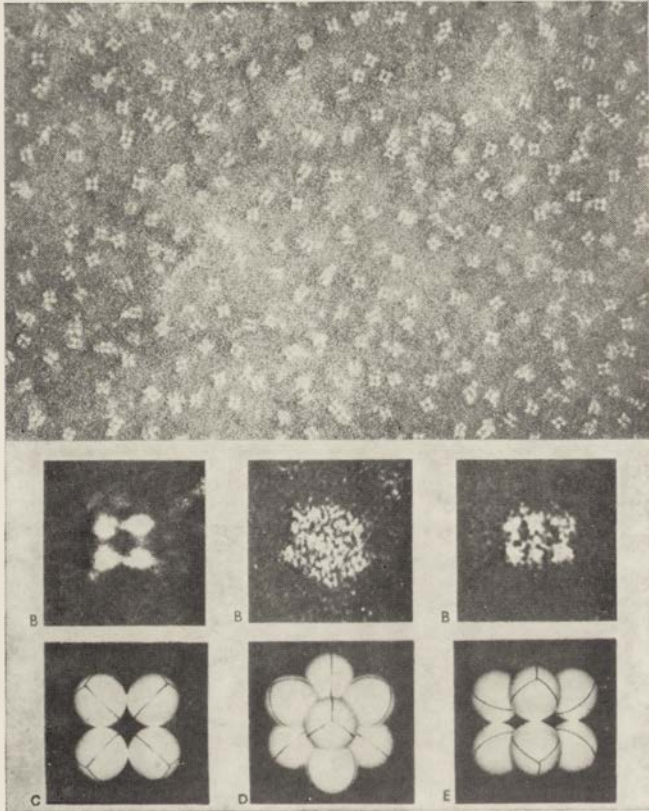


Schemat 1. Reakcja utleniania pirogronianu i α -ketoglutaranu wg (103)

1. Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej z *Escherichia coli*

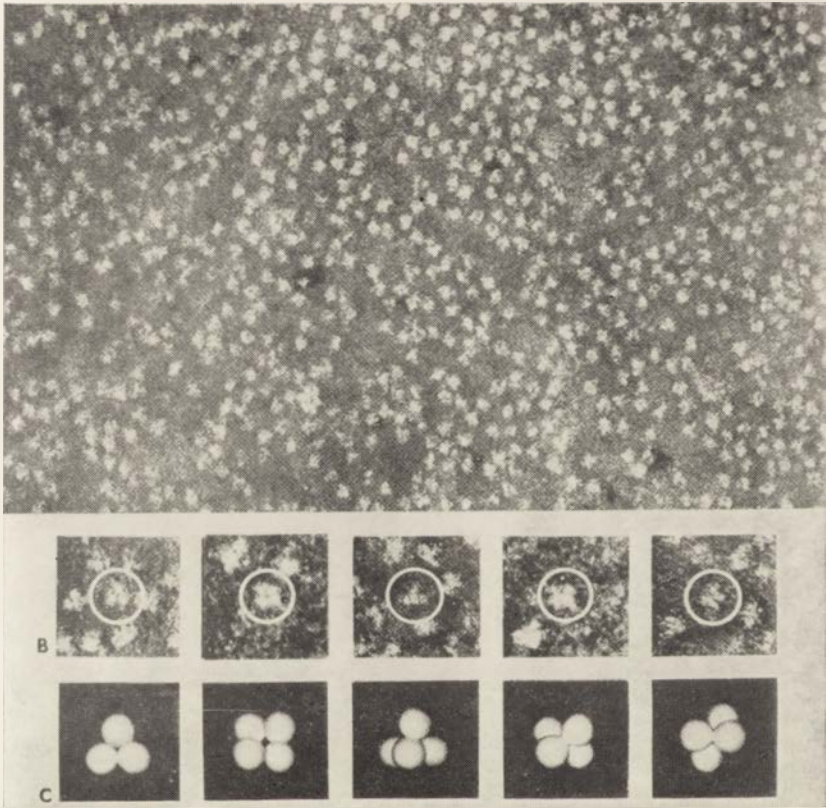
Kompleks ten jest pod względem budowy najlepiej poznanym układem enzymatycznym. Ostatnio otrzymano go w stanie krystalicznym ze szczepu *Escherichia coli* K 12 (20). Masa cząsteczkowa kompleksu wynosi 4,8 miliona (54). Kompleks składa się z trzech enzymów: dehydrogenazy pirogronianowej (oksydoreduktaza pirogronian: liponian — acetylująca akceptor, EC 1.2.4.1), transacetylazy dwuhydroliponianowej (S-acetylotferaza acetyloCoA: dwuhydroliponian, EC 2.3.1.12) i dehydrogenazy liponianowej (oksydoreduktaza zredukowany NAD:amid kwasu liponowego, EC 1.6.4.3) (por. schemat 1). Enzymy kompleksu są połączone wiązaniami niekowalencyjnymi (55). Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej udało się rozdzielić na aktywne składniki enzymatyczne. W środowisku alkalicznym od kompleksu oddysocjowuje dehydrogenaza pirogronianowa. Pozostały subkompleks złożony z transacetylazy i flawoproteidu dysocjuje w obecności mocznika. Rekonstrukcja kompleksu jest procesem natychmiastowym i zachodzi w środowisku obojętnym. Zrekonstruowany kompleks ma własności kompleksu natywnego (55).

Centralną pozycję w kompleksie zajmuje transacetylaza dwuhydro-



Rys. 1. (A)— Zdjęcie transacetylazy liponianowej z *Escherichia coli* wykonane w mikroskopie elektronowym, $\times 200\ 000$. (B)— Charakterystyczne ułożenia przestrzenne cząsteczek enzymu, $\times 870\ 000$. (C, D, E)— Model transacetylazy przedstawiony w formie 8 kul ułożonych w wierzchołkach sześcianu, widok wzdłuż osi symetrii czterokrotnej (C), trójkrotnej (D) i dwukrotnej (E), odpowiadający układom pokazanym na (B).

Każda kula odpowiadająca jednostce morfologicznej enzymu jest podzielona czarnymi liniami na trzy równe części dla przedstawienia trzech jednakowych łańcuchów polipeptydowych jednostki (wg 103)



Rys. 2. (A) — Zdjęcie dehydrogenazy pirogronianowej z kompleksu *Escherichia coli* wykonane w mikroskopie elektronowym, $\times 400\ 000$. (B) — Wybrane charakterystyczne ułożenia przestrzenne cząsteczki enzymu, $\times 700\ 000$. (C) — Model cząsteczki dehydrogenazy odpowiadający zdjęciom z (B) wg (103)

liponianowa. Oprócz funkcji katalitycznej pełni także rolę białka strukturalnego, z którym są połączone dwa enzymy kompleksu (55). Transacetylaza ma osobne miejsce wiązania dla obu enzymów kompleksu. W utrzymaniu miejsca aktywnego enzymu i miejsc wiązania dla obu dehydrogenaz w transacetylazie podstawową rolę odgrywają reszty tyrozyny (108, 109). Masa cząsteczkowa enzymu wynosi około 1 miliona (40). Enzym składa się z 24 identycznych łańcuchów polipeptydowych o masie 30 000—35 000. Każdy łańcuch zawiera mol kwasu liponowego (55, 102) związanego kowalencyjnie z lizyną (54). Łańcuchy polipeptydowe są powiązane wiązaniami niekowalencyjnymi, utworzonymi prawdopodobnie przez aminokwasy hydrofobowe występujące w dużej ilości w enzymie (40). Transacetylazę udało się zdysocjować na pojedyncze łańcuchy polipeptydowe, na dimery o masie 70 000 oraz na jednostki o masie 120 000 zawierające trzy łańcuchy polipeptydowe (125). Te ostatnie mają zdolność wiązania obu dehydrogenaz. Powstaje w ten sposób jednostka funkcjonalna kompleksu o masie cząsteczkowej równej 1/8 masy natywnego kompleksu (103, 109). Z nieaktywnych dimerów transacetylazy można zrekonstruować enzym o własnościach enzymu natywnego (125).

Na podstawie badań fizykochemicznych i zdjęć z mikroskopu elektronowego przyjmuje się, że cząsteczka transacetylazy ma kształt sześcianu, na którego wierzchołkach znajduje się osiem jednostek morfologicznych enzymu. Każda jednostka morfologiczna jest zbudowana z trzech łańcuchów polipeptydowych (22, 103, 125) (rysunek 1). Taka struktura enzymu wskazuje, że międzyłańcuchowe miejsca wiązania wewnątrz każdej podjednostki morfologicznej różnią się od miejsc wiązania między podjednostkami (103).

Dehydrogenaza pirogronianowa, oddysocjowana od kompleksu, ma masę cząsteczkową około 90 000 (103). Enzym ten składa się z dwóch różnych łańcuchów polipeptydowych (α , β) o masie cząsteczkowej 45 000 każdy (41). Po obniżeniu pH środowiska powstają dimery o masie 183 000 (55). Na zdjęciach z mikroskopu elektronowego dehydrogenaza ma kształt czworościanu o średnicy 55—75Å (103) (rysunek 2).

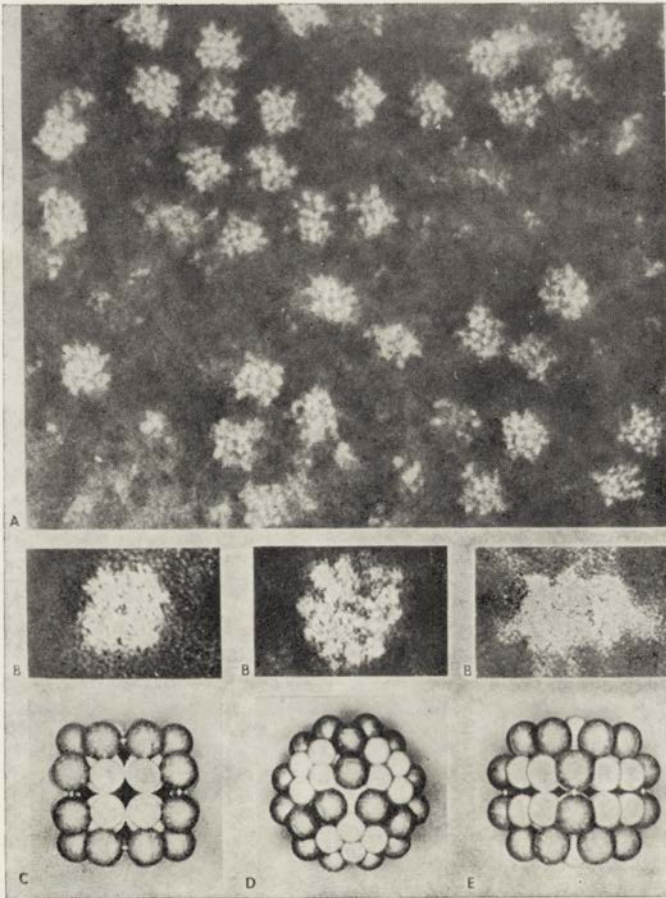
Trzeci enzym kompleksu, dehydrogenaza liponianowa (80, 81, 112) w formie dimeru ma masę cząsteczkową 112 000 i zawiera dwa mole FAD (55, 56, 99). Dane fizykochemiczne wskazują, że dimer flawoproteidu składa się z dwóch identycznych łańcuchów polipeptydowych γ_2 (84, 103).

Mozaikowe ułożenie enzymów w wieloskładnikowych kompleksach, sugerowane przez Greena (32), potwierdziły zdjęcia z mikroskopu elektronowego kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej. Kompleks ten z komórek *Escherichia coli* (utrwalony negatywnie fosfowolframianem) w powiększeniu 300 000-krotnym ma wygląd wielościanu o średnicy około 300Å (103) (rysunek 3). Środkowe miejsce w kompleksie zajmuje

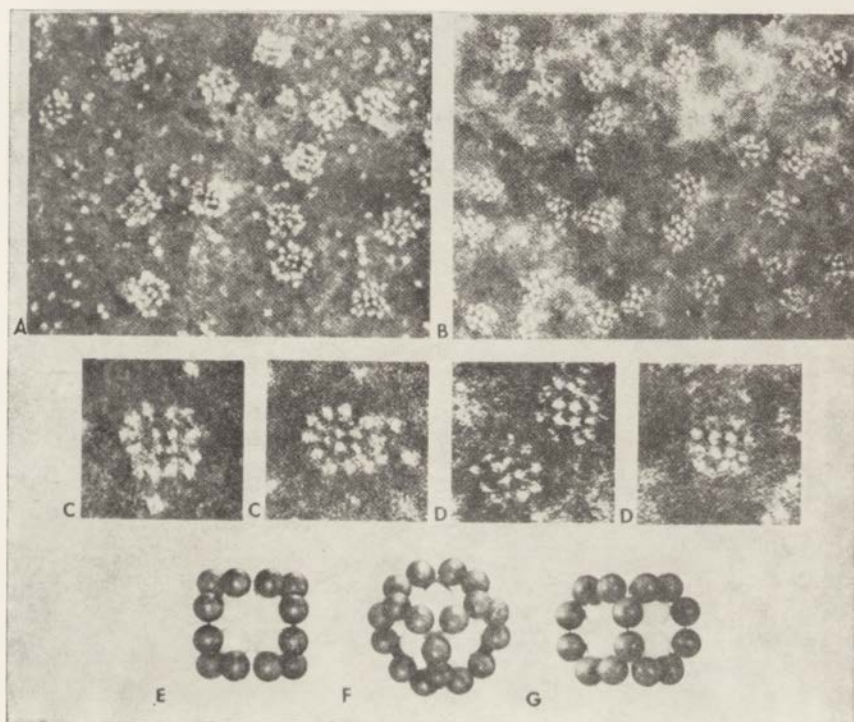
transacetylaza. Na jej powierzchni są symetrycznie rozmieszczone cząsteczki obu dehydrogenaz (rysunek 4). Początkowo sądzono (55, 102, 125), że dwanaście cząsteczek dehydrogenazy pirogronianowej o masie 183 000 jest rozmieszczonych na dwunastu krawędziach sześciangu transacetylazy, a sześć cząsteczek flawoproteidu o masie 112 000 znajduje się na jego sześciu ścianach.

Na podstawie ostatnich doświadczeń Reeda i Olivera (103) przyjmuje się raczej obecność dwudziestu czterech cząsteczek dehydrogenazy pirogronianowej (α , β) o masie cząsteczkowej 90 000, ponieważ na cząsteczce transacetylazy są dwadzieścia cztery miejsca wiązania tego enzymu. Jednostki dehydrogenazy pirogronianowej są więc połączone z pojedynczymi łańcuchami polipeptydowymi transacetylazy. Przy przyjęciu regularnego rozmieszczenia jednostek dehydrogenazy pirogronianowej o masie 90 000 i jednostek flawoproteidu o masie 55 000 wzdłuż krawędzi sześciangu transacetylazy, zakłada się też istnienie dwudziestu czterech miejsc wiązania dla dehydrogenazy liponianowej. Z danych o budowie kompleksu wynika jednak, że na mol kompleksu przypada sześć cząsteczek flawoproteidu o masie cząsteczkowej 112 000 (γ_2) lub dwanaście cząsteczek o masie 55 000. Wyizolowany kompleks dehydrogenazy pirogronianowej nie przyłącza więcej cząsteczek flawoproteidu w przeciwieństwie do wyizolowanej transacetylazy. Jest możliwe, że po przyłączeniu dwudziestu czterech cząsteczek dehydrogenazy pirogronianowej niektóre miejsca wiązania dla flawoproteidu w wyizolowanym kompleksie nie są dostępne z powodu zawady przestrzennej.

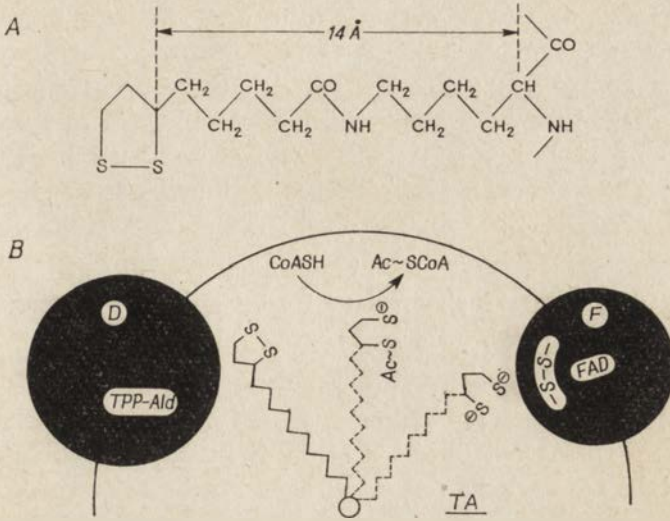
Na podstawie przedstawionych danych można sądzić, że kompleks dehydrogenazy pirogronianu z *Escherichia coli* ma zwartą strukturę. Powstaje więc pytanie, w jaki sposób odbywa się wzajemne oddziaływanie grup prostetycznych enzymów kompleksu, skoro przemieszczanie się enzymów wewnątrz kompleksu jest ograniczone. Jest możliwe, że jeden lub kilka enzymów zmienia konformację w czasie reakcji, co powoduje zbliżenie centrów aktywnych enzymów (103). Druga możliwość wynika z faktu, że pierścień kwasu liponowego dzięki powiązaniu z grupą $-\text{NH}_2$ lizyny znajduje się na „ramieniu” o długości 14Å (schemat 2A). Takie połączenie może ułatwiać rotację liponianu między enzymami (schemat 2B). Kwas liponowy bierze bowiem udział w następujących przemianach w procesie oksydacyjnej dekarboksylacji α -ketokwasów: w redukcyjnej acylacji, przeniesieniu acylu i przeniesieniu elektronów (101). Reakcje te zachodzą w wyniku oddziaływania kwasu liponowego z grupą prostetyczną dehydrogenazy pirogronianowej (pirofosforan tiaminy, TPP) i z grupą prostetyczną dehydrogenazy liponianowej (FAD) oraz CoASH znajdującym się na cząsteczce transacetylazy (patrz schemat 1). W czasie tych reakcji ulega zmianie ładunek cząsteczki kwasu liponowego (schemat 2), co może ułatwiać rotację (55).



Rys. 3. (A) — Zdjęcie cząsteczek kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej z *Escherichia coli* wykonane w mikroskopie elektronowym, $\times 300\ 000$. (B) — Wybrane przestrzenne ułożenia cząsteczek kompleksu, $\times 600\ 000$. (C, D, E) — Model kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej odpowiadający zdjęciom z (B), widok wzdłuż osi symetrii czterokrotnej (C), trójkrotnej (D) i dwukrotnej (E) sześciianu transacetylazy; 24 jednostki dehydrogenazy pirogronianowej (czarne kule) i 24 jednostki flawoproteidu (białe kule) są rozmieszczone regularnie na sześciianie transacetylazy (wg 103)



Rys. 4. Zdjęcia $\times 200\ 000$ subkompleksów transacetylaza-dehydrogenaza pirogronianowa (A) i transacetylaza-flawoproteid (B) wykonane w mikroskopie elektronowym. (C, D) — wybrane przestrzenne ułożenia obu kompleksów, $\times 400\ 000$. (E, F, G) — model subkompleksu transacetylaza-dehydrogenaza pirogronianowa, widok wzdłuż osi symetrii czterokrotnej (E), trójkrotnej (F) i dwukrotnej (G) sześciianu transacetylazy. Czasteczki dehydrogenazy pirogronianowej są przedstawione jako czarne kule, a transacetylazy jako białe kule (wg 103)



Schemat 2. (A) — Reszta liponylolizynowa biorąca udział w utlenianiu α -ketokwasów, (B) — Schemat przypuszczalnej rotacji kwasu liponowego powiązanego z lizyną między grupą prostetyczną dehydrogenazy pirogronianowej (D), koenzymem A i flawo-proteidem (F). Reszta liponylolizynowa znajduje się na cząsteczce transacetylazy — TA (wg 103)

2. Kompleks dehydrogenazy α -ketoglutaranu z *Escherichia coli*

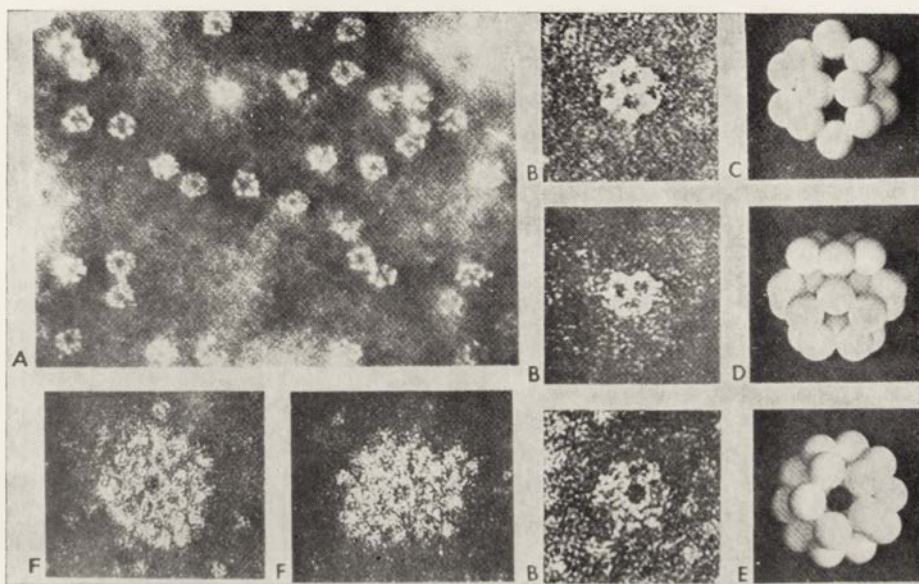
Kompleks dehydrogenazy α -ketoglutaranu z komórek *Escherichia coli* ma masę cząsteczkową około 2,3 miliona (89). Pod względem budowy kompleks ten wykazuje wiele cech wspólnych z omówionym kompleksem dehydrogenazy pirogronianowej. Kompleks został rozdzielony na trzy enzymy, analogiczne pod względem funkcji do enzymów kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej. Są to: dehydrogenaza α -ketoglutaranu, transsukcynylaza dwuhydroliponianowa i dehydrogenaza dwuhydroliponianowa. Enzymy te są również połączone ze sobą wiązaniami niekovalencyjnymi, na co wskazuje identyczna dysocjacja kompleksu jak w przypadku dehydrogenazy pirogronianowej. Po zmieszaniu trzech wyizolowanych enzymów rekonstruuje się aktywny kompleks dehydrogenazy α -ketoglutaranu o właściwościach kompleksu natywnego. Transsukcynylaza oprócz funkcji katalitycznej pełni rolę białka strukturalnego. Pozostałe dwa enzymy kompleksu nie łączą się ze sobą, a tylko z cząsteczką transsukcynylazy. Masa cząsteczkowa transsukcynylazy jest równa masie transacetylazy i wynosi około 1 miliona. Jednak masa całego kompleksu jest dwa razy mniejsza niż kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej co sugeruje, że kompleks zawiera mniej cząsteczek pozostałych enzymów. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego wskazują na budowę analogiczną do kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej, czyli na

strukturę sześcianu utworzoną z ośmiu podjednostek morfologicznych transsukcynylazy, dookoła których są rozmieszczone regularnie obie dehydrogenazy kompleksu (103). Dehydrogenaza pirogronianowa i α -ketoglutaranu, a także transacylazy z obu kompleksów nie są enzymami funkcjonalnie zamiennymi (99). Natomiast wykazano identyczność pod względem fizykochemicznym i funkcjonalnym dehydrogenaz liponianowych z obu kompleksów (99).

3. Kompleksy dehydrogenazy pirogronianu i α -ketoglutaranu z tkanek zwierzęcych

Kompleksy obu dehydrogenaz α -ketokwasów wyizolowano z mitochondriów nerki wołu (48), z mięśnia sercowego świni (36, 39, 42, 52, 58, 59, 82 i 104) oraz z mięśni gołębia (49, 111). Masa cząsteczkowa kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej z serca świni wynosi około 7,4 miliona (37). Kompleks rozdzielono metodami opisanymi dla kompleksu bakteryjnego na trzy aktywne enzymy bez utraty aktywności żadnego z nich (38, 37, 55). Rekonstrukcję aktywnego kompleksu przeprowadzono mieszając trzy składniki enzymatyczne w stosunku wagowym 4,9:3,7:1,1. Na podstawie ultrawierowania analitycznego ustalono, że kompleks składa się z jednej cząsteczki transacylazy o masie cząsteczkowej 2 miliony, trzydziestu cząsteczek dehydrogenazy pirogronianowej o masie 150 000 i sześciu cząsteczek dehydrogenazy liponianowej o masie 110 000. Nie jest jeszcze wyjaśnione czy transacetylaza o masie 2 milionów jest pojedynczym enzymem czy też kompleksem składającym się z dwóch enzymów (37). Transacetylaza pełni również dwie funkcje podobnie jak w kompleksie bakteryjnym (38). Ogólnie biorąc, pod względem składu i aktywności enzymatycznych kompleks z tkanek zwierzęcych bardzo przypomina kompleks bakteryjny. Dla porównania stosunek molowy FAD:kwas liponowy w kompleksie ssaków wynosi 5:1, a w kompleksie bakteryjnym 3:1 (37).

Masa cząsteczkowa kompleksu dehydrogenazy α -ketoglutaranu wyizolowanego z tkanek ssaków wynosi około 2,7 milionów (42, 82, 104). Stosunek molowy FAD:kwas liponowy równa się 1,5:1,0 (42), a w analogicznym kompleksie z bakterii 1:1 (54). Budowa kompleksu dehydrogenazy α -ketoglutaranu z tkanek ssaków bardzo przypomina oba rodzaje kompleksów bakteryjnych. Natomiast kompleks dehydrogenazy pirogronianowej ssaków różni się pod względem struktury transacetylazy, której podjednostki są rozmieszczone na wierzchołkach pięciobocznego dwunastościanu (48, 103). Średnica transacetylazy wynosi 210Å, a całego kompleksu 400—450Å (rysunek 5). Cząsteczki obu dehydrogenaz, które są strukturami globularnymi o średnicy 70Å, są rozmieszczone symetrycznie na cząsteczce transacetylazy, co określa jej struktura. Dehydrogenaza pirogronianowa jest prawdopodobnie rozmieszczona na trzydziestu krawędziach, a cząsteczka flawoproteidu na dwunastu ścianach



Rys. 5. (A) — Zdjęcie transacetylazy dwuhydrolipoilowej, wyizolowanej z kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej ssaków, wykonane w mikroskopie elektronowym, $\times 200\ 000$. (B) — Wybrane przestrzenne ułożenie cząsteczek enzymu, $\times 400\ 000$, (C, D, E) — Model transacetylazy składający się z 20 kul rozmieszczonych na wierzchołkach pięciokątów dwunastościanu, widok wzdłuż osi symetrii dwukrotnej (C), trój-krotnej (D) i pięciokrotnej (E) wieloboku, odpowiadający zdjęciom z (B). (F) — Zdjęcie kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej ssaków, $\times 400\ 000$ (wg 103)

wielościanu transacetylazy (48). Mimo pewnej różnicy między strukturą przestrzenną transacetylazy w kompleksie dehydrogenazy pirogronianowej ssaków a pozostałymi kompleksami, istnieje wyraźne podobieństwo w przestrzennej budowie kompleksów dehydrogenaz α -ketokwasów ssaków i bakterii.

Badając specyficzność substratową oczyszczonych kompleksów dehydrogenazy pirogronianowej, otrzymanych z serca świni, stwierdzono, że w przeciwieństwie do kompleksu z bakterii wykazują one aktywność względem α -ketomaślanu, równą 80% aktywności względem pirogronianu (51). Obie te aktywności występują w takim samym stosunku w czasie oczyszczania kompleksów. Na tej podstawie sądzi się, że kompleks dehydrogenazy pirogronianowej katalizuje oprócz utleniania pirogronianu także utlenianie α -ketomaślanu.

4. Kompleksy dehydrogenaz rozgałęzionych α -ketokwasów

W ciągu ostatnich lat wyizolowano kompleksy katalizujące oksydacyjną dekarboksylację rozgałęzionych α -ketokwasów, które pochodzą z waliny, leucyny i izoleucyny. Kompleks o masie cząsteczkowej około 1 miliona, katalizujący utlenianie kwasu α -ketoizowalerianowego, α -keto- β -metylowalerianowego i α -ketoizokapronowego, wyodrębniono z bezkórkowych ekstraktów z *Bacillus subtilis* (91). Kompleks ten nosi nazwę dehydrogenazy kwasu α -ketoizowalerianowego ze względu na najwyższą aktywność względem tego substratu.

Z wątroby wołu otrzymano i oczyszczono rozpuszczalny kompleks dehydrogenazy kwasu α -ketoizokapronowego i α -keto- β -metylowalerianowego (18). Przypuszcza się, że kompleks ten składa się z dwóch zasocjowanych kompleksów, z których każdy jest specyficzny dla pojedynczego substratu. Występowanie bowiem oddzielnych dehydrogenaz dla rozgałęzionych α -ketokwasów stwierdzono w mitochondriach wątroby szczura (19) i leukocytach człowieka i wołu (26). Z przedstawionych danych wynika, że w tkankach ssaków istnieją niezależne kompleksy dehydrogenazy kwasu pirogronianowego, α -ketoglutarynowego, α -ketoizokapronowego, α -keto- β -metylowalerianowego i, być może, kwasu α -ketoizowalerianowego. To ostatecznie przypuszczenie wymaga jednak potwierdzenia doświadczalnego.

5. Regulacja aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej z bakterii i tkanek ssaków

Aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej z *Escherichia coli* i z mięśnia sercowego świni jest hamowana przez produkty reakcji utleniania pirogronianu czyli przez acetyloCoA i zredukowany NAD (25, 34). Hamowanie to jest znoszone przez CoASH i NAD. Miejscem hamowania

przez zredukcjonowany NAD jest flawoproteid (34, 56, 83). Natomiast acetyloCoA hamuje dehydrogenazę pirogronianową kompleksu (106). Wielu badaczy sugeruje, że w warunkach fizjologicznych utlenianie pirogronianu może więc być regulowane przez stosunek acetyloCoA:CoASH i zredukcjonowany NAD:NAD (25, 34, 35, 50, 92).

Dehydrogenaza pirogronianowa kompleksu katalizuje pierwszy i nieodwracalny etap w utlenianiu pirogronianu. To sugerowało odpowiednią regulację aktywności tego enzymu. Stwierdzono, że fosfoenolpirogronian i niektóre dwunukleotydy stymulują aktywność enzymu (107), a acetyloCoA hamuje (106, 107). W ostatnich latach wykazano obecność jeszcze jednego, złożonego sposobu regulacji aktywności dehydrogenazy pirogronianowej w tkankach ssaków. Doświadczenia Linna i wsp. (65) nad enzymem z mitochondriów nerki wołu wykazały, że ATP w wyniku fosforylacji dehydrogenazy pirogronianowej hamuje aktywność enzymu. Reaktywacja jest możliwa po zwiększeniu stężenia Mg^{2+} , co z kolei wynika ze stymulacji enzymatycznej defosforylacji enzymu, uwarunkowanej obecnością jonów magnezu. Można więc powiedzieć, że reakcje fosforylacji i defosforylacji dehydrogenazy pirogronianowej regulują aktywność wieloenzymatycznego kompleksu w mitochondriach ssaków. Po ufosforylowaniu dehydrogenaza pirogronianowa zawiera dwa równoważniki grup fosforylowych na jednostkę enzymu o masie 160 000 (65). Fosforylacja związana z inaktywacją dehydrogenazy pirogronianowej jest katalizowana przez kinazę specyficzną dla ATP (kinaza dehydrogenazy pirogronianowej), a defosforylacja związana z reaktywacją enzymu jest katalizowana przez fosforylazę (fosforylaza dehydrogenazy pirogronianowej). Oba te enzymy wyizolowano z kompleksu. Wykazano, że w kompleksie natywnym kinaza jest połączona z transacetylazą (48). Można przypuszczać, że również fosfataza jest powiązana z transacetylazą, ponieważ dodanie transacetylazy ułatwia defosforylację (65). Aktywność fosfatazy i kinazy dehydrogenazy pirogronianowej zależy od stężenia wewnątrzkomórkowego jonów magnezu (65), które może być z kolei zależne od stosunku stężenia ATP:ADP (14). Fosfataza jest więc aktywna przy niskim stosunku ATP:ADP i, przypuszczalnie, jednocześnie wysokim stężeniu jonów magnezu. Zarówno fosfatazy jak i kinazy dehydrogenazy pirogronianowej z różnych tkanek ssaków są enzymami funkcjonalnie zamiennymi (64).

Regulacja aktywności kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w wyniku fosforylacji i defosforylacji dehydrogenazy pirogronianowej przypomina przemianę fosforylazy *b* w *a* i odwrotnie (61) oraz formy syntetazy glikogenu zależnej od glukozy-6-fosforanu w formę niezależną od glukozy-6-fosforanu (23). Te wzajemne przemiany są również katalizowane przez kinazy i fosfatazy specyficzne w stosunku do białka. Zarówno fosforylacja dehydrogenazy pirogronianowej jak i syntetazy gliko-

geny powoduje tworzenie mniej aktywnej lub nieaktywnej formy enzymu.

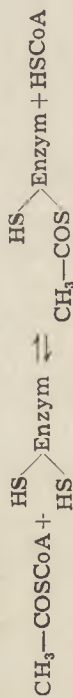
Opisany mechanizm kontroli działania kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej jest bardzo ważny ze względu na regulację kierunku metabolizmu pirogronianu w tkance nerkowej i wątrobowej czyli w tkankach, w których głównie zachodzi glukoneogeneza. Mechanizm regulacji wydaje się działać w przeciwnych kierunkach na utlenianie pirogronianu do acetyloCoA i karboksylację do szczawiooctanu (53, 60, 122). Dehydrogenaza pirogronianowa kompleksu jest aktywna, gdy stosunek ATP:ADP wewnątrz mitochondrium jest niski, a karboksylaza pirogronianu — gdy ten stosunek jest wysoki (55, 122). Ten fakt wyjaśnia obserwację, że utlenianie kwasów tłuszczowych, acylokarnityny i pośredników cyklu kwasów trójkarboksylowych przez mitochondria wątroby i nerki hamuje utlenianie pirogronianu, stymulując jednocześnie jego karboksylację (35, 50, 53, 92, 122). Czynniki rozprzegające oksydacyjną fosforylację znoszą tę inhibicję (92).

Stwierdzono, że kompleks dehydrogenazy pirogronianowej z bakterii nie jest regulowany przez opisany mechanizm fosforylacji i defosforylacji, charakterystyczny dla tkanek zwierzęcych (110). Wykazano natomiast, że efektywnym inhibitorem dehydrogenazy pirogronianowej jest GTP. To zahamowanie jest znoszone specyficznie przez GDP, co wskazuje że aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej u bakterii może być częściowo regulowana przez stosunek GDP:GTP.

II. Kompleks syntetazy kwasów tłuszczowych

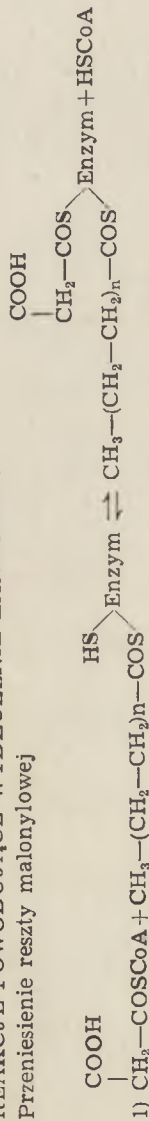
W wątrobie występują co najmniej trzy układy enzymatyczne, syntetyzujące kwasy tłuszczowe. Dwa z nich są zlokalizowane w mitochondriach (126) i mikrosomach (33), trzeci występuje w frakcji rozpuszczalnej. W przeciwieństwie do układów poprzednich ten ostatni nie katalizuje wydłużania estrów acyloCoA, warunkuje natomiast syntezę kwasów tłuszczowych *de novo* z malonylo- i acetyloCoA. W tym układzie czynnikiem redukującym jest zredukiowany NADP (66). Synteza *de novo* jest procesem cyklicznym, w którym do wydłużającego się łańcucha kwasu tłuszczowego są dodawane kolejno jednostki dwuwęglowe, aż osiągnie on długość 16—18 atomów węgla. Wieloenzymatyczny kompleks katalizujący syntezę nosi nazwę syntetazy kwasów tłuszczowych. Pierwsze badania nad biosyntezą kwasów tłuszczowych *de novo* przeprowadzono na kompleksie enzymatycznym wyodrębnionym z drożdży (66). Biosyntezę pobudzają związki tiolowe, a hamują czynniki wiążące grupy -SH. W czasie reakcji nie stwierdzono wolnych pośredników. Dla wytłumaczenia tych faktów Lynen założył, że podczas syntezy substraty, a następnie pośredniki, są połączone kowalencyjnie z grupami -SH kompleksu. Zostało to potwier-

REAKCJA INICJUJĄCA: (Przeniesienie reszty acylowej):

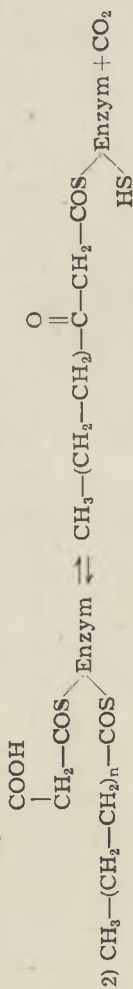


REAKCJE POWODUJĄCE WYDŁUŻENIE ŁAŃCUCHA:

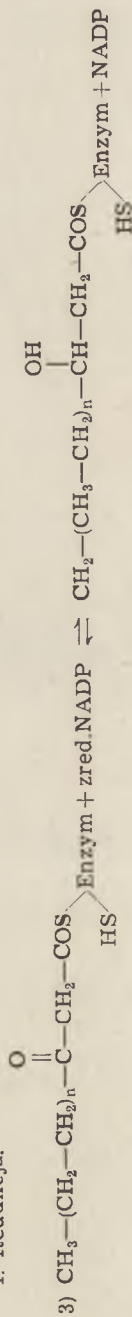
Przeniesienie reszty malonylowej



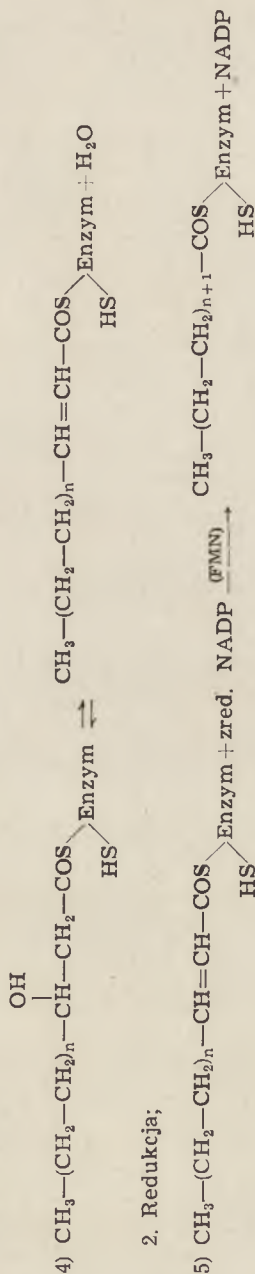
Kondensacja:



1. Redukcja:



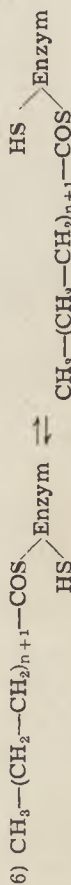
Odwodnienie;



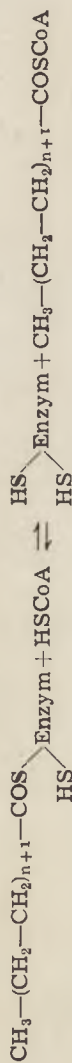
2. Redukcja;



Przeniesienie reszty acylowej;



REAKCJA KOŃCOWA: (Przeniesienie reszty palmitylowej):

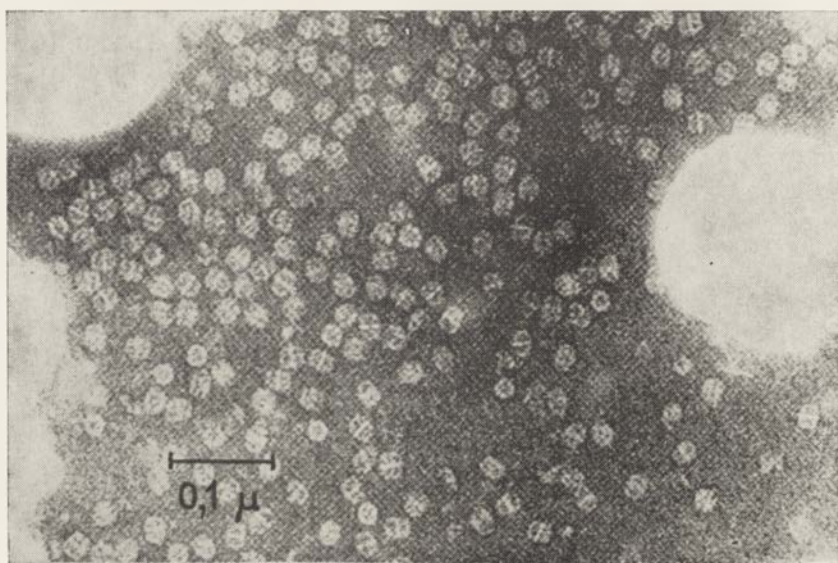


Schemat 3. Mechanizm syntezy kwasów tłuszczowych (wg 68). Tłustym drukiem zaznaczono centralną grupę -SH w białku przenoszącym acyl, a drukiem normalnym peryferyczną grupę -SH

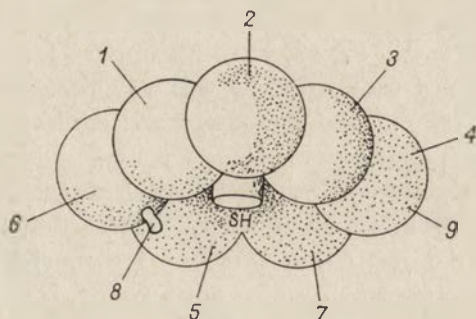
dzone doświadczalnie (11, 46, 66, 68). Stwierdzono, że pośrednikami reakcji są β -ketokwasy, β -hydroksykwasy i α - β -nienasycone kwasy tłuszczowe. W przeciwieństwie do β -oksydacji, w wyniku syntezy powstają β -hydroksykwasy serii D a nie L, a pośredniki reakcji są powiązane tioestrowo z białkiem kompleksu a nie z CoASH (patrz schemat 3). W reakcjach biorą udział dwa rodzaje grup -SH, tzw. grupa centralna i peryferyczna. W czasie reakcji zamiany β -ketokwasu w kwas nasycony grupy acylowe są powiązane kowalencyjnie z centralną grupą -SH. Po utworzeniu nasyconego kwasu tłuszczowego grupa butyrylowa jest przenoszona na peryferyczną grupę -SH. W ten sposób zostaje uwolniona grupa centralna dla przyłączenia następnej reszty malonylowej. Reakcje powtarzają się do momentu powstania palmitylo- lub stearyloenzymu. Wtedy reszta acylowa jest przenoszona na CoASH z wytworzeniem palmitylo- lub stearylo-CoA i zregenerowaniem wolnego enzymu. Układy enzymatyczne z bakterii, roślin i zwierząt katalizują te same reakcje (46, 90, 116, 118). Różnica występuje na etapie końcowym, w którym (w przeciwieństwie do kompleksu z drożdży) powstaje wolny kwas tłuszczowy. Możliwe, że wynika to z udziału enzymu hydrolitycznego zamiast acylotransferazy w reakcji końcowej (69). Jak sugerują doświadczenia Lynena i wsp. (69) w wiązaniu substratu początkowo bierze udział grupa hydroksylowa seryny, a dopiero potem grupa -SH.

Stabilne kompleksy syntetazy kwasów tłuszczowych wyodrębniono z drożdży (66), wątroby ptaków (10, 17, 45, 46, 47) i tkanek ssaków (43, 77, 79, 114). Natomiast kompleksy bakteryjne (2, 3, 4, 5, 7, 28, 29, 31, 63) i roślinne (13, 98) udało się rozfrakcjonować na aktywne enzymy, które po zmieszaniu wykazują zdolność do syntezy kwasów tłuszczowych (105, 118). Wyizolowano i oczyszczono następujące enzymy składowe kompleksu: transacylazę malonylową (5, 6), transferazę acetylową (5), syntetazę β -ketoacyl-białko przenoszącą (6), reduktazę β -keto-acyl-białko przenoszącą (5), dehydrazę β -hydroksyacyl-białko przenoszącą (74), reduktazę enoil-białko przenoszącą (127) oraz białko przenoszące acyl. Enzymy te zawierają grupy tiolowe. Peryferyczna grupa -SH występuje w enzymie kondensującym, a centralna grupa -SH w białku przenoszącym acyl. Funkcjonalna jednostka syntetazy składa się więc z sześciu enzymów, z których każdy katalizuje kolejny etap biosyntezy. Lynen (66, 67) sugeruje, że enzymy są rozmieszczone dookoła białka przenoszącego acyl w taki sposób, że pośredniki reakcji połączone kowalencyjnie z tym białkiem są blisko miejsc aktywnych enzymów (schemat 4).

Kompleks syntetazy z drożdży ma masę cząsteczkową równą 2,3 miliona (66) i składa się z trzech subkompleksów, z których każdy jest zbudowany z siedmiu łańcuchów polipeptydowych (68, 123). Zdjęcia z mikroskopu elektronowego (rysunek 6) przedstawiają cząstki o średnicy 210—250Å z wyraźną strukturą odpowiadającą podjednostkom (69).



Rys. 6. Zdjęcie oczyszczonej syntezy kwasów tłuszczowych z drożdży wykonywane w mikroskopie elektronowym (wg 68)



Schemat 4. Hipotetyczna struktura wieloenzymatycznego kompleksu syntetazy kwasów tłuszczowych (wg 68). Siedem jednostek enzymatycznych odpowiada siedmiu reakcjom schematu 3

1 — Przeniesienie reszty palmitylowej, 2 — Przeniesienie reszty malonylowej, 3 — Przeniesienie reszty acylowej, 4 — Kondensacja, 5 — Odwodnienie, 6 — 2. Redukcja, 7 — 1. Redukcja, 8 — FMN, 9 — SH

Masa cząsteczkowa kompleksów z tkanek ptaków i ssaków wynosi około 500 000 (46, 47, 127, 128). Syntetazę z wątroby ptaków otrzymano w stanie homogenicznym, co stwierdzono w czasie elektroforezy na żelu skrobiowym (47, 128). Po wyeluowaniu z żelu kompleks jest zdolny do syntezy kwasów tłuszczowych. To potwierdza zwartą strukturę enzymów w syntetazie (46). Nie udało się do tej pory przeprowadzić dysocjacji kompleksu na aktywne podjednostki. Stosowane były w tym celu różne czynniki jak detergenty, mocznik, chlorowodorek guanidyny. Nie powodowały one jednak dysocjacji, a po ich usunięciu białko ulegało denaturacji (128). Dysocjacja kompleksu na 5—8 jednostek peptydowych w układzie fenol-kwas octowy-mocznik sugeruje, że składniki enzymatyczne kompleksu są połączone ze sobą wiązaniami niekowalencyjnymi (128). Potwierdza to także dysocjacja kompleksu na dwie jednakowe podjednostki pod wpływem dużych stężeń palmitylo-CoA, działającego jako łagodny detergent (16).

Kompleks z wątroby gołębia zawiera 64—66 wolnych grup -SH (15, 45). Ostatnie badania wskazują, że oprócz udziału w kowalencyjnym wiązaniu substratów (11), grupy -SH warunkują niekowalencyjne wiązanie podjednostek kompleksu. W wyniku bowiem blokowania wolnych grup tiolowych przez zamianę na dwusiarczki lub alkilację zachodzi dysocjacja kompleksu na dwie jednakowe podjednostki (16, 44). Po regeneracji grup -SH następuje asocjacja kompleksu.

1. Białko przenoszące acyl

Składnikiem wspólnym dla wieloenzymatycznych kompleksów syntetazy kwasów tłuszczowych jest niskocząsteczkowe białko, stabilne w czasie gotowania w rozcieńczonym kwasie solnym. Otrzymano je w stanie

Sekwencja aminokwasów dookoła grupy prostetycznej w białkach przenoszących acyl z bakterii i roślin jest identyczna (70, 88, 113). Jednak białko bakteryjne ma wyższą aktywność niż białko roślinne w procesie biosyntezy. Na podstawie obecnych danych nie można jeszcze wytłumaczyć tego faktu. Przypuszcza się, że jest to związane z różną sekwencją aminokwasów w tym miejscu łańcucha białka przenoszącego acyl, które oddziałują z enzymami syntetazy (86, 87).

Z badań wynika, że do funkcjonowania w biosyntezie kwasów tłuszczowych białko przenoszące acyl musi mieć nienaruszoną w dużym stopniu strukturę. Jediną możliwą modyfikacją jest odszczepienie trzech aminokwasów z C końca (70, 71). Natomiast otrzymany w wyniku hydrolizy trypsyną duży peptyd, o masie równej połowie cząsteczki białka przenoszącego acyl i zawierający nienaruszoną grupę prostetyczną, nie jest aktywny w biosyntezie.

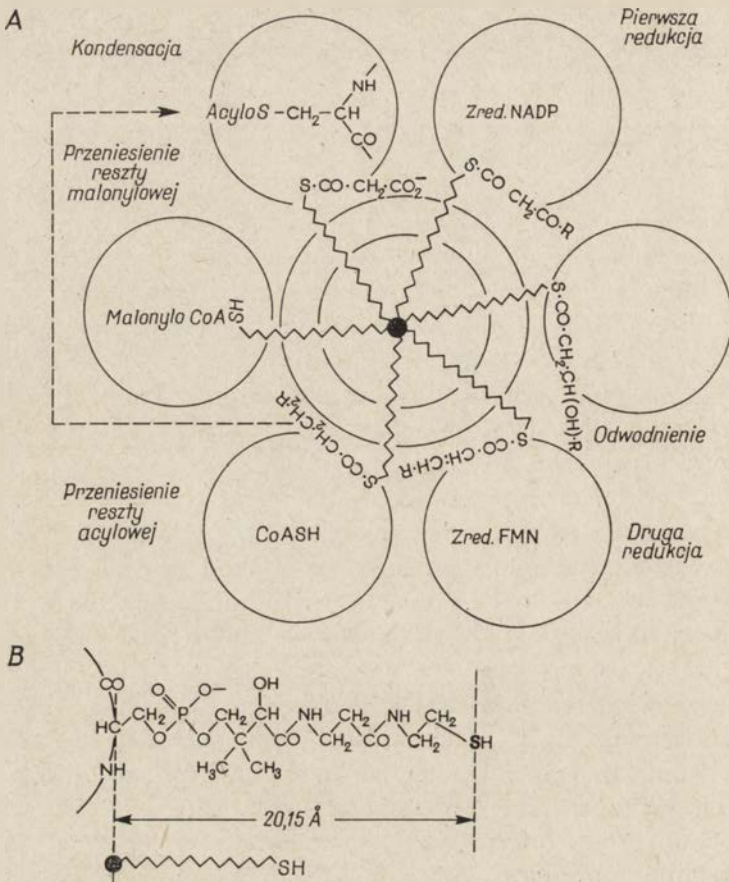
Dane fizykochemiczne wskazują, że białko przenoszące acyl z bakterii jest typowym białkiem globularnym, silnie pozwijanym i słabo uwodnionym, o wysokim stopniu uporządkowania struktury (87, 115). Ta charakterystyczna cecha białek globularnych znika odwracalnie w roztworze chlorowodoru guanidyny. Prawdopodobnie białko przenoszące acyl ma strukturę spiralną i inne rodzaje wewnętrznego pofałdowania (87).

Przyłączenie pośredników reakcji biosyntezy kwasów tłuszczowych *de novo* przez związaną z białkiem przenoszącym acyl 4'-fosfopantoteinę umożliwia funkcjonowanie kompleksu syntetazy. W ten sposób bowiem powstaje elastyczne „ramię” o długości około 20Å, gdy jest całkowicie wyprostowane, lub krótsze, gdy jest pofałdowane (schemat 6). Dzięki temu pośredniki biosyntezy, związane kowalencyjnie z grupą -SH, mogą być blisko miejsc aktywnych enzymów, których przemieszczanie ogranicza struktura wieloenzymatycznego kompleksu.

2. Regulacja aktywności syntetazy kwasów tłuszczowych

Karboksylaza acetyloCoA (acetyloCoA:ligaza, EC 6.4.1.2) katalizuje pierwszy etap syntezy długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Stwierdzono, że ta reakcja ogranicza szybkość syntezy w tkankach zwierzęcych (8, 24, 93, 94). Aktywność enzymu jest zwiększana przez dwu- i trójkarboksylowe kwasy, z których cytrynian i izocytrynian są najbardziej efektywne (78, 85, 120). Wykazano, że jest to związane z agregacją karboksylazy acetyloCoA do formy bardziej aktywnej (95, 96, 117). Natomiast długołańcuchowe pochodne acyloCoA, czyli produkty końcowe syntezy kwasów tłuszczowych, hamują aktywność karboksylazy (9, 57). Inhibicja ta jest współzawodnicza w stosunku do cytrynianu.

Ostatnie badania wskazują, że kluczową rolę w regulacji syntezy kwasów tłuszczowych może odgrywać frakcja mikrosomalna (21).



Schemat 6. Reakcje zachodzące podczas biosyntezy kwasów tłuszczowych w wieloenzymatycznym kompleksie (wg 68)

III. Uwagi końcowe

Wieloenzymatyczne kompleksy są jednostkami biochemicznymi o złożonej strukturze, która jest pośrednia między pojedynczymi cząsteczkami enzymów i organellami komórkowymi. Istnienie takich układów enzymatycznych wskazuje na ich odpowiednie znaczenie dla komórki. Jest oczywiste, że powiązanie pośredników ciągu reakcji kowalencyjnie z enzymami kompleksów zwiększa szybkość reakcji w porównaniu z reakcjami, zachodzącymi w roztworze oddzielnych enzymów, gdzie prawdopodobieństwo reakcji produktu wytworzonego przez jeden enzym z miejscem katalitycznym następnego enzymu jest mniejsze. Wynikiem tego jest dużo wyższa efektywność kompleksu niż analogicznych układów zdolnych do dysocjacji. Przykładem jest łatwo dysocjujący na enzymy składowe omawiany kompleks syntetazy kwasów tłuszczowych z *Escherichia coli* i sta-

bilny kompleks z wątroby ptaków. Stosunek aktywności właściwych obu tych kompleksów wynosi 1:1000 (47). Należy też podkreślić, że dzięki uzyskaniu odpowiedniej konformacji przez enzymy składowe kompleksu, co determinuje ogólna struktura kompleksu, zwiększa się również efektywność kompleksu. Efekt ten obserwuje się dla kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej. Stwierdzono bowiem, że podjednostka morfologiczna transacetylazy o masie cząsteczkowej 120 000 (co stanowi 1/8 masy natywnego enzymu) może odtworzyć kompleks dehydrogenazy pirogronianowej o masie równej 1/8 masy kompleksu natywnego, jednak o dużo mniejszej aktywności enzymatycznej niż kompleks natywny (109).

Poza tym, dzięki strukturze kompleksu, substraty poszczególnych reakcji łatwo ulegają przemieszczeniu od jednego enzymu do następnego bez dyfuzji i rozcieńczania w cytoplazmie. Duże znaczenie ma też fakt, że kowalencyjnie powiązane pośredniki reakcji z kompleksem nie są dostępne dla procesów współzawodniczych. Wieloenzymatyczne kompleksy są więc formą odpowiedniego rozgraniczenia reakcji na najmniejszej możliwej przestrzeni.

LITERATURA

1. Ailhand G. P., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **241**, 3866 (1966).
2. Alberts A. W., *Federation Proc.* **22**, 362 (1963).
3. Alberts A. W., *Federation Proc.* **23**, 166 (1964).
4. Alberts A. W., Goldman P., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **238**, 557 (1963).
5. Alberts A. W., Majerus P. W., Talamo B., Vagelos P. R., *Biochemistry* **3**, 1563 (1964).
6. Alberts A. W., Majerus P. W., Vagelos P. R., *Biochemistry* **4**, 2265 (1965).
7. Alberts A. W., Vagelos P. R., *Federation Proc.* **20**, 273 (1961).
8. Bortz W., Abraham S., Chaikoff I. L., *J. Biol. Chem.* **238**, 1266 (1963).
9. Bortz W., Lynen F., *Biochem. Z.* **337**, 505 (1963).
10. Bressler R., Wakil S. J., *J. Biol. Chem.* **236**, 1643 (1961).
11. Brodie J. D., Wasson G., Porter J. W., *J. Biol. Chem.* **239**, 1346 (1964).
12. Brooks J. L., Stumpf P. K., *Biochim. Biophys. Acta* **98**, 213 (1965).
13. Brooks J. L., Stumpf P. K., *Arch. Biochem. Biophys.* **116**, 108 (1966).
14. Burton K., *Biochem. J.* **71**, 388 (1959).
15. Butterworth P. H. W., Baum H., Porter J. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 716 (1967).
16. Butterworth P. H. W., Yang P. C., Bock R. M., Porter J. W., *J. Biol. Chem.* **242**, 3508 (1967).
17. Butterworth P. H. W., Yang P. C., Porter J. W., *Federation Proc.* **25**, 339 (1966).
18. Connely J. L., Danner D. J., Bowden J. A., *J. Biol. Chem.* **243**, 1198 (1968).
19. Danner D. J., Bowden J. A., *Federation Proc.* **25**, 746 (1966).
20. Dennert G., Höglund S., *European J. Biochem.* **12**, 502 (1970).

21. Donaldson W. E., Wit-Peeters E. M., Scholte H. R., *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 35 (1970).
22. Fernandez-Moran H., Reed L. J., Koike M., Willms C. R., *Science* **145**, 930 (1964).
23. Friedman D. L., Larner J., *Biochemistry* **2**, 669 (1963).
24. Ganguly J., *Biochim. Biophys. Acta* **40**, 110 (1960).
25. Garland P. B., Randle P. J., *Biochem. J.* **91**, 6c (1964).
26. Goedde H. W., Hüfner M., Möhlenbeck F., Blume K. G., *Biochim. Biophys. Acta* **132**, 524 (1967).
27. Goldman P., *J. Biol. Chem.* **239**, 3663 (1964).
28. Goldman P., Alberts A. W., Vagelos P. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 280 (1961).
29. Goldman P., Alberts A. W., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **238**, 1255 (1963).
30. Goldman P., Alberts A. W., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **238**, 3579 (1963).
31. Goldman P., Vagelos P. R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 414 (1962).
32. Green D. E., The Harvey Lectures, Series 52, Academic Press, New York 1958, str. 177.
33. Guchhait R. B., Putz G. R., Porter J. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **117**, 541 (1966).
34. Hansen R. G., Henning U., *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 355 (1966).
35. Haslam R. J., w Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria, red. J. W. Tager, S. Papa, E. Quagliariello, E. C. Slater, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 108.
36. Hayakawa T., Hirasima M., Ide S., Hamada M., Okabe K., Koike M., *J. Biol. Chem.* **241**, 4694 (1966).
37. Hayakawa T., Kanzaki T., Kitamura T., Fukuyoshi Y., Siku-
rai Y., Koike K., Suematsu T., Koike M., *J. Biol. Chem.* **244**, 3660 (1969).
38. Hayakawa T., Koike M., *J. Biol. Chem.* **242**, 1356 (1967).
39. Hayakawa T., Muta M., Hirasima M., Ide S., Okabe K., Koike M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **17**, 51 (1964).
40. Henney H. R. Jr., Willms C. R., Muramatsu T., Mukherjee B. B., Reed L. J., *J. Biol. Chem.* **242**, 898 (1967).
41. Henning U., Dennert G., Hertel R., Shipp W. S., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 227 (1966).
42. Hirashima M., Hayakawa T., Koike M., *J. Biol. Chem.* **242**, 902 (1967).
43. Horning M. G., Martin D. B., Karmen A., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **236**, 669 (1961).
44. Hsu R. Y., Wagner B. J., *Biochemistry* **9**, 245 (1970).
45. Hsu R. Y., Wasson G., Porter J. W., *Federation Proc.* **24**, 291 (1965).
46. Hsu R. Y., Wasson G., Porter J. W., *J. Biol. Chem.* **240**, 3736 (1965).
47. Hsu R. Y., Yun S. L., *Biochemistry* **9**, 239 (1970).
48. Ishikawa E., Oliver R. M., Reed L. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 534 (1966).
49. Jagannathan V., Schweet R. S., *J. Biol. Chem.* **196**, 551 (1952).
50. Jagow von G., Westermann B., Wieland O., *European J. Biochem.* **3**, 512 (1968).
51. Kanzaki T., Hayakawa T., Hamada M., Fukuyoshi Y., Koike M., *J. Biol. Chem.* **244**, 1183 (1969).

52. Kaufman S., Gilvarg C., Cori O., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **203**, 869 (1953).
53. Keech D. B., Utter M. F., *J. Biol. Chem.* **238**, 2609 (1963).
54. Koike M., Reed L. J., Carrol W. R., *J. Biol. Chem.* **235**, 1924 (1960).
55. Koike M., Reed L. J., Carrol W. R., *J. Biol. Chem.* **238**, 30 (1963).
56. Koike M., Shah P. C., Reed L. J., *J. Biol. Chem.* **235** 1939 (1960).
57. Korchak H. M., Masoro E. J., *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 750 (1964).
58. Korkes S., del Campillo A., Gunsalus I. C., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **193**, 721 (1951).
59. Korkes S., del Campillo A., Ochoa S., *J. Biol. Chem.* **195**, 541 (1952).
60. Krebs H. A., *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* **159**, 545 (1964).
61. Krebs E. G., Fischer E. H., *Advan Enzymol.* **24**, 263 (1962).
62. Labrabee A. R., McDaniel E. G., Bakerman H. A., Vagelos P. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **54**, 267 (1965).
63. Lennarz W. J., Light R. J., Block K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 840 (1962).
64. Linn T. C., Pettit F. H., Hucho F., Reed L. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **64**, 227 (1969).
65. Linn T. C., Pettit F. H., Reed L. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **62**, 234 (1969).
66. Lynen F., *Federation Proc.* **20**, 941 (1961).
67. Lynen F., w *New Perspectives in Biology*, red. M. Sela, Elsevier, Amsterdam 1964, str. 132.
68. Lynen F., *Biochem. J.* **102**, 381 (1967).
69. Lynen F., Oesterhelt D., Schweizer E., Willecke K., w *Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism*, red. F. C. Gran, Academic Press, Londyn-New York 1968, str. 1.
70. Majerus P. W., *J. Biol. Chem.* **242**, 2325 (1967).
71. Majerus P. W., *Science* **159**, 428 (1968).
72. Majerus P. W., Alberts A. W., Vagelos P. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1231 (1964).
73. Majerus P. W., Alberts A. W., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **240**, 618 (1965).
74. Majerus P. W., Alberts A. W., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **240**, 4723 (1965).
75. Majerus P. W., Alberts A. W., Vagelos P. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 410 (1965).
76. Majerus P. W., Vagelos P. R., *Federation Proc.* **24**, 290 (1965).
77. Martin D. B., Horning M. G., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **236**, 663 (1961).
78. Martin D. B., Vagelos P. R., *J. Biol. Chem.* **237**, 1787 (1962).
79. Martin D. B., Vagelos P. R., w *Handbook of Physiology*, Section 5, Adipose Tissue, red. A. E. Renold, G. F. Cahill, Jr., Baltimore, Md: Wawerly Press, Inc., 1965, str. 211.
80. Massey V., *Biochim. Biophys. Acta* **30**, 205 (1958).
81. Massey V., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, 286 (1959).
82. Massey V., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 447 (1960).
83. Massey V., w *The Enzymes*, red. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, Academic Press, New York 1963, t. 7, str. 275.
84. Massey V., Hofmann T., Palmer G., *J. Biol. Chem.* **237**, 3820 (1962).
85. Matsushashi M., Matsushashi S., Lynen F., *Biochem. Z.* **340**, 263 (1964).

86. Matsumura S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **29**, 437 (1967).
87. Matsumura S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **38**, 238 (1970).
88. Matsumura S., Stumps P. K., *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 932 (1968).
89. Mukherjee B. B., Matthews J., Horney D. L., Reed L. J., *J. Biol. Chem.* **240**, PC 2268 (1965).
90. Nagai J., Block K., *J. Biol. Chem.* **242**, 357 (1967).
91. Namba Y., Yoshizawa K., Ejima A., Hayashi T., Kaneda T., *J. Biol. Chem.* **244**, 4437 (1969).
92. Nicholls D. G., Shephard D., Garland P. B., *Biochem. J.* **103**, 677 (1967).
93. Numa S., Bortz W. M., Lynen F., *Advan. Enzyme Regulation* **3**, 407 (1967).
94. Numa S., Matsushashi M., Lynen F., *Biochem. Z.* **334**, 203 (1961).
95. Numa S., Ringelman E., *Biochem. Z.* **343**, 258 (1965).
96. Numa S., Ringelman E., Lynen F., *Biochem. Z.* **343**, 243 (1965).
97. Overath P., Stumpf P. K., *Federation Proc.* **23**, 166 (1964).
98. Overath P., Stumpf P. K., *J. Biol. Chem.* **239**, 4103 (1964).
99. Pettit F. H., Reed L. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1126 (1967).
100. Pugh E. L., Wakil S. J., *J. Biol. Chem.* **240**, 4727 (1965).
101. Reed L. J., w *Comprehensive Biochemistry*, red. M. Florin, E. H. Stotz, American Elsevier Publishing Company Inc., New York 1967, tom 14, str. 99.
102. Reed L. J., Cox D. J., *Ann. Rev. Biochem.* **35**, 57 (1966).
103. Reed L. J., Oliver R. M., *Brookhaven Symp. Biol.* **21**, 397 (1968).
104. Sanadi D. R., Littlefield J. W., Bock R. M., *J. Biol. Chem.* **197**, 851 (1952).
105. Sauer F., Pugh E. L., Wakil S. J., Delaney R., Hill R. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 1360 (1964).
106. Schwartz E. R., Old L. O., Reed L. J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**, 495 (1968).
107. Schwartz E. R., Reed L. J., *Federation Proc.* **27**, 389 (1968).
108. Schwartz E. R., Reed L. J., *J. Biol. Chem.* **243**, 639 (1968).
109. Schwartz E. R., Reed L. J., *J. Biol. Chem.* **244**, 6074 (1969).
110. Schwartz E. R., Reed L. J., *Biochemistry* **9**, 1434 (1970).
111. Schweet R. S., Katchman B., Bock R. M., Jagannathan V., *J. Biol. Chem.* **196**, 563 (1952).
112. Searls R. L., Sanadi D. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **45**, 697 (1959).
113. Simoni R. D., Criddle R. S., Stumpf P. K., *J. Biol. Chem.* **242**, 573 (1967).
114. Smith S., Abraham S., *Federation Proc.* **28**, 537 (1969).
115. Takagi T., Tanford C., *J. Biol. Chem.* **243**, 6434 (1968).
116. Toomey R. E., Wakil S. J., *J. Biol. Chem.* **241**, 1159 (1966).
117. Vagelos P. R., Alberts A. W., Martin D. B., *J. Biol. Chem.* **238**, 535 (1963).
118. Vagelos P. R., Majerus P. W., Alberts A. W., Larvabee A. R., Ailhand G. P., *Federation Proc.* **25**, 1485 (1966).
119. Vanaman T. C., Wakil S. J., Hill R. L., *J. Biol. Chem.* **243**, 6409 (1968).
120. Waite M., Wakil S. J., *J. Biol. Chem.* **238**, 77 (1963).
121. Wakil S. J., Pugh E. L., Sauer F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **52**, 106 (1964).
122. Walter P., Poetkan V., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **241**, 2523 (1966).
123. Wells W. W., Schultze J., Lynen F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 633 (1966).

124. Williamson I. B., Goldman J. K., Wakil S. J., *Federation Proc.* **25**, 340 (1966).
125. Willms C. R., Oliver R. M., Henney H. R., Jr., Mukherjee B. B., Reed L. J., *J. Biol. Chem.* **242**, 889 (1967).
126. Witt-Peeters E. M., *Biochim. Biophys. Acta* **176**, 453 (1969).
127. Yang P. C., Bock R. M., Hsu R. Y., Porter J. W., *Biochim. Biophys. Acta* **110**, 608 (1965).
128. Yang P. C., Butterworth P. H. W., Bock R. M., Porter J. W., *J. Biol. Chem.* **242**, 3501 (1967).

JADWIGA BRYŁA *

Regulacja glukoneogenezy

I. Wpływ utleniania kwasów tłuszczowych

Control of Gluconeogenesis

I. Effects of fatty acid oxidation

Effects of fatty acid oxidation on the rate of glucose production as well as on the changes in the tissue levels of intermediates of the gluconeogenic pathway are reviewed.

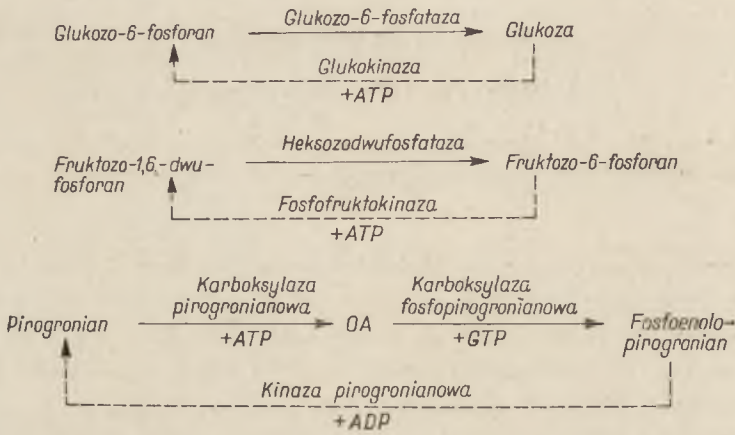
Prekursorami w procesie glukoneogenezy są aminokwasy (głównie: Glu, Asp, Arg, Ala, Ser, Pro) (1, 17, 52, 61) oraz pirogronian i mleczan. Wykorzystywanie przez organizm poszczególnych metabolitów do syntezy glukozy zależy od stosowanej diety, wykonywanej pracy oraz poziomu hormonów (52). W czasie głodu głównym źródłem węgla w procesie glukoneogenezy są aminokwasy i glicerol, przy czym szybkość ich wykorzystywania zależy od poziomu glukokortykoidów (54). Natomiast w organizmach wykonujących ciężką pracę fizyczną substratami dla syntezy glukozy są mleczan i pirogronian, wytwarzane w pracujących mięśniach i przenoszone przez krew z mięśni do wątroby i nerek (52).

Wśród procesów metabolicznych regulacja glukoneogenezy ma szczególne znaczenie ze względu na to, że szybkość wytwarzania glukozy jest bardzo różna w zależności od warunków fizjologicznych. Gdy w pożywieniu znajduje się dużo węglowodanów, synteza glukozy nie jest konieczna. Natomiast przy ich braku lub w czasie głodu, glukoza musi być syntetyzowana celem utrzymania jej stałego poziomu w krwi i dostarczania do tych tkanek, w których glikoliza jest jedynym procesem dostarczającym energii (erytrocyty, mózg, gałka oczna). W związku z tym, w tkankach glukoneogenicznych (wątroba, nerki) muszą istnieć specjalne

* Dr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: DAP — fosfodwuhydroksyaceton, FDP — fruktozo-1-dwufosforan, F6P — fruktozo-6-fosforan, GAP — aldehyd 3-fosfo-D-glicerynowy, G6P — glukoza-6-fosforan, Mal — jabłczan, OA — szczawiooctan, PEP — fosfoenolopirogronian, Pyr — pirogronian, PGA — kwas fosfoglicerynowy, Lact — mleczan

mechanizmy regulujące szybkość wytwarzania glukozy w zakresie od zera do tak wysokich wartości jak 60g/24 godziny u dorosłego człowieka (41). Ponadto wiele enzymów glukoneogenezy może brać udział zarówno w procesie syntezy jak i degradacji glukozy. Te dwa przeciwstawne procesy nigdy nie przebiegają w tej samej komórce jednocześnie, ponieważ prowadziłoby to do bezużytecznych strat energii. Równoczesne występowanie glikolizy i glukoneogenezy nie jest możliwe dzięki działaniu mechanizmów regulacyjnych, określających kierunek reakcji w stronę syntezy lub degradacji glukozy. Etapy katalizowane przez kluczowe enzymy tych dwu dróg metabolicznych przedstawiono na schemacie 1.



Schemat 1. Reakcje katalizowane przez kluczowe enzymy glukoneogenezy i glikolizy
Linia ciągłą oznaczono kierunek reakcji przebiegających w procesie glukoneogenezy, a linią przerywaną — kierunek reakcji glikolitycznych

Enzymy glukoneogenezy:

glukoza-6-fosfataza — fosfohydrolaza D-glukoza-6-fosforanu EC 3.1.3.9; heksodwufosfataza — 1-fosfohydrolaza D-fruktozo-1,6-dwufosforanu, EC 3.1.3.11; karboksylaza pirogronianowa — ligaza pirogronian:dwutlenek węgla (ADP), EC 6.4.1.1; karboksylaza fosfopirogronianowa — karboksylaza GTP — szczawiooctan (transfosforylująca), EC 4.1.1.32;

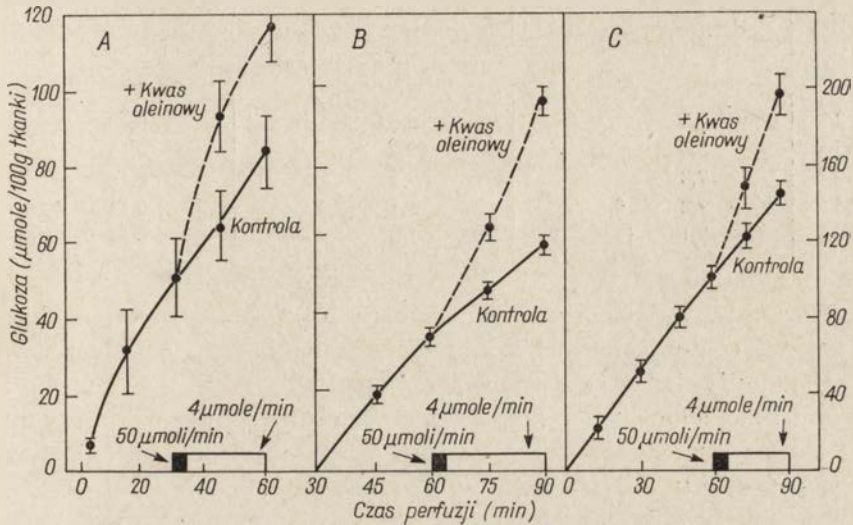
Enzymy glikolizy:

glukokinaza — 6-fosfotransferaza ATP:D-glukoza-1-fosforan, EC 2.7.1.2; fosfofruktokinaza — 1-fosfotransferaza ATP:D-fruktozo-6-fosforan, EC 2.7.1.11; kinaza pirogronianowa — fosfotransferaza ATP:pirogronian, EC 2.7.1.40;

I. Wpływ kwasów tłuszczowych na syntezę glukozy

Pobudzenie syntezy glukozy przez kwasy tłuszczowe zaobserwowali w 1965 roku Struck i wsp. (82, 83). Zjawisko to wykazano, w homogenatach wątroby gołębia (13, 15, 27, 28, 40, 46), skrawkach wątroby szczura (29), skrawkach kory nerki (48, 74), w wątrobie szczura poddawanej perfuzji (34, 35, 49, 68, 69, 79, 80, 81, 82, 83, 87, 99, 101, 102, 103, 104, 105) i w wątrobie szczura *in vivo* (21, 27, 98, 99) po podaniu mleczanu (69, 101, 103), pirogronianu (68, 69, 81, 87, 95, 101) lub alaniny (35, 98, 99, 101, 102, 104, 107) jako substratów.

Zjawisko zwiększania syntezy glukozy przez kwas oleinowy ilustruje rysunek 1. Z alaniny glukoza była syntetyzowana z szybkością 60 $\mu\text{moli}/100\text{ g}$ wątroby/godzinę, natomiast z mleczanu powstawało 120 μmoli glukozy, a z pirogronianu 95 μmoli glukozy/100 g wątroby/go-



Rys. 1. Wpływ kwasu oleinowego na szybkość wytwarzania glukozy w wątrobie szczura (wg 102)

W doświadczeniu oznaczano szybkość wytwarzania glukozy w wątrobie głodzonego szczura przemywanej roztworem alaniny (A), mleczanu (B) lub pirogronianu (C). Pionowe odcinki oznaczają odchylenia od wartości średniej pomiaru. Kwas oleinowy dodano po 30 min. (rys. 1A) lub po 60 min. (rys. 1B i C) perfuzji roztworem substratu: początkowo z szybkością 50 $\mu\text{mole}/\text{min}$. przez 3 min. w celu osiągnięcia stężenia około 1,5 μmole kwasu w roztworze stosowanym do perfuzji, a następnie z szybkością 3 $\mu\text{mole}/\text{min}$. (rys. A i B) lub 4 $\mu\text{mole}/\text{min}$. (rys. C).

dzinę. Najlepszym prekursorem w glukoneogenezie w wątrobie jest zatem mleczan (16, 17, 69, 102). Dodanie kwasu oleinowego powoduje dwukrotny wzrost szybkości syntezy glukozy w porównaniu z wartościami kontrolnymi, niezależnie od użytego substratu (99, 101, 102). Ponieważ bez dodania substratu ilość glukozy, mleczanu i pirogronianu w wątrobie jest niezwykle niska i nie ulega zwiększeniu po dodaniu kwasu oleinowego (tablica 1), powstająca po perfuzji roztworem alaniny, pirogronianu lub mleczanu glukoza musi być wytwarzana w procesie glukoneogenezy (101, 102). Przemawia za tym również fakt, że poziom glikogenu w wątrobie nie zmienia się po perfuzji (68, 102).

Jak wykazali Wieland, Menahan i v. Jagov-Westerman (95), hamowanie wytwarzania glukozy przez glukodiazynę (2-benzeno-sulfamido-5- β -metoksyetoksyprymidynę), związek antydiabetyczny, powodujący zahamowanie hydrolizy trójglicerydów może być zniesione przez dodatek egzogennych kwasów tłuszczowych. Tak więc zwiększona glukoneogeneza może być spowodowana zwiększonym poziomem kwasów

Tablica 1

Wpływ kwasu oleinowego na syntezę glukozy w wątrobie szczura poddawanej perfuzji buforem węglanowym (wg 102)

Kwas oleinowy dodano po 30 min. perfuzji roztworem buforu

Czas perfuzji min.	Synteza glukozy		Synteza mleczanu		Synteza pirogronianu	
	Kontrola + Oleinian		Kontrola + Oleinian		Kontrola + Oleinian	
	μmole/100 g wątroby					
2	2,8		6,6		0,18	
15	3,4		15,2		0,15	
30	7,8		3,3		0,18	
45	9,2	9,4	1,1	2,9	0,13	0,16
60	9,1	13,9	1,0	1,9	0,14	0,16

tłuszczowych w wątrobie, wskutek wzmożonej lipolizy w tkance tłuszczowej i w wątrobie. Ponieważ inhibitory utleniania kwasów tłuszczowych: α -bromopalmitynian (11), kwas 4-pentenoinowy (10, 12, 13, 74, 105) i pochodne (+)acylokarnityny (14, 22, 103), hamują syntezę glukozy przyjmuje się, że glukoneogenezę pobudzają acetyloCoA i zredukowany NAD powstające w procesie utleniania kwasów tłuszczowych.

II. Etapy glukoneogenezy warunkujące jej szybkość

W celu stwierdzenia, które etapy glukoneogenezy podlegają regulacji stosuje się kilka metod: mierzenie aktywności enzymów tej drogi metabolicznej, mierzenie szybkości syntezy glukozy z różnych substratów, oraz oznaczanie poziomu metabolitów glukoneogenezy.

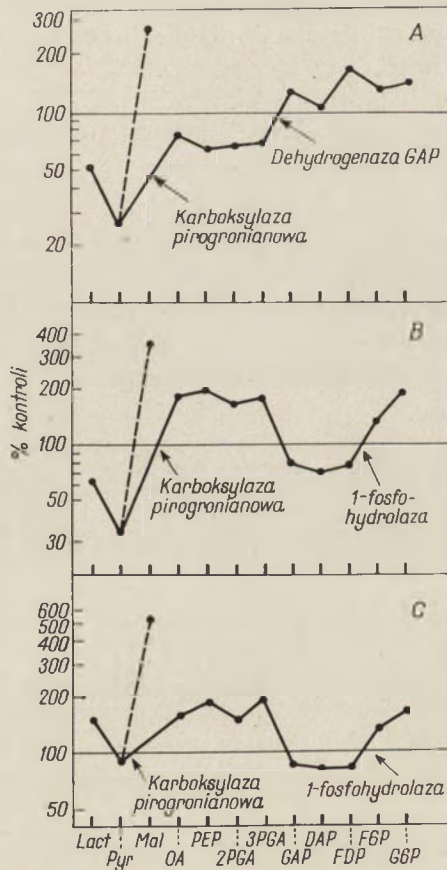
Z pomiarów aktywności enzymatycznych w homogenatach wątroby (73, 94) wynika, że hamowanie syntezy glukozy warunkują enzymy charakteryzujące się najniższymi aktywnościami: 1-fosfohydrolaza fruktozo-1,6-dwufosforanu, fosfohydrolaza glukozy-6-fosforanu, aldolaza, karboksylaza pirogronianowa i karboksylaza fosfopirogronianowa.

Pomiar szybkości syntezy glukozy z różnych związków pośrednich glukoneogenezy przeprowadzono w homogenatach wątroby gołębia (42), skrawkach wątroby szczura (47) oraz w wątrobie szczura poddawanej perfuzji (17, 18, 31, 69). Badania te wykazały, że glukoza syntetyzuje się szybciej z fruktozy i dwuhydroksyacetonu niż ze szczawiooctanu, mleczanu i pirogronianu jako substratów. Dlatego też przyjęto, że szybkość glukoneogenezy warunkują enzymy katalizujące reakcje na etapie szczawiooctan-kwas 3-fosfoglicerynowy oraz ograniczona przepuszczalność błon plazmatycznych w stosunku do szczawiooctanu.

Niezwykle użyteczne okazało się oznaczanie poziomu poszczególnych pośredników glukoneogenezy (18, 19, 56, 99, 101, 102, 104, 107). Wyniki

przedstawione na rysunku 2 wskazują, że po dodaniu kwasu oleinowego poziom jabłczanu zwiększa się znacznie w obecności wszystkich trzech prekursorów glukoneogenezy. We wszystkich trzech przypadkach obserwuje się również zmniejszenie stężenia pirogronianu, z czego można wnosić o przyspieszeniu reakcji katalizowanej przez karboksylazę pirogronianową.

Drugi etap warunkujący szybkość glukoneogenezy zidentyfikowano po dodaniu kwasu oleinowego i alaniny (rysunek 2A). Obniżone stężenie pośredników na etapie szczawiooctan — 3-fosfoglicerynian wskazuje na kontrolę aktywności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (104).



Rys. 2. Wpływ kwasu oleinowego na zmianę zawartości pośredników glukoneogenezy w wątrobie szczura poddawanej perfuzji roztworem alaniny (A), mleczanu (B) lub pirogronianu (C) (wg 102)

Na wykresie poszczególne pośredniki są umieszczone wzdłuż osi odciętych w kolejności, w jakiej są one wytwarzane w procesie glukoneogenezy. Na osi rzędnych odłożono zmiany (w %) zawartości poszczególnych pośredników po 30 min. od momentu dodawania kwasu oleinowego w stosunku do wartości kontrolnych. Strzałki i napisy na wykresach dotyczą enzymów, których aktywność jest regulowana w wyniku utleniania kwasu oleinowego

Zlokalizowanie trzeciego miejsca oddziaływania wzajemnego procesów utleniania kwasów tłuszczowych i glukoneogenezy jest o wiele trudniejsze ze względu na istnienie wielu dróg rozgałęziających. Na przykład reakcje fosforylacji fruktozo-6-fosforanu i hydrolizy fruktozo-1,6-dwufosforanu tworzą pętlę, w której poziomy metabolitów mogą ulegać zmianie w wyniku zmian aktywności fosfofruktokinazy i 1-fosfohydrolazy fruktozo-1,6-dwufosforanu. Ponadto fosfodwuhydroksyaceton może ulegać redukcji przy współudziale zredukowanego NAD z wytworzeniem α -glicerofosforanu, który jest akceptorem acyloCoA w procesie syntezy trójglicerydów. Zatem zahamowanie fosfofruktokinazy przez cytrynian (70) może podwyższać stężenie fruktozo-1,6-dwufosforanu, a wzmoczona synteza trójglicerydów w wyniku zwiększania poziomu acyloCoA prowadzi do zmniejszenia poziomu fosfotrioz. Obniżenie poziomu fosfotrioz i fruktozo-1,6-dwufosforanu oraz podwyższenie poziomu fruktozo-6-fosforanu i glukozo-6-fosforanu po dodaniu kwasu oleinowego do wątroby szczura, wytwarzającej glukozę z mleczanu (rysunek 2B) lub pirogronianu (rysunek 2C) jako substratów wskazuje, że aktywność 1-fosfohydrolazy fruktozo-1,6-dwufosforanu może być również czynnikiem regulującym szybkość glukoneogenezy.

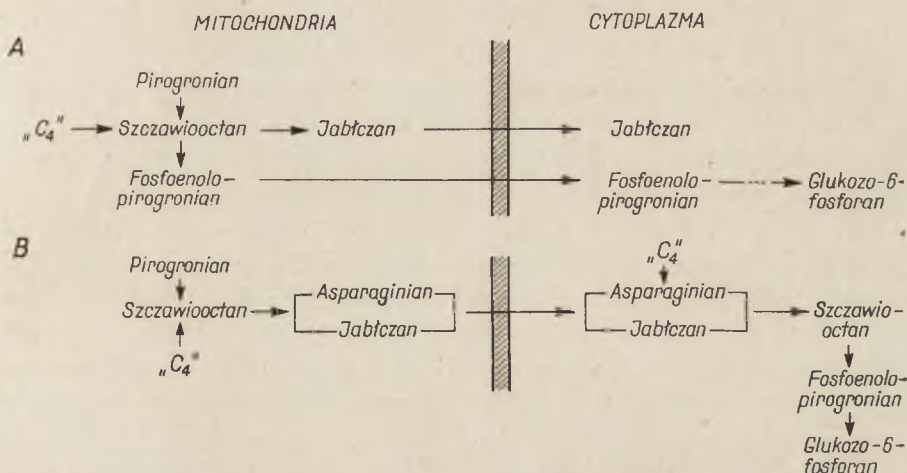
A zatem badania przeprowadzone różnymi metodami wykazały, że utlenianie kwasów tłuszczowych wpływa głównie na cztery enzymy glukoneogenezy: karboksylazę pirogronianową, karboksylazę fosfopirogronianową, dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego i 1-fosfohydrolazę fruktozo-1,6-dwufosforanu.

III. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie karboksylazy pirogronianowej i karboksylazy fosfopirogronianowej

Wyjaśnienie mechanizmu syntezy glukozy było trudne ze względu na różne wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie enzymów katalizujących syntezę fosfoenolpirogronianu. W wątrobie szczura (7, 8, 20, 33, 38, 57, 65, 76, 89, 102), człowieka (8), królika, gołębia, kurczaka (27, 65) i świnki morskiej (65, 78) karboksylaza pirogronianowa jest zlokalizowana głównie, jeżeli nie wyłącznie, w mitochondriach. Występowanie enzymu w cytoplazmie wydaje się być mało prawdopodobne ze względu na to, że jego aktywność musiałaby być regulowana przez metabolity powstające w mitochondriach (102).

Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie karboksylazy fosfopirogronianowej jest różne u różnych gatunków (65). W wątrobie i nerce szczura enzym ten wykryto wyłącznie w cytoplazmie (2, 3, 20, 30, 32, 43, 50, 61, 64, 65, 68, 73, 76), natomiast w wątrobie królika, gołębia i kurczęcia — wyłącznie w mitochondriach (27, 62, 65, 73), a w wątrobie świnki morskiej — zarówno w cytoplazmie jak i w mitochondriach (25, 65, 73, 84).

W przypadku, gdy oba enzymy występują w mitochondriach, synteza szczawiooctanu i fosfoenolopirogronianu zachodzi w tym samym przedziale komórkowym (23, 57, 91) (schemat 2A). Wytworzony fosfoenolopirogronian jest następnie przenoszony do cytoplazmy, gdzie ulega dalszym przemianom. Mechanizm transportu fosfoenolopirogronianu z mitochondriów do cytoplazmy nie jest dotychczas wyjaśniony (57).



Schemat 2. Proponowane drogi syntezy fosfoenolopirogronianu w wątrobie i nerce różnych gatunków zwierząt (wg 73)

Objaśnienia w tekście

W wątrobie i nerce szczura, zawierających karboksylazę pirogronianową w mitochondriach, a karboksylazę fosfopirogronianową w cytoplazmie, musi istnieć specjalny mechanizm pozwalający na przenoszenie szczawiooctanu z mitochondriów do cytoplazmy (30, 51, 57, 61, 73, 75, 92). Konieczność istnienia takiego mechanizmu wynika z obserwacji, że szczawiooctan charakteryzuje się niską zdolnością przenikania przez błonę mitochondrialną (4), a karboksylaza pirogronianowa jest zlokalizowana w *matrix* (57), co wyklucza możliwość jej bezpośredniego działania na substraty cytoplazmatyczne (7, 58). Lardy, Paetkau i Walter (51, 92) oraz Haynes (30) dostarczyli danych wskazujących, że przenoszenie szczawiooctanu z mitochondriów do cytoplazmy zachodzi przy współdziałaniu transaminazy glutaminian-szczawiooctan i dehydrogenazy jabłczanowej — enzymów zlokalizowanych zarówno w mitochondriach jak i cytoplazmie (6, 63, 77). Ze znakowania związków, które uważano za biorące udział w transporcie szczawiooctanu (30, 92) oraz z szybkości przekształcania tych związków w fosfoenolopirogronian w cytoplazmie wątroby szczura (92) autorzy wnoszą (schemat 2B), że w mitochondriach szczawiooctan ulega przekształceniu w jabłczan i asparaginian. Związki te są przenoszone przez błonę mitochondrialną do cytoplazmy i ponownie

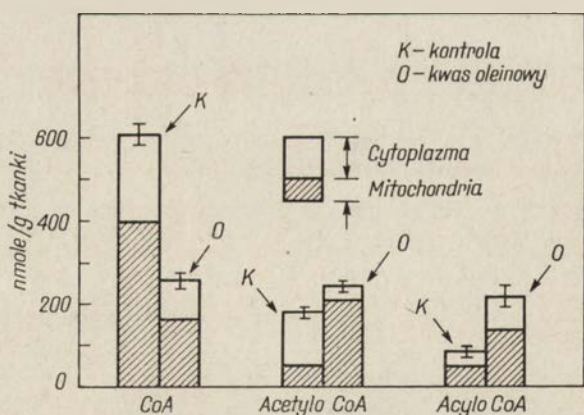
przekształcane w szczawiooctan. W ten sposób szczawiooctan staje się dostępny dla karboksylazy fosfopirogronianowej i ulega dalszym przemianom w procesie glukoneogenezy.

W organizmach, w których karboksylazę fosfoenolopirogronianową wykryto zarówno w cytoplazmie jak i w mitochondriach, synteza fosfoenolopirogronianu odbywa się prawdopodobnie przy udziale enzymu cytoplazmatycznego (30, 45).

IV. Kontrola aktywności enzymatycznych

1. Karboksylaza pirogronianowa

W 1963 roku Keech i Utter (38, 90) wykazali, że aktywatorem karboksylazy pirogronianowej z wątroby szczura jest acetyloCoA. Okazało się, że enzym ten z wątroby zwierząt innych gatunków (71, 72, 73) jest również aktywowany przez acetyloCoA. Rysunek 3 ilustruje wpływ dodania kwasu oleinowego na zawartość i rozmieszczenie niezwiązanego CoA, acetyloCoA i acyloCoA we frakcjach subkomórkowych wątroby szczura poddawanej perfuzji roztworem mleczanu. Jak widać kwas oleinowy obniża zawartość niezwiązanego CoA, a podwyższa poziom acetyloCoA i acyloCoA (81, 82, 83, 101, 102, 103). Podobne wyniki otrzymano również w obecności pirogronianu i alaniny jako substratów glukoneogenezy (101).



Rys. 3. Wpływ kwasu oleinowego na poziom CoA, acetyloCoA i acyloCoA w wątrobie szczura poddawanej perfuzji mleczanem (wg 101)

W wątrobie zwierząt głodzonych (5, 88, 104) poziom acetyloCoA zwiększa się w mitochondriach, a nieznacznie zmniejsza w cytoplazmie. Obserwacja ta wydaje się przemawiać za hipotezą, że stymulacja glukoneoge-

nezy *in vivo* podczas wzmożonego utleniania kwasów tłuszczowych jest wynikiem aktywacji karboksylazy pirogronianowej przez zwiększony poziom acetyloCoA w mitochondriach (7, 101, 102, 103, 106). Istniejące rozbieżności między wewnątrzkomórkowym stężeniem acetyloCoA (101) a niską stałą aktywacji izolowanego enzymu (72, 73) Williamson i wsp. (102) tłumaczą różnymi warunkami oznaczeń *in vivo* i *in vitro*. W związku z tym można przypuszczać, że nawet w przypadku niewielkiego zwiększenia całkowitej zawartości acetyloCoA w tkance (106), jego wzrost w mitochondriach, gdzie zlokalizowana jest karboksylaza pirogronianowa, może być stosunkowo wysoki.

Za tym, że aktywacja karboksylazy pirogronianowej przez acetyloCoA warunkuje przyspieszenie glukoneogenezy, przemawia również hamowanie przez kwasy tłuszczowe oksydacyjnej dekarboksylacji pirogronianu w mitochondriach wątroby szczura (9, 26, 37, 92), nerki szczura (61) i wątroby świnki morskiej (78). Zahamowanie dehydrogenazy pirogronianowej powoduje, że pirogronian jest wykorzystywany wyłącznie w reakcji karboksylacji, co przyspiesza syntezę glukozy.

Walter i wsp. (92, 93) wykazali, że podczas intensywnego utleniania kwasów tłuszczowych obniża się poziom ADP w mitochondriach, zwiększa stężenie ATP i wzrasta aktywność karboksylazy pirogronianowej. Autorzy przypuszczają, że aktywację karboksylazy pirogronianowej i zwiększenie syntezy glukozy warunkuje zmniejszanie się stężenia ADP w wyniku utleniania kwasów tłuszczowych.

2. Karboksylaza fosfopirogronianowa

Większość badań nad syntezą fosfoenolopirogronianu przeprowadzono przy użyciu wątroby i nerki szczura (2, 3, 20, 30, 32, 43, 51, 59, 60, 61, 64, 65, 92), w których karboksylaza fosfopirogronianowa jest zlokalizowana w cytoplazmie. Enzym ten współzawodniczy z enzymem glikolitycznym — kinazą pirogronianową, której poziom w cytoplazmie w czasie glukoneogenezy, pomimo zmian adaptacyjnych (44), pozostaje dosyć wysoki (57). Wiadomo (24, 86), że aktywność kinazy pirogronianowej przy niskich stężeniach pirogronianu zwiększa się pod wpływem fruktozo-1,6-dwufosforanu, natomiast jest hamowana przez ATP (53, 85). W czasie intensywnej glukoneogenezy, wywołanej wzmożonym utlenianiem kwasów tłuszczowych, stężenie fruktozo-1,6-dwufosforanu jest niskie, a poziom ATP wysoki. A zatem aktywność kinazy pirogronianowej zostaje zahamowana, a tym samym wzrasta aktywność karboksylazy fosfopirogronianowej.

Według Garbera i Ballarda (25) w wątrobie świnki morskiej, w której karboksylaza fosfopirogronianowa jest zlokalizowana zarówno w cytoplazmie jak i w mitochondriach, stężenie fosfoenolopirogronianu

w mitochondriach nigdy nie przekracza 11 nmoli/mg mitochondriów, a jego nadmiar może być przekazywany do cytoplazmy (14). Jednakże zgodnie z obserwacjami Somburga i Mehlmanna (78) szybkość syntezy fosfoenolpirogrotonianu w mitochondriach wątroby świnki morskiej (0.2 μ mola/min/g wątroby) nie osiąga wartości wystarczających do syntezy glukozy nawet z minimalną szykością (1 μ mol fosfoenolpirogrotonianu/min/g wątroby). Wyjaśnienie tych rozbieżności jest możliwe przy założeniu, że przekształcanie szczawiooctanu w fosfoenolpirogrotonian zachodzi w innym przedziale mitochondriów niż wytwarzanie szczawiooctanu. Na korzyść tej hipotezy przemawia intensywne synteza fosfoenolpirogrotonianu z α -ketoglutaranu (78). Wysoka aktywność karboksylazy fosfopirogrotonianowej w obecności α -ketoglutaranu jako substratu może być wynikiem bardzo niskiej aktywności kinazy guanylowej, katalizującej reakcję syntezy ATP z GDP i ADP (36), dzięki czemu GTP wytwarzany podczas utleniania α -ketoglutaranu może być wykorzystywany bezpośrednio w reakcji syntezy fosfoenolpirogrotonianu. W związku z tym synteza fosfoenolpirogrotonianu z α -ketoglutaranu w mitochondriach ma prawdopodobnie zasadnicze znaczenie w procesie syntezy glukozy w wątrobie świnki morskiej.

3. Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

Poza odpowiednim substratem i energią niezbędną do przeprowadzenia reakcji katalizowanych przez karboksylazę pirogrotonianową, karboksylazę fosfopirogrotonianową i kinazę kwasu 3-fosfoglicerynowego, do intensywnej syntezy glukozy konieczne jest dostarczenie równoważników redukujących, biorących udział w przekształceniu kwasu 3-fosfoglicerynowego w aldehyd 3-fosfoglicerynowy (40, 51, 99, 101). Ma to szczególne znaczenie w przypadku glukoneogenezy z pirogrotonianu, alaniny, seryny i asparagianu (30, 45, 51). Natomiast przy zastosowaniu jako substratu mleczanu, dostarczenie równoważników redukujących z mitochondriów do cytoplazmy nie jest konieczne (73), ponieważ mogą one być wytwarzane w reakcji utleniania mleczanu, zachodzącej w cytoplazmie. Wyniki przedstawione w tabelicy 2 wskazują, że po dodaniu kwasu oleinowego do wątroby szczura, poddawanej perfuzji zarówno roztworem alaniny i pirogrotonianu jak i mleczanu, stosunek mleczan/pirogrotonian, jabłczan/szczawiooctan i β -hydroksymaślan/acetoctan znacznie wzrasta. Ze zwiększenia wartości stosunku mleczan/pirogrotonian można wnioskować o wzroście stosunku zredukiowanego NAD/NAD w cytoplazmie (39). Natomiast podwyższenie stosunku β -hydroksymaślan/acetoctan świadczy o zwiększeniu ilości zredukiowanego NAD w mitochondriach (39). Z danych zestawionych w tabelicy 2 (101) wynikałoby, że po dodaniu kwasu oleinowego ilość zredukiowanego NAD zwiększa się zarówno w mitochondriach jak i w cytoplazmie, można zatem

przypuszczać, że równoważniki redukujące, wytwarzane w mitochondriach w wyniku utleniania kwasów tłuszczowych, są przenoszone do cytoplazmy. Ponieważ błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla zredukowanego NAD (66) wielu autorów (30, 45, 50, 67, 73, 75, 83, 92, 99, 101, 102) przypuszcza, że związkiem dostarczającym równoważników elektronowych dla dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego jest jabłczan. Wykorzystywanie jabłczanu jako związku transportującego z mitochondriów równoważniki elektronowe do cytoplazmy ma istotne znaczenie również z tego względu, że układ: jabłczan-dehydrogenaza jabłczanowa przenosi również szczawiooctan z mitochondriów do cytoplazmy (45, 50, 51, 75, 92, 99, 101, 102) (schemat 2B), w której u wielu organizmów jest zlokalizowana karboksylaza fosfopirogronianowa.

Tablica 2

Wpływ kwasu oleinowego na stopień redukcji mitochondrialnego i cytoplazmatycznego NAD (wg 101)

Kwas oleinowy dodano po 30 min. perfuzji roztworem alaniny i po 60 min. perfuzji roztworem mleczanu lub pirogronianu

Obecność kwasu oleinowego	Substrat	Czas perfuzji (min.)	Stosunek		
			Mleczan Pirogronian	Jabłczan Szczawiooctan	β -hydroksymasłan Acetooctan
-	Alanina	60	7,1±1,5	33±2	0,38±0,05
+	Alanina	60	15,0±2,0	67±8	1,06±0,08
-	Mleczan	90	13,8±1,2	60,0±7	0,99±0,09
+	Mleczan	90	24,6±3,3	122,0±10	3,03±0,15
-	Pirogronian	90	5,3±0,4	59±4	0,37±0,05
+	Pirogronian	90	8,6±0,3	197±13	1,13±0,09

4. 1-fosfohydrolaza fruktozo-1,6-dwufosforanu

Regulacja syntezy glukozy na poziomie 1-fosfohydrolazy fruktozo-1,6-dwufosforanu może być wynikiem albo aktywowania tego enzymu albo hamowania aktywności fosfofruktokinazy. Wiadomo, że obydwie enzymy są allosteryczne (102). Fosfohydrolaza fruktozo-1,6-dwufosforanu jest hamowana przez AMP i FDP, podczas gdy fosfofruktokinazę hamują ATP i cytrynian (70, 73), natomiast aktywują FDP, F6P, AMP, ADP i fosforan (73).

W obecności kwasu oleinowego (106) zwiększa się poziom AMP, ADP i cytrynianu a zmniejsza stężenie ATP. Williamson i wsp. (102) sugerują, że w tych warunkach duża szybkość glukoneogenezy nie jest wynikiem aktywowania 1-fosfohydrolazy fruktozo-1,6-dwufosforanu, lecz

LITERATURA

1. Bach S. J., Holmes, *Biochem. J.* **31**, 89 (1937).
2. Bartley W., *Biochem. J.*, **56**, 387 (1954).
3. Bartley W., Avi-Dor Y., *Biochem. J.* **59**, 194 (1955).
4. Borst P., w *Funktionelle und Morphologische Organisation der Zelle*, red. P. Karlson, Springer-Verlag, Berlin 1963, str. 137.
5. Borth W. M., Lynen F., *Biochem. Z.* **339**, 77 (1963).
6. Boyd J. W., *Biochem. J.* **81**, 434 (1961).
7. Böttger I., Wieland O., Brdiczka D., Pette D., *Eur. J. Biochem.* **8**, 113 (1969).
8. Brech W., Shrago E., Wilken D., *Biochim. Biophys. Acta* **201**, 145 (1970).
9. Bremer J., *Biochim Biophys. Acta* **116**, 1 (1966).
10. Brendel K., Corredor C. F., Bressler R., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **34**, 334 (1969).
11. Burges R. A., Butt W. D., Baggaley A., *Biochem. J.* **109**, 38P (1963).
12. Corredor C., Brendel K., Bressler R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 2299 (1967).
13. Corredor C., Brendel K., Bressler R., *J. Biol. Chem.* **244**, 1212 (1969).
14. Davis E. J., Gibson D. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **29**, 815 (1967).
15. Delisle G., Fritz I. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 790 (1967).
16. Eisenstein A. B., Cpencer S., Flatnees S., Brodsky A., *Endocrinology* **79**, 182 (1966).
17. Exton J. H., Park C. R., *J. Biol. Chem.* **242**, 2622 (1967).
18. Exton J. H., Park C. R., *J. Biol. Chem.* **244**, 1424 (1969).
19. Forsander O. A., Raiha N., Salspuro M., Maenpaa P., *Biochem. J.* **94**, 259 (1965).
20. Freedman A. D., Kohn L., *Science* **145**, 58 (1964).
21. Friedman B., Goodman E. H. Jr., Weinhouse S., *J. Biol. Chem.* **242**, 3620 (1967).
22. Fritz I. B., Marquis N. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 1226 (1965).
23. Gamble J. L. Jr., Mazur J. A., *J. Biol. Chem.* **242**, 67 (1967).
24. Gancedo J. M., Gancedo C., Sols A., *Biochem. J.* **102**, 230 (1967).
25. Garber A. J., Ballard F. J., *J. Biol. Chem.* **244**, 4699 (1969).
26. Garland P. B., Randle P. J., *Biochem J.* **91**, 60 (1964).
27. Gevers W., *Biochem. J.* **103**, 141 (1967).
28. Gevers W., Krebs H. A., *Biochem. J.* **98**, 720 (1966).
29. Haynes R. C. Jr., *Advan. Enzyme Regulation* **3**, 111 (1965).
30. Haynes R. C. Jr., *J. Biol. Chem.* **240**, 4103 (1965).
31. Hems R., Ross B. D., Berry M. N., Krebs H. A., *Biochem. J.* **101**, 284 (1966).
32. Henning H. V., Seiffert I., Seubert W., *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 345 (1963).
33. Henning H. V., Seubert W., *Biochem. Z.* **340**, 160 (1964).
34. Herrera M. C., Cahill G. F. Jr., *Clin. Res.* **13**, 323 (1965).
35. Herrera M. C., Kamm D., Ruderman N., Cahill G. D. Jr., *Advan. Enzyme Regulation* **4**, 225 (1966).
36. Ishihara N., Kikuchi G., *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 733 (1968).

37. Jagow-Westermann V. B., Wieland O., *Eur. J. Biochem.* **3**, 512 (1968).
38. Keech D. B., Utter M. F., *J. Biol. Chem.* **238**, 2609 (1963).
39. Klingenberg M., Bücher T., *Ann. Rev. Biochem.* **29**, 669 (1960).
40. Krebs H. A., *Proc. Roy. Soc.* **159**, 545 (1964).
41. Krebs H. A., w *Metabolic Regulation and Enzyme Action Proc. 6th FEBS Meeting, Madryt 1969*, red. A. Sols, S. Grisolia, Academic Press Londyn-New York 1970, t. 19, str. 53.
42. Krebs H. A., Dierks C., Gascoyne T., *Biochem. J.* **93**, 112 (1964).
43. Krebs H. A., Eggleston L. V., *Biochem. J.* **34**, 1383 (1940).
44. Krebs H. A., Eggleston L. V., *Biochem. J.* **94**, 3C (1965).
45. Krebs H. A., Gascoyne T., Notton B. M., *Biochem. J.* **102**, 275 (1967).
46. Krebs H. A., Hems R., *Biochem. J.* **93**, 623 (1964).
47. Krebs H. A., Notton B. M., Hems R., *Biochem. J.* **101**, 607 (1966).
48. Krebs H. A., Speake R. N., Hems R., *Biochem. J.* **94**, 712 (1965).
49. Kruger F. A., Carhart J. M., Austad R. A., *J. Lab. Clin. Med.* **64**, 876 (1964).
50. Lardy H. A., *Harvey Lect. Ser.* **60**, 216 (1966).
51. Lardy H. A., Paetkau V., Walter P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 1410 (1965).
52. Lardy H. A., Veneziale C., Gabrielli F., w *Metabolic Regulation and Enzyme Action, Proc. 6th FEBS Meeting, Madryt 1969*, red. A. Sols, S. Grisolia, Academic Press, Londyn-New York 1970, t. 19, str. 55.
53. Llorente P., Marco R., Sols A., *Eur. J. Biochem.* **13**, 45 (1970).
54. Long C. N. W., Katzin B., Fry E. G., *Endocrinology* **26**, 309 (1940).
55. Löffler G., Matchinsky F., Wieland O., *Biochem. Z.* **342**, 76 (1965).
56. Mallette L. E., Exton J. H., Park C. R., *J. Biol. Chem.* **244**, 5713 (1969).
57. Marco R., Sols A., w *Metabolic Regulation and Enzyme Action, Proc. 6th FEBS Meeting, Madryt 1969*, red. A. Sols, S. Grisolia, Academic Press, Londyn-New York 1970, t. 19, str. 63.
58. Marco R., Sebastian J., Sols A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **34**, 725 (1969).
59. Mehlman M. A., *J. Biol. Chem.* **243**, 1919, 3289 (1968).
60. Mehlman M. A., Walter P., *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 590 (1968).
61. Mehlman M. A., Walter P., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **242**, 4594 (1967).
62. Mendicino J., Utter M. F., *J. Biol. Chem.* **237**, 1716 (1962).
63. Morino X., Kagamiyama H., Wada H., *J. Biol. Chem.* **239**, PC 943 (1964).
64. Nordlie R. C., Lardy H. A., *Biochem. Z.* **338**, 356 (1963).
65. Nordlie R. C., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **238**, 2259 (1963).
66. Purvis J. L., Lowenstein J. M., *J. Biol. Chem.* **236**, 2794 (1961).
67. Rongstad R., Katz J., *Biochem. J.* **116**, 483 (1970).
68. Ross B. D., Hems R., Freedland R. A., Krebs H. A., *Biochem. J.* **105**, 869 (1967).
69. Ross B. D., Hems R., Krebs H. A., *Biochem. J.* **102**, 942 (1967).
70. Salas M. L., Vinuella E., Salas M., Sols A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 371 (1965).
71. Scrutton M. C., Utter M. F., *J. Biol. Chem.* **240**, 1 (1965).
72. Scrutton M. C., Utter M. F., *J. Biol. Chem.* **242**, 1723 (1967).

37. Jagow-Westermann V. B., Wieland O., *Eur. J. Biochem.* **3**, 512 (1968).
38. Keech D. B., Utter M. F., *J. Biol. Chem.* **238**, 2609 (1963).
39. Klingenberg M., Bücher T., *Ann. Rev. Biochem.* **29**, 669 (1960).
40. Krebs H. A., *Proc. Roy. Soc.* **159**, 545 (1964).
41. Krebs H. A., w *Metabolic Regulation and Enzyme Action Proc. 6th FEBS Meeting, Madryt 1969*, red. A. Sols, S. Grisolia, Academic Press Londyn-New York 1970, t. 19, str. 53.
42. Krebs H. A., Dierks C., Gascoyne T., *Biochem. J.* **93**, 112 (1964).
43. Krebs H. A., Eggleston L. V., *Biochem. J.* **34**, 1383 (1940).
44. Krebs H. A., Eggleston L. V., *Biochem. J.* **94**, 3C (1965).
45. Krebs H. A., Gascoyne T., Notton B. M., *Biochem. J.* **102**, 275 (1967).
46. Krebs H. A., Hems R., *Biochem. J.* **93**, 623 (1964).
47. Krebs H. A., Notton B. M., Hems R., *Biochem. J.* **101**, 607 (1966).
48. Krebs H. A., Speake R. N., Hems R., *Biochem. J.* **94**, 712 (1965).
49. Kruger F. A., Carhart J. M., Austad R. A., *J. Lab. Clin. Med.* **64**, 876 (1964).
50. Lardy H. A., *Harvey Lect. Ser.* **60**, 216 (1966).
51. Lardy H. A., Paetkau V., Walter P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **53**, 1410 (1965).
52. Lardy H. A., Veneziale C., Gabrielli F., w *Metabolic Regulation and Enzyme Action, Proc. 6th FEBS Meeting, Madryt 1969*, red. A. Sols, S. Grisolia, Academic Press, Londyn-New York 1970, t. 19, str. 55.
53. Llorente P., Marco R., Sols A., *Eur. J. Biochem.* **13**, 45 (1970).
54. Long C. N. W., Katzin B., Fry E. G., *Endocrinology* **26**, 309 (1940).
55. Löffler G., Matchinsky F., Wieland O., *Biochem. Z.* **342**, 76 (1965).
56. Mallette L. E., Exton J. H., Park C. R., *J. Biol. Chem.* **244**, 5713 (1969).
57. Marco R., Sols A., w *Metabolic Regulation and Enzyme Action, Proc. 6th FEBS Meeting, Madryt 1969*, red. A. Sols, S. Grisolia, Academic Press, Londyn—New York 1970, t. 19, str. 63.
58. Marco R., Sebastian J., Sols A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **34**, 725 (1969).
59. Mehlman M. A., *J. Biol. Chem.* **243**, 1919, 3289 (1968).
60. Mehlman M. A., Walter P., *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 590 (1968).
61. Mehlman M. A., Walter P., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **242**, 4594 (1967).
62. Mendicino J., Utter M. F., *J. Biol. Chem.* **237**, 1716 (1962).
63. Morino X., Kagamiyama H., Wada H., *J. Biol. Chem.* **239**, PC 943 (1964).
64. Nordlie R. C., Lardy H. A., *Biochem. Z.* **338**, 356 (1963).
65. Nordlie R. C., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **238**, 2259 (1963).
66. Purvis J. L., Lowenstein J. M., *J. Biol. Chem.* **236**, 2794 (1961).
67. Rongstad R., Katz J., *Biochem. J.* **116**, 483 (1970).
68. Ross B. D., Hems R., Freedland R. A., Krebs H. A., *Biochem. J.* **105**, 869 (1967).
69. Ross B. D., Hems R., Krebs H. A., *Biochem. J.* **102**, 942 (1967).
70. Salas M. L., Vinuella E., Salas M., Sols A., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 371 (1965).
71. Scrutton M. C., Utter M. F., *J. Biol. Chem.* **240**, 1 (1965).
72. Scrutton M. C., Utter M. F., *J. Biol. Chem.* **242**, 1723 (1967).

73. Scrutton M. C., Utter M. F., *Ann. Rev. Biochem.* **37**, 249 (1968).
74. Senior A. E., Scheratt H. S. A., *Biochem. J.* **110**, 499 (1968).
75. Shrago E., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **241**, 663 (1966).
76. Shrago E., Lardy H. A., Nordlie R. C., Foster D. O., *J. Biol. Chem.* **238**, 3188 (1963).
77. Siegel A., England S., *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 101 (1962).
78. Somberg E. W., Mahlman M. A., *Biochem. J.* **112**, 435 (1969).
79. Söling H. D., Friedrichs D., Kleineke J., Wilms B., 4th FEBS Meeting, Oslo 1967, Abstracts, str. 69.
80. Söling H. D., Kattedrmann R., Schmidt H., Kuerr P., *Biochim. Biophys. Acta* **115**, 1 (1965).
81. Söling H. D., Willms B., Friedrichs D., Kleineke J., *Eur. J. Biochem.* **4**, 364 (1968).
82. Struck E., Ashmore J., Wieland O., *Biochem. Z.* **343**, 107 (1965).
83. Struck E., Ashmore J., Wieland O., *Advan. Enzyme Regulation* **4**, 219 (1966).
84. Świątek K. R., Kuen Lan Chao, H. Lin Chao, Cornblath M., Tildon T., *Biochim. Biophys. Acta* **206**, 316 (1970).
85. Tanaka T., Fumiaki S., Morimura H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **29**, 444 (1967).
86. Taylor C. B., Bailey E., *Biochem. J.* **102**, 32C (1967).
87. Teufel H., Menahan L. A., Shipp J. C., Böning S., Wieland O., *Eur. J. Biochem.* **2**, 182 (1967).
88. Tubbs P. K., Garland P. B., *Biochem. J.* **89**, 25P (1963).
89. Utter M. F., Keech D. B., *J. Biol. Chem.* **235**, PC17 (1960).
90. Utter M. F., Keech D. B., *J. Biol. Chem.* **238**, 2603 (1963).
91. Utter M. F., Keech D. B., Scrutton M. C., *Advan. Enzyme Regulation* **2**, 49 (1964).
92. Walter P., Paetkau V., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **241**, 2523 (1966).
93. Walter P., Stucki J. W., *Eur. J. Biochem.* **12**, 508 (1970).
94. Weber G., Singhal R. L., Stamm N. B., Fischer E. A., Mentendiek M. E., *Advan. Enzyme Regulation* **2**, 1 (1964).
95. Wieland O., Menahan L. A., Jagov-Westermann v. B., w Metabolic Regulation and Enzyme Action, Proc. 6th Meeting, Madryt 1969, red. A. Sols, S. Grisolia, Academic Press, Londyn — New York 1970, t. 19, str. 77.
96. Wieland O., Neufeldt I., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **324**, 101 (1961).
97. Wieland O., Weiss L., Eger-Neufeldt, *Advan. Enzyme Regulation* **2**, 85 (1964).
98. Williamson J. R., *Biochem. J.* **101**, 11C (1966).
99. Williamson J. R., *Advan. Enzyme Regulation* **5**, 229 (1967).
100. Williamson J. R., w Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria, red. E. Quagliariello, E. C. Slater, S. Papa, J. M. Tager, Adriatica Editrice, Bari 1969, str. 365.
101. Williamson J. R., Browning E. T., Olson M. S., *Advan. Enzyme Regulation* **6**, 67 (1968).
102. Williamson J. R., Browning E. T., Scholz R., *J. Biol. Chem.* **244**, 4607 (1969).
103. Williamson J. R., Browning E. T., Scholz R., Kreisberg R. A., Fritz I. B., *Diabetes* **17**, 194 (1968).
104. Williamson J. R., Kreisberg R. A., Felts P. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 247 (1966).

105. Williamson J. R., Peterson M., Rostand S., Scholz R., *Federation Proc.* **28**, 411 (1969).
106. Williamson J. R., Scholz R., Browning E. T., *J. Biol. Chem.* **244** 4617 (1969).
107. Williamson J. R., Scholz R., Browning E. T., Thurman R. G., Fukami M. H., *J. Biol. Chem.* **244**, 5044 (1969).

TERESA SZYMCZYK * I MARIA JACHIMOWICZ **

Metabolizm kwasów sialowych, ich prekursorów i pochodnych

Metabolism of Sialic Acids, Their Precursors and Derivatives

Present knowledge of the metabolism of sialic acids in animals and in bacteria is given.

Kwasy sialowe stanowią grupę związków cukrowych wywodzących się z substancji dotychczas niewyodrębnionej, zwanej kwasem neuraminowym. W tablicy 1 podano powszechnie przyjęte wzory oraz nomenklaturę pięciu kwasów sialowych: N-glikolilowych lub N-acetylowych pochodnych kwasu neuraminowego, z których trzy zawierają dodatkowe O-acetylowe grupy. Oprócz nich znany jest jeszcze kwas N-glikolilo-8-O-metyloneuraminowy (88a).

Nad ustaleniem struktury tych związków * pracowali głównie Blix i wsp. (6—12), Gottschalk (34—36) oraz Klenk i wsp. (44—47). Mimo intensywnie prowadzonych badań budowa tych substancji długo pozostała niewyjaśniona, a proponowane wzory ulegały stałym modyfikacjom. Ostateczną strukturę kwasu neuraminowego (tablica 1) ustalono po udowodnieniu, że liaza otrzymana z bakterii (41) w sposób odwracalny rozkłada dwa spośród znanych kwasów sialowych na pirogronian i N-acetylomannozaaminę (24) (schemat 1).

Przy wyodrębnianiu tej grupy związków z materiału biologicznego autorzy nadawali im różne nazwy jak: kwas gynaminowy dla związku z mleka ludzkiego (94), kwas laktaminowy — z mleka krowiego (15, 49),

* Dr med., Katedra Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Warszawa

** Lek. dent., Katedra Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Warszawa

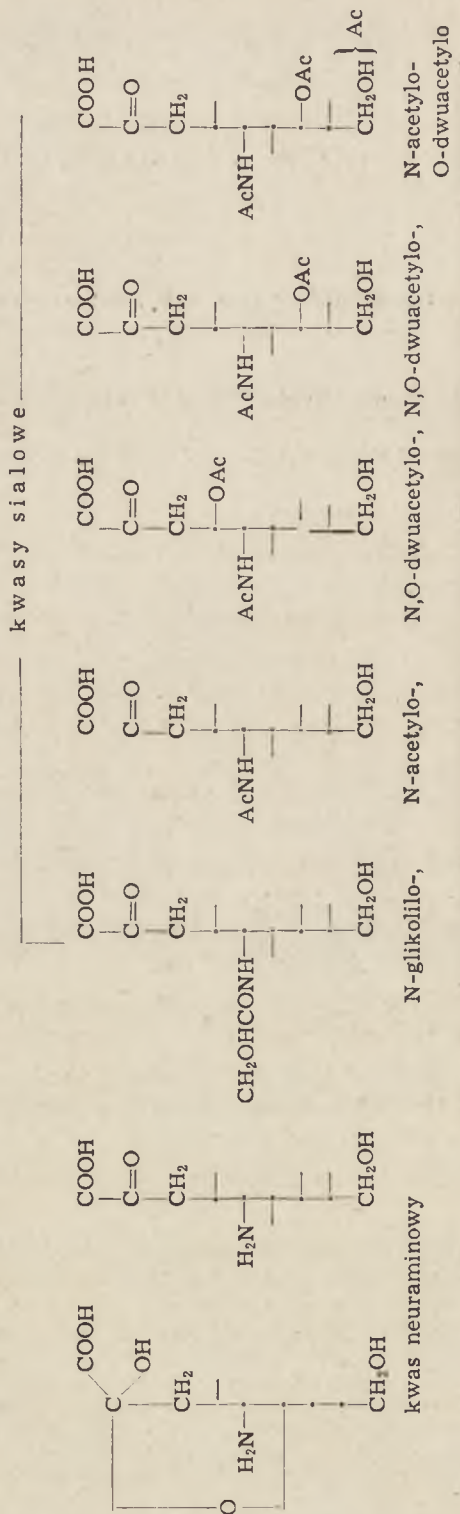
* Czytelnika, którego interesuje historia odkrycia oraz szczegółowe badania nad strukturą kwasów sialowych odsyłamy do artykułu D z u ł y ń s k i e j (28).

Wykaz stosowanych skrótów: BSM — glikoproteid gruczołów podzuchwowych wołu; ESM — glikoproteid gruczołów podzuchwowych konia; OSM — glikoproteid gruczołów podzuchwowych owcy; PSM — glikoproteid gruczołów podzuchwowych świni; NANA — kwas N-acetyloneuraminowy; NGNA — kwas N-glikoliloneuraminowy; Glk-NH₂ — glukozoamina; Gal-NH₂ — galaktozoamina; Fuk — fukoza; AcNHGlk — acetyloglukozoamina; AcNHGal — acetylogalaktozoamina; AcNHMan — acetylomannozaamina; PEP — fosfoenolpirogronian; RDE — agn. receptor destroying enzyme — neuraminidaza.

Tablica 1

Struktura kwasów sialowych

Nazwy glikoproteidów gruczołów podżuchwowych, z których wyizolowano poszczególne kwasy sialowe (8) podano poniżej



kwasy hemataminowy dla związku z krwinek konia (93). Nazwy te dziś mają tylko historyczne znaczenie.

Kwasy sialowe są związkami szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie. Występują w komórkach bakteryjnych**, gdzie wchodzi w skład

Tablica 2

Zawartość kwasów sialowych w materiale biologicznym

Tkanka	Kwas sialowy μmole/100 g*	Literatura
Ślinianka podjęzykowa szczura	1880	86
Tarczycza świnki morskiej	646	87
Substancja szara mózgu wołu	392	„
Ślinianka podżuchwowa szczura	193	„
Śledziona myszy	164	„
Wątroba wołu	149	„
Żółtko jaja kurzego	136	„
Nadnercze myszy	128	„
Substancja biała mózgu wołu	125	„
Białko jaja kurzego	98	„
Wątroba myszy	97	„
Płyn fizjologiczny		
Nasienie byka	600	87
Nasienie ludzkie	268	87
Płyn mózgowo-rdzeniowy człowieka	4,2	87
	mg%**	
Płyn mózgowo rdzeniowy człowieka	0,14—0,42	13
Mleko kobiece	33,8—140	13
Surowica krwi człowieka	40—60	22
	(u młodych)	
	60—70	22
	(u starszych)	
	40—65	14
	59	28
	78	92
Płyn wysiękowy opłucnowy	2,8—46	13
	(zależnie od przy- czyny)	
Łzy człowieka	35,2	17, 85
	36,9	63
Mocz człowieka	1,1—3,6%	60
	przy sialurii	
	9 przy porteinurii	21

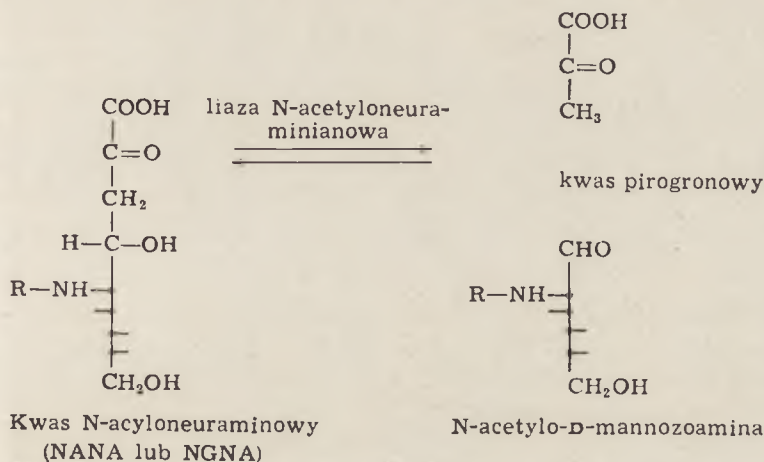
* oznaczenia wykonane metodą tiobarbiturową wg Warrena (87)

** oznaczenia wykonane różnymi metodami

** Szczegóły dotyczące występowania kwasów sialowych w komórkach bakteryjnych oraz ciekawe wyniki wielu prac znajdzie czytelnik w referacie Mikulskiego (58).

Typ związków	Źródło	Nazwa związku	Proponowana budowa chemiczna	Literatura
Oligosacharydy	Siara kozy	Trójsacharydy nukleotydowe (4 typy)	NANA*(2 → 4)Gal(1 → 4)AcNHGik(1 → 3)PPUry- dyna NANA*(2 → 4)Gal(1 → 6)AcNHGik(1 → 3)PPUry- dyna	26, 66
	Mleko człowieka	Trójsacharyd nukleotydowy	Urydyno-5'-/2 lub 4-O-2-fukopiranozylo-4-O-D- galaktopiranozylo-N-acetylo-glukozaaminylo-1-pi- rofosforan	80
Polisacharydy	E. coli K-235	Kwas kolominowy	Polimer NANA[2 → 8]	2, 4
	OSM	Część cukrowa składa się z około 800 jednostek dwusacharydowych	NANA(2 → 6)AcNHGal ↓ białko	39, 40
Glikoproteidy	BSM	j.w.	Jak w OSM, różnice polegają na występowaniu w cząsteczce różnych kwasów sialowych (NANA, NGNA, dwuacetylopochoodnych)	8, 10, 38,
	PSM	Jednostka sacharydowa: pentasacharyd	Schemat budowy pentasacharydu: białko ↓ AcNHGa 1 → Gal → AcNHGal ↓ Fuk NGNA	19
Glikolipidy	Fetuina	Jednostka sacharydowa fetuiny: zawiera cztery boczne łańcuchy trójsacharydowe [N-acetylo- neuraminylo(2 → 3)-D-galaktopiranozy- lo/1 → 4/N-acetylo-D-glukozaami- na] wiążące się z łańcuchem głów- nym [trzy mannozy i dwie N-ac- etyloheksozoaminy]	Schemat budowy: NANA NANA NANA NANA ↓ ↓ ↓ ↓ Gal Gal Gal Gal ↓ ↓ ↓ ↓ AcNHGik AcNHGik AcNHGik AcNHGik ↓ ↓ ↓ ↓ Man → Man → Man → AcNHGik → AcNHGik (Gal)? białko	80, 81
	Tkanka nerwowa Śledziona Eryocyty	Gangliozydy	NANA(2 → 3)AcNHGal(1 → 3)lactoza(1 → 1) sfiingozylna(2 → 1)kwas tłuszczowy	29, 42

* lub NGNA



Schemat 1. Enzymatyczny rozkład i synteza kwasów sialowych

ważnych antygenów komórkowych (2, 3), ponadto są istotnym składnikiem różnych płynów ustrojowych (93), hormonów (33), śluzów i komórek zwierzęcych (51, 64, 71, 83, 84). Tablica 2 przedstawia zawartość kwasów sialowych w różnym materiale biologicznym.

Kwasy sialowe występują jako składniki oligo- i polisacharydów oraz heteropolimerów — glikoproteidów i glikolipidów. Reprezentatywne przykłady tych związków zestawiono w tablicy 3.

I. Metabolizm pochodnych D-mannozoaminy

Choć 2-amino-2-dezoksy-D-mannozę otrzymał syntetycznie już w 1919 roku *Levene* (54), to dopiero wyodrębnienie jej z kwasu neuraminowego przez *Combari* i *Rosemana* w 1958 roku (23) zainicjowało badania nad metabolizmem i rolą tej heksozoaminy w biosyntezie pochodnych kwasu neuraminowego. Wszystkie dostępne dane wskazują, że pośredni metabolizm D-mannozoaminy jest ściśle związany z metabolizmem pochodnych D-glukozoaminy.

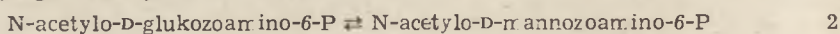
W 1957 roku *Cardini* i *Leloir* donieśli (18), że ekstrakty z wątroby szczura katalizują reakcję przekształcenia UDP-N-acetyloglukozoaminy w N-acetylogalaktozoaminę. W rok później *Combari* i *Roseman* (23), powtarzając te doświadczenia w identycznych warunkach dowiedli, iż powstająca acyloheksozoamina jest N-acetylomannozoaminą, przy czym reakcja przebiega następująco:



Enzym katalizujący reakcję 1 jest szeroko rozpowszechniony w tkankach kręgowców. Oczyszczony około 130 razy, nie wymaga on kofaktorów, a reakcja przebiega stechiometrycznie i nieodwracalnie. Jej wynikiem jest epimeryzacja grupy acyloaminowej mannozoaminy przy C₂ i rozerwanie

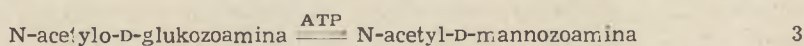
wiązania przy końcowej reszcie fosforanowej UDP. Z badań kinetycznych nad oczyszczonym enzymem wynika, że reakcja zachodzi więcej niż jednostopniowo, przy czym produktem pośrednim byłaby UDP-N-acetylo-mannozaamina. W omawianym układzie enzymatycznym nie udało się zastąpić UDP-N-acetyloglukozoaminy N-acetyloglukozoaminą czy N-acetylogalaktozoaminą ani ich ufosforylowanymi na pierwszym węglu pochodnymi.

W wyciągach z *Escherichia coli*, bakterii znanych z produkcji kwasu kolominowego (wielkocząsteczkowego polimeru kwasu N-acetyloneuraminowego (2, 4), nie udało się wykazać układu enzymatycznego katalizującego reakcję 1. Poszukiwania dróg biosyntezy pochodnych mannozoaminy u kilku rodzajów bakterii uwięczone zostały wyosobnieniem enzymu katalizującego reakcję 2.

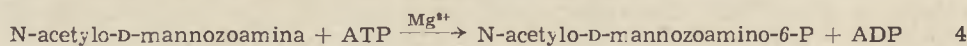


Enzym ten występuje u wielu rodzajów bakterii. Oczyszczone preparaty epimerazy z *Aerobacter aerogenes* (66, 69) nie wymagają kofaktora i wykazują wysoką specyficzną w stosunku do substratu. Powodują one empimeryzację grupy acyloaminowej przy C₂ glukozoaminy. Mechanizm tej reakcji nie jest wyjaśniony, nie wiadomo więc czy forma przejściowa jest związkiem typu enoloaminy.

Enzymu tego nie udało się wykazać w wyciągach z tkanek zwierzęcych. Występująca natomiast u ssaków epimeraza (32), katalizująca reakcję 3 różni się od bakteryjnej nie tylko substratem (działa na N-glikolilo- lub N-acetyloheksozoaminy), ale przede wszystkim wymaga dużych ilości ATP. Rola nukleotydu w tej reakcji nie jest znana. W czasie reakcji nie stwierdzono ubytku ATP ani powstawania ADP czy AMP. Usunięcie ATP po okresie preinkubacji z enzymem powoduje utratę aktywności. Enzym jest wysoce specyficzny w stosunku do ATP. Ze wszystkich badanych nukleotydów, jedynie dezoksy-ATP może częściowo zastąpić ATP.

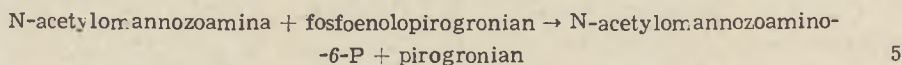


W roku 1961 Warren i Felsenfeld (90) opisali następnego enzym biorący udział w metabolizmie pochodnych mannozoaminy, zwany kinazą N-acetylomannozoaminy i katalizujący reakcję 4:



Kinazę tę znaleziono zarówno w tkankach ssaków jak i u bakterii Ghosh i Roseman (31) oddzielili ją od innych kinaz obecnych w wątrobie szczura. Działa ona zarówno na N-acetylo- jak na N-glikolilomannozaaminę.

W 1964 roku Roseman (68) doniósł o wyizolowaniu z *E. coli* K-235 nowego enzymu — kinazy katalizującej reakcję 5.



II. Enzymatyczny rozkład kwasów sialowych

Wyniki pierwszych enzymatycznych badań nad kwasami sialowymi ogłosili w 1956 roku Heimer i Meyer (41). Wykazali oni, że wyciąg z *Vibrio cholerae* rozkłada kwas N-acetyloneuraminowy (NANA) na pirogronian i N-acetyloheksozoaminę. Po działaniu oczyszczoną 115 razy liazą N-acetyloneuraminianową z *Clostridium perfringens*, Comb i Roseman (23) otrzymali N-acetyloheksozoaminę i zidentyfikowali ją jako N-acetylo-D-mannozaaminę. Wysoko oczyszczony enzym katalizuje reakcję przedstawioną na schemacie 1. Rozkłada on zarówno NANA jak i kwas N-glikoliloneuraminowy (NGNA), przy czym szybkość rozpadu NGNA stanowi 65% szybkości rozpadu NANA. Optimum pH dla tej reakcji wynosi 7,2, stała Michaelisa — $3,9 \times 10^{-3}M$, zaś stała równowagi:

$$K = \frac{(\text{pirogronian}) \times (\text{N-acetylomannozaamina})}{(\text{kwas sialowy})} = \frac{1}{10} M.$$

Przy niskich stężeniach pirogronianu i N-acetylomannozaaminy przebiega reakcja rozkładu, a przy wysokich — syntezy kwasu sialowego. Reakcję tę wykorzystano *in vitro* do enzymatycznej syntezy znakowanych kwasów sialowych, przy czym można uzyskać wydajność reakcji około 65% (66). Enzym ten występuje nie tylko u bakterii, ale jest rozpowszechniony w tkankach ssaków (18). Rozmieszczenie liazы N-acetyloneuraminowej w tkankach zwierzęcych przedstawiono w tablicy 4.

Oczyszczony enzym z nerki wieprza (66) wykazuje wszystkie cechy typowe dla enzymu z bakterii, między innymi wysoką specyficzność względem kwasu N-acetyloneuraminowego i N-glikoliloneuraminowego oraz pirogronianu i N-acetylomannozaaminy. Kwasu N-acetyloneuraminowego nie można zastąpić kwasem N-O-diacetyloneuraminowym. Fosfoenolopirogronian nie zastępuje pirogronianu, a glukozoamina, mannozoamina, galaktozoamina ani ich estry fosforanowe czy acetylowe nie zastępują N-acetylomannozaaminy. Enzymu tego nie udało się wykazać w tkankach produkujących mucynę, heteropolimer zawierający duże ilości kwasu sialowego (24). Z tego powodu przyjęto, iż enzym ten bierze udział raczej w rozkładzie niż w biosyntezie kwasów sialowych. Z tego też względu nazwa systematyczna (30) brzmi: pirogroniano-liaza-N-acetyloneuraminianu (EC 4.1.3.3.).

III. Enzymatyczna synteza kwasów sialowych

W roku 1961 Warren i Felsenfeld (89) stwierdzili, że dwie frakcje białkowe, otrzymane z oczyszczonego od liazы N-acetyloneuraminianowej wyciągu z wątroby szczura, po inkubacji z N-acetylomannozaaminą i fosfoenolopirogronianem wytwarzają duże ilości kwasu sialowego, który

Tablica 4

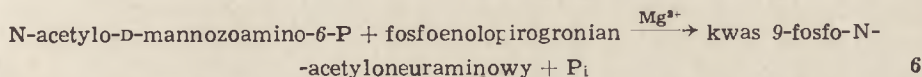
Rozmieszczenie liazy N-acetyloneuraminianowej w tkankach zwierzęcych wg Rosemana (67)

Gatunek	Aktywność nieoczyszczonego wyciągu									
	Nerka	Wątroba	Śledziona	Mózg	Mięśnie	Płuca	Jądra	Węzły chłonne	Szpik kostny	Krwinki czerwone
Szczur	40	14	23	5,1	3,2	9,0	19	47	10	3
Wieprz	43	2,3	28	śląd		24				
Świnka morska	170	7,7	50	21	3,2	4,2	81			
Krowa	140	3,2	2,4	0	0	śląd				
Królik	53	2,5	8,3	0	0	śląd				
Żaba		44			0	33				

Aktywność liazy wyrażono w m/molach rozłożonego NANA na mg białka w czasie 15 minut i w temperaturze 37°C.

po wykrystalizowaniu zidentyfikowano jako kwas N-acetylo-neuraminowy. Reakcja syntezy zachodzi tylko w obecności jonów magnezu i ATP. NAD i NADP przyspieszają reakcję, lecz nie są konieczne do jej przebiegu.

Po nieudanych próbach wykazania w gruczole podżuchwowym syntezy kwasu sialowego przy współdziałaniu liazy N-acetyloneuraminianowej Roseman i wsp. (55, 70) wykryli w tym narządzie inny enzym katalizujący reakcję, której produktem jest ester 9-fosforanowy kwasu sialowego (reakcja 6).



Obecność syntetazy kwasu 9-fosfoacetyloneuraminowego w gruczołach podżuchwowych potwierdzili Warren i Felsenfeld (90).

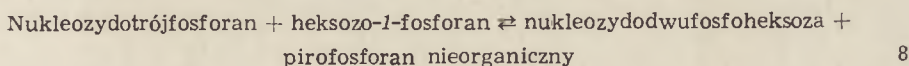
Wyodrębnienie wolnego kwasu N-acetyloneuraminowego wskazuje na istnienie fosfatazy katalizującej reakcję:



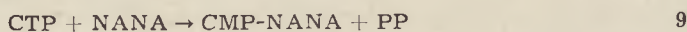
Nie udało się jednak do tej pory oddzielić aktywności fosfatazowej od syntetazy.

IV. Enzymatyczna synteza kwasów cytydino-5'-monofosfo-sialowych

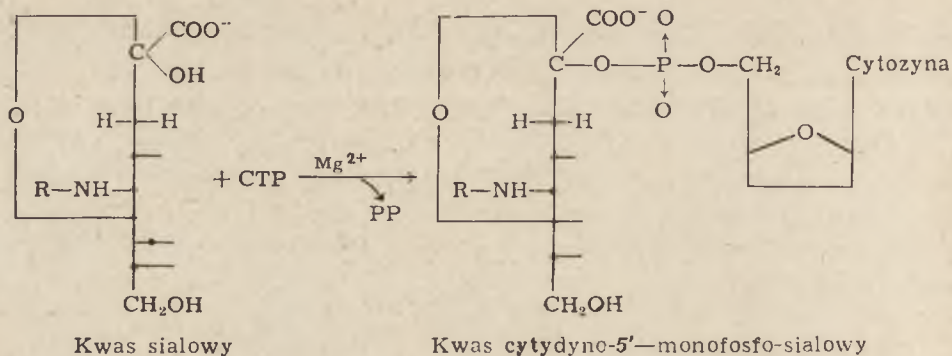
Od czasu odkrycia przez Leloirę (53) w ekstraktach z drożdży urydynodwufosfoglukozy ciągle zwiększa się liczba różnorodnych pochodnych nukleotydowych cukrów, wyodrębnionych z naturalnych źródeł (43). Syntezę nukleotydocukrów katalizują enzymy należące do grupy transferaz. Enzymy te przenoszą grupę nukleotydową z nukleozydotrójfosforanu na fosforan cukru wg ogólnej reakcji opisanej po raz pierwszy przez Munch-Petersena i wsp. (61) (reakcja 8).



Dotychczas jedynie reakcja biosyntezy nukleotydu kwasu sialowego odbiega od powszechnego schematu Petersena, gdyż zamiast dwufosfo-nukleozydowej pochodnej powstaje monofosfonukleozydowa pochodna kwasu sialowego (reakcja 9).



Grupa nukleotydowa z nukleozydotrójfosforanu jest przenoszona na kwas sialowy, a nie jego fosforanową pochodną. Reakcja ta przebiega jednoetapowo i polega na przeniesieniu reszty CMP na półacetalową, hydroksylową grupę przy C₂ kwasu sialowego.



Schemat 2. Enzymatyczna synteza kwasów CMP-sialowych

R=CH₂OHCO — kwas N-glikoliloneuraminowy, R=CH₂CO — kwas acetyloneuraminowy

Syntezę aktywnych kwasów sialowych CMP-NANA i CMP-NGNA przedstawia schemat 2. W roku 1962 Roseman (67) wyizolował enzym katalizujący tę reakcję ze ślinianki podżuchwowej świni. Oczyszczona 30 razy transferaza działa zarówno na kwas N-acetyloneuraminowy jak i na kwas N-glikoliloneuraminowy. Enzym wykazuje wysoką specyficzność względem CTP. Wydajność reakcji z innymi nukleotydami, ATP, GTP, UTP, ITP, ADP, GDP, UDP, wynosi zaledwie 1% wydajności reakcji z CTP. Enzym traci aktywność przy braku jonów Mg²⁺. Autorom nie udało się otrzymać frakcji specyficznej tylko w stosunku do kwasu N-acetyloneuraminowego lub N-glikoliloneuraminowego. Zagadnienie czy syntezę CMP-NANA i CMP-NGNA katalizuje jeden czy dwa enzymy pozostaje dalej otwarte.

Strukturę kwasu CMP-sialowego (schemat 2) ustalono na podstawie następujących danych. Ilości moli cytozyny, fosforu całkowitego i NANA (lub NGNA) w związku występują w stosunku 1,00:1,01:0,96. Związek jest niewrażliwy na działanie liazy N-acetyloneuraminianowej, 5'-nukleotydyazy, hydroksylaminy przy różnych wartościach pH i borowodorku sodu. Badania skręcalności optycznej wykazały, że α_D²⁰ dla CMP-NANA zsyntetyzowanego przez enzym wynosi — 9,9°, a dla CMP-NANA wyodrębnionego z bakterii — 9,8°. Po doprowadzeniu pH roztworów do 1,5, wartość skręcalności zmienia się w obu przypadkach na — 1,0°. Aktywne kwasy sialowe (CMP-NANA) ulegają całkowitej hydrolizie w pH 1,0 i w temperaturze pokojowej już w czasie 10 minut. Wśród powstałych produktów jeden jest wrażliwy na utlenianie nadjodanem oraz rozkładany przez 5'-nukleotydzę. Przy użyciu chromatografii i elektroforezy stwierdzono, że jest to 5'-CMP. Pozostałe dwa związki rozdzielono za pomocą chromatografii bibułowej (88) i stwierdzono, że ulegają one rozkładowi przez liazę N-acetyloneuraminianową na pirogronian i N-acetylo-D-mannozyamine.

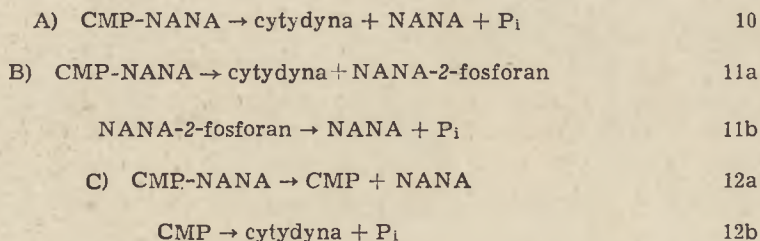
Wyżej omówione właściwości oraz konfiguracja kwasów CMP-sialowych, otrzymanych w wyniku syntezy enzymatycznej przez *Rosemana* (67), są identyczne z własnościami kwasów CMP-sialowych z *E. coli* (25).

Obecność enzymu syntetyzującego aktywny kwas sialowy (CMP-NANA) wykazano w gruczole podżuchwowym owcy, w gruczole piersiowym szczura, w wątrobie, gruczole podżuchwowym i błonie śluzowej jelita wieprza oraz w wyciągach z *E. coli* K-235 (wg 66).

V. Enzym rozkładający CMP-NANA

W 1967 roku *Shoyab* i *Bachhawat* (78, 79) przedstawili dowody występowania enzymu rozkładającego CMP-NANA. Około 170 razy oczyszczony enzym z wątroby owcy wykazuje optimum działania w $pH \sim 9$. Obecność metali nie jest konieczna, ale jony Mn^{2+} i Mg^{2+} zwiększają aktywność enzymu. Enzym jest całkowicie hamowany przez EDTA, a dodanie Mn^{2+} przywraca jego aktywność. W nieobecności jonów Mn^{2+} związki tiolowe (cysteina, glutation) hamują reakcję. W obecności Mn^{2+} hamowanie jest mniejsze. Enzym w temperaturze 18° i 0° jest trwały przez miesiąc. Reakcję hamują nukleotydy mono-, dwu- i trójfosforanowe. Całkowite zahamowanie osiągnięto przy stężeniu $0,5mM$ ATP. Wartość K_m wynosi $1 \times 10^{-4}M$. Stechiometria reakcji wykazuje powstawanie 1 mola NANA, 1 mola cytydyny i 1 mola P_i przy ubytku 1 mola CMP-NANA.

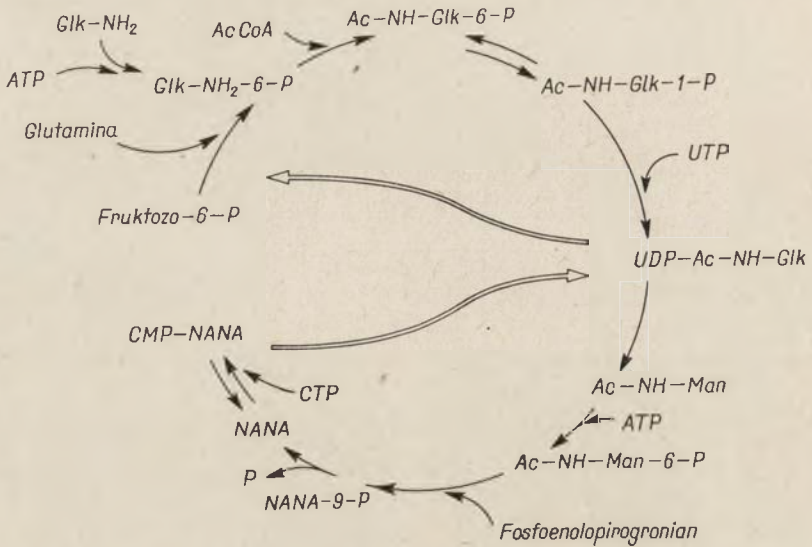
Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy przedstawiają trzy mechanizmy, według których może przebiegać enzymatyczny rozkład CMP-NANA:



Obecność enzymu rozkładającego CMP-NANA wykazano (79) w wielu tkankach szczura (nerka, wątroba, śledziona, chrząstka, jelito, płuca, serce, mózg, mięśnie szkieletowe). Badania nad lokalizacją podkomórkową wykazały największą aktywność enzymu w jądrach i mitochondriach. Fizjologiczna rola tego enzymu nie jest obecnie znana. Prawdopodobnie pełni on rolę regulatora syntezy kwasów sialowych i związków zawierających NANA.

VI. Regulacja poziomu kwasów sialowych w komórce

Poziom aktywnego kwasu sialowego w komórce regulowany jest na zasadzie sprzężenia zwrotnego (48): CMP-NANA hamuje powstawanie swego prekursora tzn. N-acetylomannozaamino-6-P z UDP-N-acetyloglukozoaminy, a UDP-N-acetyloglukozoamina hamuje powstawanie glukozoamino-6-P z G-6-P (schemat 3).

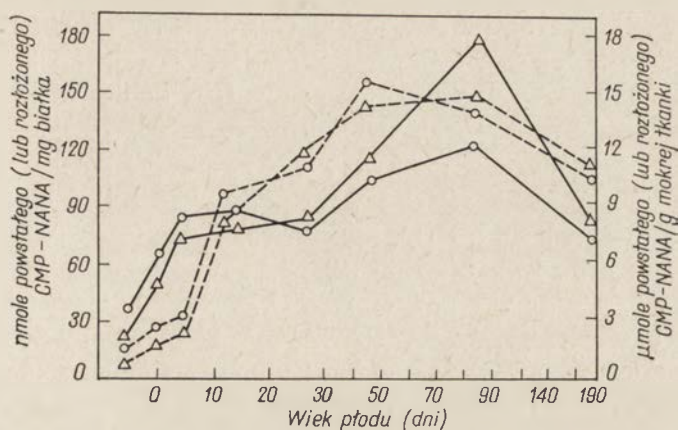


Schemat 3. Regulacja poprzez sprzężenie zwrotne poziomu kwasów sialowych i ich prekursorów w komórce wg Kornfelda i wsp. (48)

→ hamowanie poprzez sprzężenie zwrotne

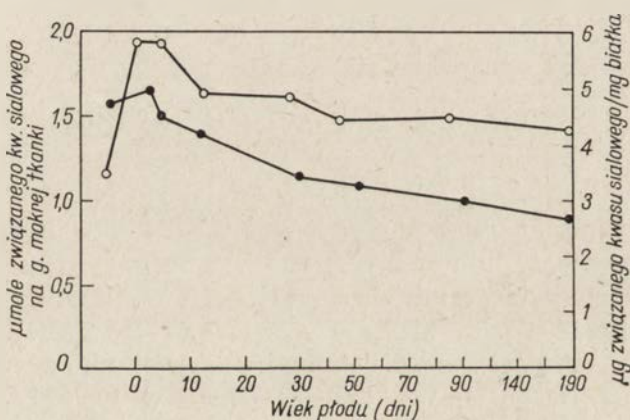
Ponadto poziom kwasu sialowego jest uzależniony od aktywności omówionych w poprzednim rozdziale dwóch enzymów warunkujących syntezę i degradację CMP-NANA (77). Wpływ wieku na aktywność obu tych enzymów oraz na stężenie związanego kwasu sialowego w wątrobie płodu oraz rosnących i dorosłych szczurów badali Shoyab i Bachhawaat (79). Oba enzymy występują w wątrobie płodu szczura, lecz wykazują bardzo niską aktywność. Aktywność enzymu syntetyzującego CMP-NANA osiąga szczyt w 85 dniu życia, po czym spada (rysunek 1). Enzym degradujący CMP-NANA osiąga maksimum aktywności w 45 dniu życia. Aktywność maksymalna utrzymuje się do 85 dnia życia, po czym maleje. Stężenie kwasu sialowego związanego z białkiem wzrasta gwałtownie po urodzeniu osiągając maksimum między 1-szym i 5-tym dniem, po czym spada stopniowo podczas rozwoju (rysunek 2).

Zwiększanie się przez długi czas po urodzeniu aktywności obu enzymów warunkujących poziom CMP-NANA wskazywałoby na ich udział przede wszystkim w procesie dojrzewania wątroby szczura (79).



Rys. 1. Wpływ wieku na aktywność enzymów warunkujących syntezę i degradację CMP-NANA w wątrobie płodu oraz rosnących i dorosłych szczurów wg Shoyab i Bachhawat (79)

Aktywność specyficzna: syntetazy CMP-NANA ○—○ μmole/mg białka, ▲—▲ μmole/g tkanki mokrej enzymu rozkładającego CMP-NANA, ○---○ μmole/mg białka, ▲---▲ μmole/g tkanki mokrej



Rys. 2. Wpływ wieku na stężenie związanego kwasu sialowego w wątrobie płodu oraz rosnących i dorosłych szczurów (79)

Stężenie związanego kwasu sialowego ○—○ μmole/g mokrej tkanki, ●—● μg/mg białka

VII. Biosynteza N-acetylowych, O-acetylowych i N-glikolilowych pochodnych kwasu neuraminowego

Do roku 1969 nie znane było pochodzenie grup O-acetylowych i N-glikolilowych w kwasach sialowych. Dopiero Schauer i wsp. (74, 76), inkubując skrawki podżuchwowej ślinianki bydłowej z ^{14}C -octanem, wykazali wbudowywanie ^{14}C do N- i O-acetylowych grup kwasu neuraminowego.

Ci sami badacze (76), inkubując skrawki gruczołu z jednolicie znakowaną ^{14}C L-seryną lub 3-hydroksypirogronianem znakowanym na C_2 wykluczili ich udział jako prekursorów grupy N-glikolilowej kwasu N-glikoliloneuraminowego. Wykazali natomiast, że octan, N-acetylomannozaamina i N-acetyloneuraminowy kwas, znakowane ^{14}C na pierwszym atomie węgla, były metabolizowane do N-glikoliloneuraminowego kwasu.

W 1970 roku Schauer (73) wykazał hydroksylację kwasu N-acetyloneuraminowego do kwasu N-glikoliloneuraminowego przez oksygenazę hydroksylującą, obecną w supernatancie 120 000 g z homogenatu ślinianki podżuchwowej wieprza. Substrat (NANA) może być dodany do mieszaniny inkubacyjnej lub zsyntetyzowany *in situ* przez kondensację N-acetylmannozaaminy i fosfoenolopirogronianu. Tlen oraz askorbinian (lub zredukowany NADP) są niezbędne do przeprowadzenia reakcji (reakcja 13).

Kwas N-acetyloneuraminowy + O_2 + askorbinian (lub zredukowany NADP) \rightarrow

\rightarrow kwas N-glikoliloneuraminowy + zredukowany askorbinian (lub NADP) + H_2O 13

Zgodnie z zasadami Międzynarodowej Komisji do spraw Nomenklatury i Klasyfikacji Enzymów, enzym należy do klasy oksydoreduktaz, grupy hydroksylaz EC 1.14.1 lub 1.14.2 (30).

VIII. Rola CMP-NANA w procesach transglikozylacji

Powstały w komórkach aktywny kwas sialowy, CMP-NANA, jest prekursorem w syntezie oligosacharydów, polisacharydów oraz heteropolimerów jak glikolipidy i glikoproteidy.

Pierwsze doniesienie o udziale CMP-NANA w biosyntezie polisacharydu pochodzi z 1963 roku, kiedy to Aminoff i wsp. (1) w częściowo oczyszczonych wyciągach z *E. coli* K235 znaleźli układ enzymatyczny (zawarty w osadzie po wirowaniu homogenatu w 100 000 g) włączający znakowany NANA z CMP-NANA w polimer zwany kwasem kolominowym (reakcja 14).

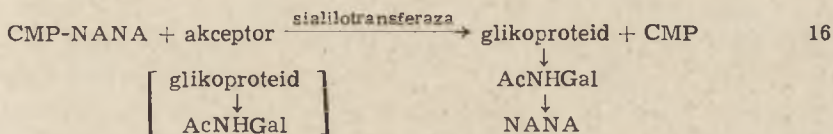
$\text{CMP-NANA} + \text{primer (kwas kolominowy)} \xrightarrow{\text{sialilotransferaza}} \text{kwas kolominowy-NANA} + \text{CMP}$ 14

W 1964 roku Carlson i wsp. (20) donieśli o wyodrębnieniu transferazy sialilowej z gruczołu mlecznego szczura. Enzym ten katalizuje przeniesienie reszty kwasu N-acetyloneuraminowego z CMP-NANA na laktozę z utworzeniem sialilo(2-3)laktozy (reakcja 15).

$\text{CMP-NANA} + \text{laktoza} \xrightarrow{\text{sialilotransferaza}} \text{sialilo(2-3)laktoza} + \text{CMP}$ 15

Ci sami badacze w gruczołach podżuchwowych owcy wykazali obecność enzymu przenoszącego NANA na wyodrębniony glikoproteid (reakcja

16), w którym po potraktowaniu neuraminidazą odsłonięto reszty N-acetylgalaktozoaminowe



Enzym podobnego typu uzyskano z siary kozy (5). Bierze on udział w przenoszeniu kwasu sialowego z jego pochodnej cytydynomonofosforanowej na glikoproteidy zawierające galaktozę jako końcową resztę. Rolę transferazy sialilowej potwierdzili również O'Brien i wsp. (62), którzy w 1966 roku opisali enzymy zdolne do przenoszenia reszty NANA z CMP-NANA na endogenne białkowe akceptory we frakcji mikrosomalnej wątroby szczura.

W roku 1967 Spiro i Spiro (82) uzyskali z gruczołu tarczycowego częściowo oczyszczone preparaty transferazy sialilowej i galaktylozowej i oznaczyli ich aktywność względem różnych substratów.

Najlepszym akceptorem dla reszty NANA, przenoszanej przez sialilotransferazę z CMP-NANA, są uzyskane z tyreoglobuliny i fetuiny glikopeptydy i glikoproteidy z galaktozą w pozycji końcowej. Glikopeptydy i glikoproteidy nie zawierające reszty galaktozy nie wiążą reszty sialilowej. Enzym jest również nieaktywny w stosunku do wolnej galaktozy.

IX. Neuraminidazy (sialidazy)

We wszystkich dotychczas poznanych związkach kwas sialowy zajmuje pozycję końcową łącząc się wiązaniem α -ketozydowym z galaktozą, N-acetylgalaktozoaminą lub cząsteczką drugiego kwasu sialowego. Wyodrębniono trzy typy wiązania α -ketozydowego z udziałem NANA.

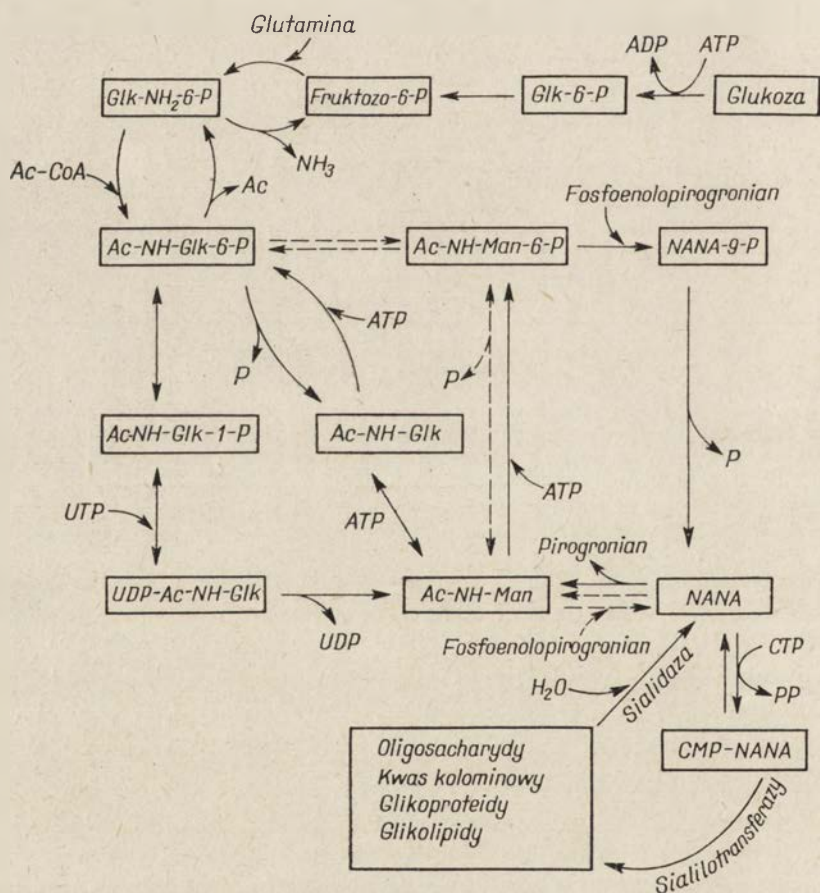
- 1) Pierwszy typ wiązania to połączenie kwasu sialowego poprzez C_2 z grupą hydroksylową galaktozy. W wiązaniu tym może brać udział grupa -OH przy C_3 galaktozy. Takie wiązanie spotykamy we wszystkich gangliozydach (43), licznych glikoproteidach (65) i w niektórych sialilolaktozach (50). O α -ketozydowych wiązaniach utworzonych przez grupę hydroksylową C_6 galaktozy występujących w sialilolaktozach donosili Schneirt i Rafelson (75).
- 2) Drugi typ wiązania α -ketozydowego kwasu sialowego to połączenie z N-acetylgalaktozoaminą poprzez grupę hydroksylową przy C_3 lub C_6 tego aminocukru. Wiązanie to występuje w mucynie gruczołu podżuchwowego (37) i niektórych glikoproteidach (65).
- 3) Trzeci typ spotykamy w niektórych bogatych w kwas sialowy gangliozydach oraz w kwasie kolominowym (polimerze NANA) występującym

w *E. coli* (57); to wiązanie α -ketozydowe utworzone jest między dwiema cząsteczkami NANA w pozycji (2—8).

α -Ketozydowe wiązanie kwasu siałowego (wszystkich znanych typów) wrażliwe jest na kwas. Całkowity rozkład hydrolytyczny tego wiązania uzyskuje się w 0,1N H_2SO_4 w temperaturze 80° w czasie 60 minut (87). Wiązanie to rozkładane jest przez specyficzny enzym N-acetylonuraminyloglikohydrolazę (EC3.2.1.18) zwaną potocznie neuraminidazą lub sialidazą (38).

Enzym ten został wykryty przez Burneta i Stone (16) w 1946 roku w przesączach z hodowli *Vibrio cholerae* — jako enzym niszczący receptor otoczki erytrocytów (ang. *receptor destroying enzyme*, RDE).

Dalsze badania wykazały szerokie rozpowszechnienie tego enzymu. Występuje on zarówno w wirusach grypy (56), w bakterjach: przecinkowcach cholery azjatyckiej, laseczkach zgorzeli gazowej, dwoinkach



Schemat 4. Pośredni metabolizm kwasów siałowych i ich prekursorów od glukozy do aktywnych kwasów siałowych (Roseman (66) — modyfikacja)

Liniami przerywanymi (---) zaznaczono reakcje przebiegające tylko u bakterii

zapalenia płuc, przecinkowcu α -hemolizującym (52) jak i w tkankach i płynach ustrojowych (91) zwierząt, w erytrocytach i trombocytach krwi ludzkiej, w osoczu bydłowym, w mózgu człowieka i świni. Sandnoff i Jatzkewitz (72) znaleźli ten enzym we frakcji lizosomalnej-mitochondrialnej.

Krystaliczny, elektroforetycznie jednorodny preparat neuraminidazy z *Vibrio cholerae* (59) ma ciężar cząsteczkowy 8000. Enzym traci aktywność pod wpływem wersenianu. Dodatek jonów Cu^{2+} lub Mn^{2+} przywraca aktywność. Stała Michaelisa wynosi $2 \times 10^{-4} \text{M}$. Odczepienie kwasu neuraminowego od erytrocytów przebiega najszybciej w pH 6,4—6,5. Enzym z *Vibrio cholerae* (27) rozkłada zarówno wiązania α -ketozydowe (2-3) jak i (2-6), podczas gdy neuraminidaza wirusowa (27) rozkłada tylko wiązanie (2-3). Wytwarzanie neuraminidazy w hodowlach z *Vibrio cholerae* zwiększa się 100-krotnie w obecności sialilolaktozy. Również sam kwas sialowy działa pobudzająco. Hamująco działa natomiast N-acetylomannozaamina.

Celem niniejszego artykułu było omówienie głównych kierunków prowadzonych badań oraz podkreślenie dotychczasowych osiągnięć, których podsumowaniem jest schemat 4, przedstawiający metabolizm pochodnych kwasu neuraminowego od glukozy do aktywnych kwasów sialowych. Uwzględnia on odmienną drogę biosyntezy kwasu sialowego u bakterii i zwierząt. Choć przedstawione dane pozwoliły na zarysowanie ogólnego szlaku przemian, to nadal wiele intrygujących zagadnień pozostaje do rozwiązania. Szczególnie interesująca i ważna rola biologiczna kwasu sialowego będzie przedmiotem następnego artykułu.

LITERATURA

1. Aminoff D., Dodyh F., Roseman S., *J. Biol. Chem.* **238**, 1177 (1963).
2. Barry G. T., *J. Exptl. Med.* **107**, 507 (1958).
3. Barry G. T., Abbott V., Tsai T. H., *J. Gen. Microbiol.* **29**, 335 (1962).
4. Barry G. T., *Nature* **179**, 206 (1957).
5. Bartholomew B. A., Jourdian G. W., Roseman S., Abstr. VI.6-th Intern. Congress of Biochemistry 1964, str. 503.
6. Blix G., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **240**, 43 (1936).
7. Blix F., Gottschalk A., Klenk E., *Nature* **179**, 1088 (1957).
8. Blix G., Lindberg E., *Acta Chem. Scand.* **14**, 1809 (1960).
9. Blix G., Lindberg E., Odin L., Werner I., *Nature* **175**, 340 (1955).
10. Blix G., Lindberg E., Odin L., Werner I., *Acta Soc. Med. Upsalien* **61**, 1 (1956).
11. Blix G., Snellman O., *Arkiv Kemi. Mineral. Geol. A* **19**, nr 32 (1945).
12. Blix G., Svennerholm L., Werner I., *Acta Chem. Scand.* **6**, 358 (1952).
13. Boehm P., Baumeister L., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **305**, 42 (1956).

14. Boehm P., Dauber S., Baumeister L., *Klin. Wochschr.* **32**, 291 (1954).
15. Brossmer R., Walter K., *Klin. Wochschr.* **36**, 925 (1958).
16. Burnet F. M., Stone J. D., *Australian J. Exptl. Biol.* **24**, 1 (1946).
17. Cabezas J. A., Porto J. V., Frois M. D., *Biochim. Biophys. Acta* **83**, 318 (1964).
18. Cardini G. E., Leloir L. F., *J. Biol. Chem.* **225**, 317 (1957).
19. Carlson M., *J. Biol. Chem.* **241**, 2984 (1966).
20. Carlson D. M., McGuire E. J., Jourdian G. W., Roseman S., *Federation Proc.* **23**, 380 (1964).
21. Chatagnon C., Chatagnon P., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **148**, 1765 (1954).
22. Chatagnon C., Chatagnon P., *Presse Med.* **63**, 1194 (1955).
23. Comb D. G., Roseman S., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 635 (1958).
24. Comb D. G., Roseman S., *J. Biol. Chem.* **235**, 2529 (1960).
25. Comb D. G., Shimiru F., Roseman S., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 5513 (1959).
26. Denamur R., Fauconneau G., Guntz G., *Compt. Rend.* 1958, cyt. wg 66.
27. Drzemiek R., Abst. IV-th Meeting, FEBS Oslo, 485 (1967).
28. Dżułyńska J., *Post. Hig. Med. Dośw.* **12**, 161 (1958).
29. Egge H., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**, 1429 (1960).
30. Enzymy, Nomenklatura, Klasyfikacja, PWN, Warszawa 1967.
31. Ghosh S., Roseman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 955 (1961).
32. Ghosh S., Roseman S., *Federation Proc.* **21**, 89 (1962).
33. Got R., Bourillon R., *Nature* **189**, 234 (1961).
34. Gottschalk A., *Biochem. J.* **61**, 298 (1955).
35. Gottschalk A., *Nature* **176**, 881 (1955).
36. Gottschalk A., *Yale J. Biol. Med.* **28**, 525 (1956).
37. Gottschalk A., *Nature* **194**, 1051 (1962).
38. Gottschalk A., Graham E. R. B., *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 380 (1959).
39. Gottschalk A., McKenzie H. A., *Biochim. Biophys. Acta* **54**, 226 (1961).
40. Graham E. R. B., Gottschalk A., *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 513 (1960).
41. Heimer R., Meyer K., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **42**, 728 (1956).
42. Klenk E., Debuch H., *Annual Rev. Biochem.* **28**, 39 (1959).
43. Klenk E., Gielen W., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **330**, 218 (1963).
44. Klenk E., Lauenstein K., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **291**, 249 (1952).
45. Klenk E., Lauenstein K., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **295**, 164 (1953). (1953).
46. Klenk E., Uhlenbruck G., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **307**, 266 (1957).
47. Klenk E., Wolter H., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **291**, 259 (1952).
48. Kornfeld S., Kornfeld R., Neufeld E. F., O'Brien P. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 371 (1964).
49. Kuhn R., Brossmer R., *Chem. Ber.* **87**, 123 (1954).
50. Kuhn R., Brossmer R., *Angew. Chem.* **68**, 211 (1956).
51. Kuhn R., Muldner H., *Naturwissenschaften* **51**, 635 (1964).

52. Laurell A. B., Broonestam R., *Acta Path. Microb. Scand.* **47**, 429 (1959).
53. Leloir L. F., *Arch. Biochem. Biophys.* **33**, 186 (1951).
54. Levene P., *J. Biol. Chem.* **39**, 69 (1919).
55. Levin D. H., Racker E., *J. Biol. Chem.* **234**, 2532 (1959).
56. Mayron L. W., Robert B., Winzler R., Rafelson M. E., *Arch. Biochem.* **92**, 475 (1961).
57. McGuire E. J., Binkley S. B., *Biochemistry* **3**, 247 (1963).
58. Mikulaszek E., *Post. Mikrobiol.* **2**, 255 (1963).
59. Mohr E., Schramm G., *Z. Naturforsch.* **156**, 568 (1960).
60. Montreil J., Biserte G., Strecker H., Spik G., Fontaine G., Farriaux J., *Compt. Rend. Acad. Sci.* **265/1**, 97 (1967).
61. Munch-Petersen A., Kalekar H. M., Cutulo E., Smith E. E. B., *Nature* **172**, 1037 (1953).
62. O'Brien D., Canady M. R., Hall C. W., Neufeld E., *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 331 (1966).
63. Popenoe E. A., *Biochim. Biophys. Acta* **32**, (1959).
64. Robinson J. C., Pierce J. E., *Nature* **204**, 472 (1964).
65. Romanowska E., *Naturwissenschaften* **47**, 66 (1960).
66. Roseman S., *Federation Proc.* **21**, nr 6, 1075 (1962).
67. Roseman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 437 (1962).
68. Roseman S., Abstr. VI. Intern. Congress of Biochemistry, New York, 6, 467 (1964).
69. Roseman S., Hayes F., Ghosh S., *Federation Proc.* **19**, 716 (1960).
70. Roseman S., Yourdian G. W., Watson D., Rood R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 958 (1961).
71. Rosevaer J. W., Smith E. L., *J. Biol. Chem.* **236**, 425 (1961).
72. Sandhoff K., Jatzkewitz H., *Biochim. Biophys. Acta* **141**, 442 (1967).
73. Schauer R., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **351**, 783 (1970).
74. Schauer R., Schoop H. J., Wintertagung der Gesellschaft für Biologische Chemie *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **350**, 13 (1969).
75. Schneirt M. L., Rafelson M. E., *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 1 (1966).
76. Schoop H. J., Schauer R., Faillard H., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **350**, 155 (1969).
77. Shoyab M., Bachhawat B. K., *Indian J. Biochem.* **2**, 6 (1965).
78. Shoyab M., Bachhawat B. K., *Biochem. J.* **102**, 13c, 636 (1967).
79. Shoyab M., Bachhawat B. K., *Indian J. Biochem.* **4**, 142 (1967).
80. Spiro R. G., *J. Biol. Chem.* **237**, 646 (1962).
81. Spiro R. G., *Diabetes* **12**, 223 (1963).
82. Spiro M. J., Spiro R. G., Abstr. IV, 7th Intern. Congress of Biochemistry, Tokyo, 1967, D-37.
83. Svennerholm L., *Acta Soc. Med. Upsal.* **62**, 1 (1957).
84. Svennerholm L., *Acta Chem. Scand.* **12**, 547 (1958).
85. Svennerholm E., Svennerholm L., *Nature* **181**, 1154 (1958).
86. Szymczyk T., Jachimowicz M., Świątkowska B., *Acta Biochim. Polon.* **18**, 000 (1971) (w druku).
87. Warren L., *J. Biol. Chem.* **234**, 1971 (1959).
88. Warren L., *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 347 (1960).
- 88a. Warren L., *Biochim. Biophys. Acta* **83**, 129 (1964).
89. Warren L., Felsenfeld H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **4**, 234 (1961).

90. Warren L., Felsenfeld H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 5, 185 (1961).
91. Warren L., Spearing C. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 3, 489 (1960).
92. Yamakawa T., Suzuki S., *J. Biochem. (Tokoyo)* 42, 727 (1955).
93. Yourdian G. W., Carlson D. M., Roseman S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 10, 352 (1963).
94. Zilliken F., Braun G. A., Georgy P., *Arch. Biochem. Biophys.* 54, 564 (1955).

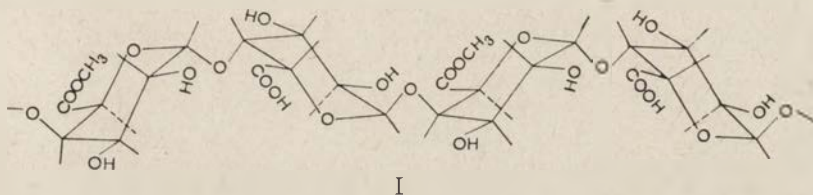
MARIA WOJCIECHOWICZ *

Liaza pektynianowa

Pectate Lyase

The review of present knowledge of pectate lyase is given.

Pektyna jest polimerem reszt kwasu α -D-galakturonowego, częściowo zestryfikowanych alkoholem metylowym, połączonych ze sobą wiązaniem α -1,4-glikozydowym i tworzących łańcuchy o różnej długości (I).



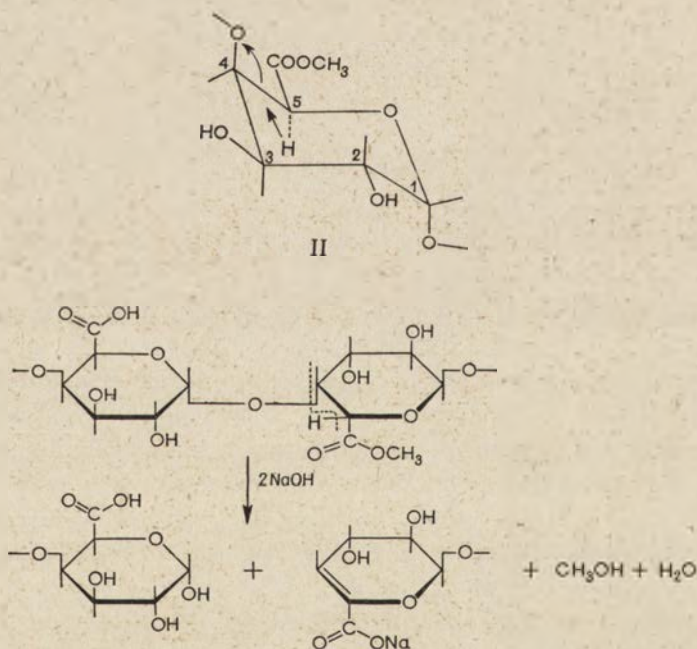
Do niedawna enzymy pektynolityczne zaliczano do hydrolaz. W grupie tej wyróżniano glikanohydrolazę poli- α -1,4-galakturonidu (EC 3.2.1.15), nazywaną potocznie poligalakturonazą, oraz pektylolhydrolazę pektyn (EC 3.1.1.11), o potocznej nazwie pektynoesteraza. Pierwszy enzym katalizuje hydrolizę wiązania 1,4-glikozydowego w pektynie, kwasie pektynowym, pektowym i w oligogalakturonidach. Drugi enzym katalizuje rozpad wiązania estrowego w cząsteczce pektyny i kwasu pektynowego z utworzeniem w niej wolnych grup karboksylowych i wydzielaniem metanolu. Do hydrolaz pektynolitycznych zalicza się enzymy o różnej specyficzności substratowej i różnej swoistości działania, co jest przedmiotem licznych opracowań monograficznych i przeglądowych (12, 21, 23, 24, 25, 55). W ostatnim dziesięcioleciu nagromadziło się wiele danych o enzymie pektynolitycznym innego rodzaju, katalizującym rozkład cząsteczki pektyny z usunięciem atomu wodoru i wytworzeniem podwójnego wiązania

* Dr, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt, Polska Akademia Nauk, Jabłonna k/Warszawy

Wykaz stosowanych skrótów: PTE — liaza rozszczepiająca pektynę, PATE — liaza rozszczepiająca kwas poligalakturonowy, EDTA — etylenodwuaminoczworoctan, TBA — kwas tiobarbiturowy, -CHO — grupa aldehydowa.

(4, 7). Enzym ten nazwano liazą poli- α -1,4-D-galakturonidu (EC 4.2.99.3) (nazwa potoczna — liaza pektynianowa).

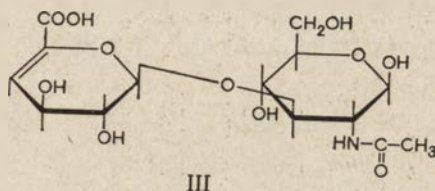
Rozkład pektyn z wytworzeniem nienasyconych produktów po raz pierwszy zaobserwowali Albersheim, Neukom, Deuel (3) podczas ogrzewania pektyny w środowisku zbuforowanym o pH 6, 8 oraz alkalicznym w podwyższonej temperaturze (90°). Podatność cząsteczki pektyny na tego rodzaju chemiczną degradację uwarunkowana jest stopniem zestryfikowania łańcucha. Wiązanie glikozydowe w pozycji β do zestryfikowanej grupy karboksylowej w łańcuchu pektyny rozrywa się w wyniku β -dealkoksylacji, przy czym wodór przy atomie węgla 5 zostaje usunięty z wytworzeniem nienasyconego wiązania między atomami węgla 4 i 5 (schemat 1) (40, 50, 54). Taka reakcja (transeliminacji) może zachodzić wówczas, gdy eliminowane podstawniki znajdują się względem siebie w położeniu *trans* i są aksjalne (3). Konformacja kwasu galakturonowego odpowiada tym stereochemicznym wymaganiom. Pierścień piranozowy α -D-galakturonowego kwasu występuje w formie krzesłowej C₁, najbardziej trwałej konformacji α -D-galaktozy (47), a wodór przy C₅ i reszta glikozydowa przy C₄ są w położeniu *trans* (II).



Schemat 1. Alkaliczna degradacja łańcucha pektynowego (wg 40)

Kwas pektowy, nie zawierający grup estrowych, jest całkowicie odporny na alkaliczną degradację. Ci sami badacze stwierdzili podobny mechanizm działania handlowego preparatu enzymatycznego *Pectinol R-10* (4) na pektynę.

Nieco wcześniej podobny mechanizm rozkładu kwasu hialuronowego przez liazę hialuronianową z bakterii *Staphylococcus aureus* i *Cl. welchii* typ II podali Linker, Meyer, Hoffman (26). W wyniku reakcji powstaje dwucukrowiec (III), złożony z kwasu Δ -4,5-D-glukopirano-owego, połączonego wiązaniem glikozydowym (1 \rightarrow 3) z N-acetylo-2-amino-D-glukopiranozą. W odróżnieniu od podstawowego dwucukrowca polimeru, związek ten zawiera podwójne wiązanie.

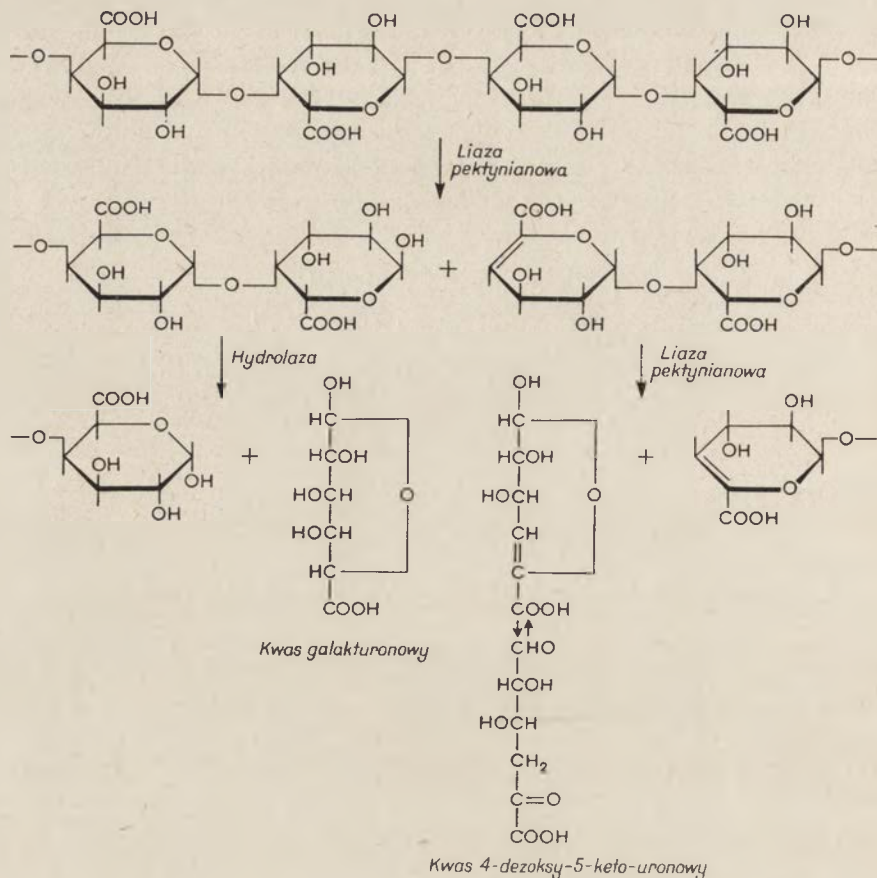


W okresie 1960—1970 wykryto, że enzymy pektynolityczne wyższych roślin, grzybów i bakterii mogą katalizować reakcję transeliminacji i że w wielu przypadkach rozkład pektyn, przypisywany działaniu hydrolaz, był spowodowany w istocie działaniem liazy pektynianowej (6, 8, 9, 30). Dean i Wood (10) wykazali, że rozkład (maceracja) tkanki ziemniaka przez wyciąg z *Erwinia aroideae* zachodzi pod wpływem liazy, a nie, jak sądzono wcześniej, poligalakturonazy. Również enzym z wyciągu *Sclerotinia fructigena* i *Pythium ultimum* przez niektórych badaczy nazywany jest enzymem macerującym i utożsamiany z liazą pektynianową (8, 9, 30).

W wyniku działania hydrolaz i liaz pektynianowych powstają odmienne produkty. Preiss i Ashwell (45) wykryli u *Pseudomonas* z gleby oba enzymy i oznaczyli końcowe produkty ich działania na kwas poligalakturonowy (schemat 2).

I. Wytwarzanie liazy pektynianowej przez drobnoustroje

Na produkcję enzymu przez drobnoustroje duży wpływ wywierają warunki środowiska. U *Bacillus polymyxa* liaza wytwarza się podczas eksponencjalnej fazy wzrostu komórek, o ile w podłożu znajduje się pektyna, kwas pektowy lub kwas galakturonowy (34, 35). Glukoza i galaktoza nie wywołują wytwarzania enzymu, podobnie jak u *Erwinia carotovora* EC 153 (48). Starr i Nasuno (49) stwierdzili wytwarzanie się liazy u bakterii rodzaju *Xanthomonas* na podłożu z pektyną, ale niektóre szczepy tych bakterii wytwarzają nieznaczne ilości liazy podczas wzrostu na podłożu z glukozą. Wśród szczepów *Pseudomonas marginalis*, wytwarzających liazę na podłożu z pektyną lub kwasem poligalakturonowym, wykryto szczep PM 171 wytwarzający liazę na podłożu z glukozą (37). Hsu



Schemat 2. Enzymatyczna degradacja kwasu poligalakturonowego (wg 45)

i Vaughn (22) stwierdzili wytwarzanie liazy konstytutywnej u *Aeromonas liquefaciens* niezależnie od źródła węgla w podłożu, hamowane przez produkty rozkładu substratu. Ponadto wyhodowali oni mutantą szczepu *A. liquefaciens* Go-6, u którego nadmiar substratu nie hamował produkcji liazy. *Clostridium multif fermentans* (27) wytwarza liazę rosnącą na pożywkach z pektyną, kwasem poligalakturonowym i niższymi oligogalakturonidami, a ilość liazy jest tym większa, im dłuższy jest łańcuch oligogalakturonidu. Liaza nie powstaje w komórkach hodowanych na glukozie i galaktozie, a glukoza staje się represorem liazy, gdy znajduje się w podłożu razem z kwasem poligalakturonowym (27, 28). Metaboliczną regulację liazy u *Erwinia* badali Moran i Starr (29), wiele uwagi poświęcając ustaleniu miejsca jej biosyntezy. McNicol i Baker (31) wykryli ostatnio liazy pektynianowe w preparacie enzymatycznym z *Bacillus sphaericus*, rozkładające antygen-Vi. Antygen Vi z *Escherichia intermedium*, szczep 481, jest strukturalnie podobny do substancji pektynowych.

W ostatnich latach stwierdzono, że substancje pektynowe mogą być rozkładane na nienasycone jednostki galakturonowe nie tylko przez bakterie (27, 28, 34, 41, 42), ale i przez grzyby saprofityczne i chorobotwórcze roślin (6, 13, 15, 16, 17, 18, 30). *In vivo*, kiedy *pH* zakażonej tkanki roślinnej wzrasta, jej głównym enzymem pektynolitycznym jest liaza. Hancock (16) badał wpływ *pH* na produkcję liazy przez *Colletotrichum trifolii*, *in vivo* i *in vitro*. *Rhizoctonia solani* produkuje liazę (6, 46). U *Aspergillus fonsecaeus* hodowanego na pektynie wytwarza się znacznie więcej poligalakturonazy niż liazy, a ilość jej zależy od czasu trwania hodowli (13).

II. Właściwości liazy pektynianowej

1. Swoistość w stosunku do substratu

Liaza z grzybów i roślin wyższych katalizuje przede wszystkim rozkład pektyny i w skrócie w literaturze obcej oznaczana jest symbolem PTE (ang. *pectin-transeliminase*). Niekiedy w grzybach występuje liaza rozkładająca lepiej kwas poligalakturonowy, o wyższym *pH* optymalnego działania, zbliżonym do optymalnego *pH* liazy bakteryjnej (6, 17, 44). Liaza bakteryjna również katalizuje rozkład kwasu poligalakturonowego i oznaczana jest symbolem PATE (ang. *polygalacturonic-acid-transeliminase*). Liaza bakteryjna może powodować częściowy rozkład pektyny, przy czym rozbiciu ulegają jedynie fragmenty pektyny z wolnymi grupami karboksylowymi; pektyny całkowicie zestryfikowanej liaza bakteryjna nie rozkłada (38). Często liazie towarzyszy pektyno-esteraza, która destryfikując pektynę przygotowuje substrat do działania PATE (27).

2. Optimum *pH* i temperatury

Liazy pektynianowe wykazują dużą zależność szybkości reakcji od *pH*. PTE wykazuje optymalne działanie przy *pH* 5,2 (2, 13, 15). Wyjątkiem są: PTE u *Sclerotinia fructigena* (9), u którego występują dwa izoenzymy o optymalnym *pH* działania 7,3 i 8,3 oraz PTE u *Aspergillus fonsecaeus* (13), o optimum działania w *pH* 5,2 oraz w obszarze alkalicznym, zwłaszcza w obecności jonów wapnia. PATE wykazuje optymalne działanie w *pH* od 8,0—9,5 u bakterii, a u grzybów od 7,0—9,9 (6, 30, 44).

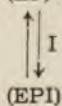
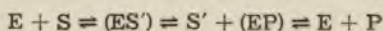
Optymalna temperatura działania liazy z *Bacillus polymyxa*, *Erwinia aroideae* i *Xanthomonas campestris* wynosi 45°, u *Pseudomonas marginalis* — 50°, u *Erwinia carotovora* — 40°.

3. Aktywatory i inhibitory

Nagel i Vaughn (34) stwierdzili, że dializa obniża aktywność liazy kwasu poligalakturonowego z *Bacillus polymyxa*. Aktywność można przywrócić jonami wapnia; jony innych metali nie mają wpływu. Całkowicie hamują PATE u *Xanthomonas campestris* jony baru (38). Aktywność PATE u różnych drobnoustrojów wyraźnie wzrasta w obecności jonów wapnia (6, 28, 34, 38, 44, 48), a dodatek EDTA hamuje aktywność PATE.

Edstrom i Phaff (13) badali wpływ jonów na aktywność liazy pektynianowej z *Aspergillus fonsecaeus*. Chlorek wapnia silniej aktywuje PTE niż chlorek magnezu, który z kolei jest lepszym aktywatorem od chlorku sodu. Maksymalne działanie PTE osiągano przy różnych stężeniach kationów. Edstrom i Phaff badali również wpływ anionów. Octany i fosforany w dużych stężeniach hamują aktywność enzymu, a chlorki i siarczany pobudzają ją. Demain i Phaff (11) stwierdzili, że poligalakturonazę pektynianową z *Saccharomyces fragilis* hamuje kwas trójgalakturonowy, natomiast kwas dwugalakturonowy i galakturonowy nie mają wpływu na jej aktywność. Podobnie Nagel i Hasegawa (33) badając liazę ze szczepów *Bacillus* z gleby wykazali, że w czasie rozkładu kwasu pięciogalakturonowego rolę inhibitorów kompetycyjnych spełniają kwas trójgalakturonowy i galakturonowy.

Wykrycie liazy pektynianowej u roślin wyższych nasunęło przypuszczenie o powiązaniu tego enzymu z działaniem auksyn. Badania Albersheima i Killiasa (2) wykazały, że działanie auksyn na liazę nie jest specyficzne. Okazało się, że obok kwasu indolilo-3-octowego również kwas dwuchlorofenoksyizomasłowy, będący antagonistycznym związkiem auksyn, oraz syntetyczne auksyny jak kwas dwuchlorofenoksyooctowy (2,4-D) i 2,3,6-trójchlorobenzoesowy hamują liazę. Zaobserwowano, że auksyna hamuje w różnym stopniu działanie liazy na różne preparaty pektynowe i dopatrywano się jakiegoś czynnika w samych preparatach pektynowych, tym bardziej, że aktywność liazy spada w miarę wzrostu stężenia pektyny, a stopień hamowania jest zależny od rodzaju pektyny. Albersheim (1) wykazał, że nienasycone produkty degradacji substratu hamują liazę. Przypuszczano, że właśnie te produkty degradacji, występujące w nieznacznym ilościach w preparatach handlowych pektyny mogły hamować aktywność liazy w obecności auksyn. Usunięcie tych produktów na drodze ozonowania roztworów pektyn potwierdziło te przypuszczenia. Po ozonowaniu auksyny nawet w dużych stężeniach nie hamowały liazy. Albersheim zaproponował następujący mechanizm hamowania liazy przez auksyny w obecności nienasyconych produktów rozkładu pektyny:



E-liaza, S-pektyna, S'-produkt rozkładu, który ma (lub nie) nienasycone wiązanie, P-produkt degradacji o charakterze nienasyconym, I-inhibitor roślinny. Inhibicja ma tutaj charakter allosteryczny. Auksyna hamuje działania liazy przez tworzenie kompleksu z liazą i nienasyconymi uronidami.

4. Sposób rozbijania łańcucha pektynowego przez liazy

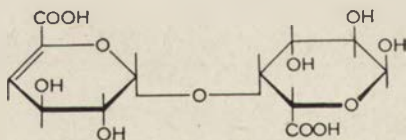
Liaza katalizuje rozpad łańcucha pektynowego w różny sposób. Enzym z *Clostridium multif fermentans* (27) oraz z *Erwinia aroideae* (42) rozrywa wiązanie skrajne z końca łańcucha od strony redukującej, natomiast z innych bakterii, jak *Bacillus polymyxa*, *Bacillus* z gleby, *Erwinia carotovora* i *Xanthomonas*, działa w sposób przypadkowy raczej w środku łańcucha, a więc ma charakter endoliazy (33, 34, 38). Egzoliazy katalizują rozerwanie wiązania skrajnego, przy czym z równą szybkością ulega rozbiciu trimer, tetramer, jak kwas poligalakturonowy. Natomiast endoliazy degradują poliuronidy z szybkością malejącą w miarę zmniejszania się długości łańcucha. Różnica w działaniu endo- i egzoliaz jaskrawo uwidoczniła się na przykładzie rozpadu kwasu czterogalakturonowego. Endoliaza może katalizować rozerwanie wiązania drugiego i trzeciego z redukującego końca, dając w wyniku kwas galakturonowy, nienasycony dwu- i trójgalakturonowy oraz śladowe ilości kwasu dwugalakturonowego. Egzoliazy rozrywają jedynie wiązanie centralne (drugie) dając równe ilości zwykłego i nienasyconego kwasu dwugalakturonowego (27). Liaza u *Bacillus polymyxa* katalizuje rozerwanie łańcucha z nieredukującego końca, nie działa na kwas dwugalakturonowy, który jest metabolizowany przez dwugalakturonazę wewnątrz komórki bakterii (34). Liaza u *Bacillus* z gleby nie rozkłada kwasu trójgalakturonowego nienasyconego, a poszczególne produkty rozkładu rozpuszczalnego kwasu pektynowego tworzą się w następujących ilościach: 56% stanowi nienasycony kwas trójgalakturonowy, 24% nienasycony kwas dwugalakturonowy, 11% kwas galakturonowy, 6% — dwugalakturonowy, 2% nienasycony czterogalakturonowy i 1% trójgalakturonowy. PATE nie działa na wiązanie przy grupie redukującej łańcucha, rozrywa szybciej wiązanie trzecie niż czwarte, a obecność końcowych nienasyconych produktów obniża jej aktywność. W nienasyconym kwasie czterogalakturonowym rozkład wiązania trzeciego jest zaledwie 1,6 razy szybszy niż wiązania drugiego, natomiast w zwykłym kwasie czterogalakturonowym wiązanie trzecie jest rozkładane 26 razy szybciej niż drugie. W kwasie pięciogalakturonowym wiązanie trzecie jest rozrywane najszybciej, wolniej czwarte, a najwolniej drugie (33). PTE u *Aspergillus fonsecaeus* (14) nie jest zdolna do rozbicia dwu glikozydowych wiązań leżących najbliżej redukującego końca łańcucha, a przeto nie rozkłada trimery, który jest końcowym produktem działania liazy. Poważnie jest utrudnio-

ne, w pewnym stopniu przez podwójne wiązanie, rozerwanie wiązania blisko nieredukującego końca.

Szybkość rozkładu estrów metylowych pektyny i oligogalakturonidów przez PTE u *Aspergillus fonsecaeus* zależy od stopnia zestyfikowania. Jeśli przyjmie się szybkość rozkładu całkowicie zestyfikowanej pektyny za 100, to szybkość rozkładu pektyny zestyfikowanej w 68% wynosi 75, zaś szybkość rozkładu sześciometylosześciogalakturonidu — 2,6, pięciometylopięciogalakturonidu — 0,65, a czterometyloczterogalakturonidu tylko 0,049.

PATE u *Xanthomonas* (38) działa przede wszystkim na wiązania w środku łańcucha zarówno w nienasyconych, jak też zwykłych oligogalakturonidach. Kwas galakturonowy, będący jednym z końcowych produktów rozkładu niższych oligogalakturonidów przez liazy z *Clostridium multifementans* (27), nie jest wykorzystywany przez komórkę *Clostridium*, natomiast nienasycony kwas dwugalakturonowy jest najprawdopodobniej metabolizowany, ponieważ nie nagromadza się *in vivo*. Moran (cyt wg 27) wykazał u *Erwinia carotovora* wewnątrzkomórkowy enzym, który katalizuje rozpad nienasyconego kwasu dwugalakturonowego na 2 cząsteczki kwasu 4-dezoksy-5-ketoheksuronowego. W tabelicy 1 przedstawiono możliwe drogi rozkładu niższych oligogalakturonidów, zwykłych i nienasyconych, przez liazy z różnych drobnoustrojów.

III. Końcowe produkty działania liazy



IV

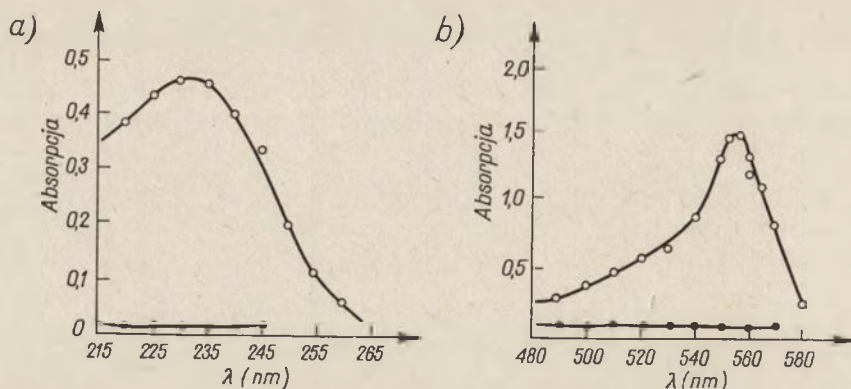
Do najczęściej spotykanych końcowych produktów degradacji pektyny, kwasu pektowego i oligogalakturonidów należy kwas dwugalakturonowy nienasycony (IV) oraz kwas 4-dezoksy-5-keto-heksuronowy (schemat 2). Nagel i Vaughan (34) otrzymali w wyniku działania enzymu z *Bacillus polymyxa* na kwas pektowy produkt, który wydzielili z mieszaniny reakcyjnej w postaci soli strontu. Po zastosowaniu *Dowex 50* w formie H^+ otrzymali wolny kwas o następujących właściwościach: ciężar cząsteczkowy — 367, stosunek grup karboksylowych do aldehydowych — 1,98, skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{22} = +177,8$, a więc nie odbiegających od właściwości kwasu dwugalakturonowego. Jednak maksimum absorpcji w 230—235 nm, którego nie wykazywał zwykły dimer, świadczyło o obecności nienasyconego wiązania w produkcie (rysunek 1).

Tablica 1

Możliwe drogi rozkładu zwykłych i nienasyconych niższych oligogalakturonidów przez liazy drobnoustrojów

Źródło enzymu	Liaza rozkładająca	Rozrywane wiązanie w łańcuchu substratu	Produkty rozkładu
<i>Bacillus polymyxa</i> (32)	Kwas poligalakturonowy	$\begin{array}{l} \downarrow \quad \\ \text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O} > = \\ \quad \quad \quad \downarrow \\ \emptyset-\text{O}-\text{O}-\text{O} > = \\ \quad \quad \quad \downarrow \\ \text{O}-\text{O}-\text{O} > = \\ \quad \quad \quad ? \quad ? \\ \emptyset-\text{O}-\text{O} > = \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{O} > + \emptyset-\text{O}-\text{O} > \\ \text{O}-\text{O} > + \emptyset-\text{O} > \\ \emptyset-\text{O} > + \emptyset-\text{O} > \\ \text{O} > + \emptyset-\text{O} > \\ \text{X} + \emptyset-\text{O} > \end{array}$
<i>Bacillus z gleby</i> (33)	Kwas poligalakturonowy	$\begin{array}{l} \downarrow \quad \quad \vdots \\ \text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O} > = \\ \quad \quad \quad \downarrow \\ \text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O} > = \\ \quad \quad \quad \downarrow \\ \emptyset-\text{O}-\text{O}-\text{O} > = \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{O}-\text{O} > + \emptyset-\text{O}-\text{O} > \\ \text{O}-\text{O}-\text{O} > + \emptyset-\text{O} > \\ \text{O} > + \emptyset-\text{O}-\text{O}-\text{O} > \\ \text{O} > + \emptyset-\text{O}-\text{O} > \\ \text{O}-\text{O} > + \emptyset-\text{O} > \\ \text{X} + \emptyset-\text{O}-\text{O} > \\ \emptyset-\text{O} > + \emptyset-\text{O} > \end{array}$
<i>Xanthomonas campestris</i> (38)	Kwas poligalakturonowy	$\begin{array}{l} \vdots \quad \downarrow \quad \\ \text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O} > = \\ \quad \quad \quad \downarrow \\ \emptyset-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O} > = \\ \quad \quad \quad \quad \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad ? \\ \text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O} > = \\ \quad \quad \quad \downarrow \\ \emptyset-\text{O}-\text{O}-\text{O} > = \\ \quad \quad \quad \downarrow \\ \text{O}-\text{O}-\text{O} > = \\ \quad \quad \quad ? \quad ? \\ \emptyset-\text{O}-\text{O} > = \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{O}-\text{O} > + \emptyset-\text{O}-\text{O} > \\ \text{O}-\text{O}-\text{O} > + \emptyset-\text{O} > \\ \text{O} > + \emptyset-\text{O}-\text{O}-\text{O} > \\ - \emptyset-\text{O} > + \emptyset-\text{O}-\text{O} > \\ \text{O}-\text{O} > + \emptyset-\text{O} > \\ \text{O} > + \emptyset-\text{O}-\text{O} > \\ \emptyset-\text{O} > + \emptyset-\text{O} > \\ \text{O} > + \emptyset-\text{O} > \\ \text{X} + \emptyset-\text{O} > \end{array}$
<i>Erwinia aroideae</i> (42)	Kwas poligalakturonowy	$\begin{array}{l} \downarrow \\ \text{O}-\text{O}-\text{O} > = \end{array}$	$\text{O} > + \emptyset-\text{O} >$
<i>Clostridium multifermens</i> (27)	Kwas poligalakturonowy	$\begin{array}{l} \downarrow \\ \text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O} > = \\ \quad \quad \quad \downarrow \\ \text{O}-\text{O}-\text{O} > = \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{O}-\text{O} > + \emptyset-\text{O} > \\ \text{O} > + \emptyset-\text{O} > \end{array}$
<i>Aspergillus fonsecaeus</i> (14)	Pektynę	$\begin{array}{l} \downarrow \quad \quad \downarrow \\ \text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O} > * = \\ \quad \quad \quad \downarrow \\ \text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O} > * = \\ \quad \quad \quad \downarrow \\ \text{O}-\text{O}-\text{O}-\text{O} > * = \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{O}-\text{O}-\text{O} > + \emptyset-\text{O}-\text{O} > \\ \text{O}-\text{O} > + \emptyset-\text{O}-\text{O}-\text{O} > \\ \text{O}-\text{O} > + \emptyset-\text{O}-\text{O} > \\ \text{O} > + \emptyset-\text{O}-\text{O} > \end{array}$

O — jednostka kwasu galakturonowego w łańcuchu, O'> — jednostka końcowego kwasu galakturonowego z grupą redukującą, ∅ — jednostka kwasu galakturonowego z 4,5-nienasyconym wiązaniem, X — kwas 4-dezo ksy-5-keto-heksuronowy, * — syntetyczne estry metylowe oligogalakturonidów; heksamer inkubowany z PTE 10 godzin, pentamer 20 godzin, a tetramer 100 godzin, ↓ rozkład najszybszy, | powolniejszy, ∴ bardzo wolny, ?? — nie wyjaśnione, które wiązanie ulega rozerwaniu, gdyż w obu przypadkach otrzymuje się te same produkty.

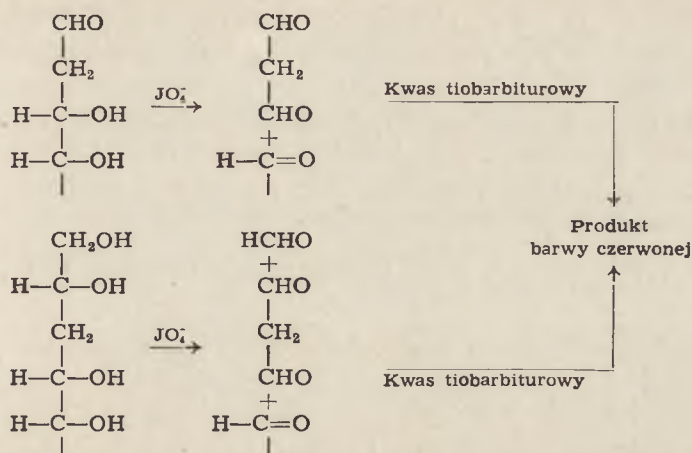


Rys. 1. (wg 19). a. Widmo absorpcyjne kwasów dwugalakturonowych: nienasyconego (10⁻⁴M) —○—○— i nasyconego (10⁻⁴M) —●—●—; b. Widmo absorpcyjne produktów reakcji z kwasem tiobarbiturowym. Nienasycony dimer —○—○—; nasycony dimer —●—●—

Na odmiennosć tego związku od kwasu dwugalakturonowego wskazywały także: występowanie maksimum absorpcji w 550 nm po reakcji z kwasem tiobarbiturowym (TBA), reakcja z bromem oraz chromatografia bibułowa (14, 19, 34, 38). Położenie nienasyconego wiązania ustalono na drodze ozonowania produktu. Po ozonowaniu, kwaśnej hydrolizie i ekstrakcji eterowej otrzymano kwas szczawiowy, który zidentyfikowano na drodze chemicznej, chromatograficznej i widma w podczerwieni (3, 13, 19). Jak wykazali Linker, Meyer, Hoffman (26), jedynie wtedy, gdy wiązanie podwójne znajduje się między C₄ i C₅ kwasu uronowego, po ozonowaniu otrzymuje się kwas szczawiowy. Hasegawa i Nagel (19) uważają, że związek ten ma strukturę kwasu 4-O- α -D-(4,5-dehydrogalakturonozyl)-D-galakturonowego (IV).

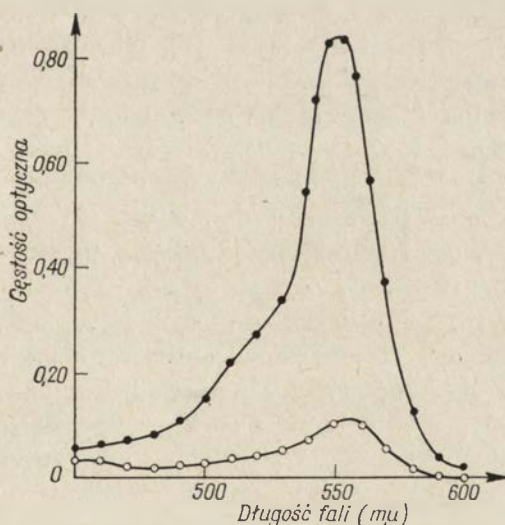
Kwas 4-dezoksy-5-ketoheksouronowy, zidentyfikowany przez Preissa i Ashwella (45), wykazuje silną absorpcję po reakcji z TBA w 550 nm, natomiast w jego widmie brak maksimum absorpcji w 235 nm, ponieważ pozostaje on w równowadze z formą łańcuchową nie zawierającą podwójnego wiązania (schemat 2) (32, 33). Na chromatogramie charakteryzuje się szybszą migracją od kwasu galakturonowego, czym różnią się zresztą wszystkie nienasycone produkty degradacji od zwykłych oligogalakturonidów (14, 19, 34). Reakcja z TBA podana przez Waravdekar i Saslaw (51) dla dezoksyrybozy jest charakterystyczna dla związków, które po utlenieniu nadjodanem tworzą dwualdehyd malonowy lub kwas β -formylopirogronowy. Związki te kondensując z TBA dają barwne połączenie o maksimum absorpcji w 547–550 nm (schemat 3).

Reakcję tę zastosowali Weissbach i Hurwitz (53) do wykrywania kwasu 2-keto-3-dezoksyhepturonowego w ekstraktach z *Escherichia coli*. Neukom (39), Albersheim, Neukom i Deuel (3, 4) i inni



Schemat 3. Barwna reakcja 2-dezoksycukrowców i 3-dezoksypolioli z jodanem i tiobarbituranem (wg 5)

(6, 15, 17, 41) wykorzystali ją do wykrywania nienasyconych produktów degradacji pektyny. Reakcja zachodzi nawet z pominięciem etapu utleniania nadjodanem. Okamoto, Hatanaka i Ozawa (43) badali warunki reakcji TBA z nienasyconym kwasem dwugalakturonowym i stwierdzili, że natężenie barwy osiąga maksimum podczas utleniania nadjodanem w temperaturze 80°, w ciągu 15 minut ogrzewania. Natężenie barwy jest około 8-krotnie mniejsze, gdy pominie się utlenianie (rysunek 2).



Rys. 2. Widmo absorpcyjne barwnego produktu wytworzonego z 4,5-nienasyconego kwasu dwugalakturonowego w reakcji z kwasem tiobarbiturowym (wg 43)
○ — bez utleniania nadjodanem, oznaczona gęstość optyczna $\times 1,088$; ● — po utlenieniu nadjodanem

Reakcja z TBA pozwala jednocześnie wykryć w badanym roztworze, obok nienasyconych produktów degradacji, kwas galakturonowy przez pomiar absorpcji przy 515 nm (15, 17). Zmodyfikowana reakcja z TBA znajduje również zastosowanie do wykrywania związków o charakterze dezoksy-keto-cukrowcowym na chromatogramach (5, 52).

IV. Oczyszczanie liazы i jednostka aktywności liazы

Prace nad wydzieleniem i oczyszczeniem liazы z *Bacillus polymyxa* zapoczątkowali Nagel i Vaughn (34). Zastosowali oni chromatografię kolumnową na DEAE-celulozie i CM-celulozie. Nagel i Anderson (32) przed chromatografią wytrącali białka acetonem, co podwyższyło aktywność specyficzną liazы. Stosując podobną metodę Nasuno i Starr (38) uzyskali 66-krotne oczyszczenie liazы z *Xanthomonas*. Hasegawa i Nagel (20) w celu rozdzielenia poligalakturonazy od liazы zastosowali frakcjonowane wytrącanie siarczanem amonu i chromatografię na DEAE-celulozie. Albersheim i Killias (2) oczyszczali liazę z *Pectinol* R-10 za pomocą chromatografii na DEAE-celulozie, sączenia na żelu *Sephadex G-75* i wytrącania w punkcie izoelektrycznym. Edstrom i Phaff (13) użyli żelu pektatu wapnia i DEAE-celulozę.

Szybkość rozkładu próbek pektyny z tego samego źródła przez liazę może różnić się nawet o 50% (2). Zdolność liaz do rozkładu substratu pektynowego zależy od stopnia estryfikacji łańcucha, długości łańcucha, różnic strukturalnych, związanych z obecnością obojętnych cukrowców (24, 25), i od małych ilości nienasyconych oligogalakturonidów w preparacie (1). Dlatego też aktywność liazы wyraża się w jednostkach umownych. Aktywność liaz oznacza się na podstawie pomiaru wzrostu absorpcji światła przy 235 nm. Metoda ta pozwala na oznaczenie aktywności liaz w obecności hydrolaz pektynianowych. Dla ułatwienia porównania aktywności poligalakturonaz i liaz pektynianowych, jednostkę aktywności tych ostatnich określa się jako ilość enzymu, która uwalnia 1 μmol grup aldehydowych (CHO)/1 min. w 30° z pektyny w roztworze 0,5% w 0,1 M buforze octanu sodu o pH 5,2. Wydzielenie 1 μmola grup aldehydowych w 10 ml roztworu jest równoważne wzrostowi absorpcji o 0,555 przy 235 nm (13).

Za jednostkę aktywności liazы poligalakturonianowej (PATE) przyjmuje się tę ilość enzymu, która uwalnia z kwasu poligalakturonowego 1 μmol CHO/1 min. w 30° (0,25% poligalakturonian sodu, 0,001 M CaCl_2 , 0,05 M Tris-HCl pH 8,5). W tych warunkach wzrost o 0,26 absorpcji przy 235 nm w 2 ml roztworu jest równoważny wydzieleniu 0,1 μmola CHO (36).

Inni badacze stosują inne stężenia substratu, czas reakcji i inne stężenia buforu oraz mierzą absorpcję w 550 nm po reakcji z TBA (16, 28, 29, 30).

LITERATURA

1. Albersheim P., *Plant Physiol.* **38**, 426 (1963).
2. Albersheim P., Killias U., *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 107 (1962).
3. Albersheim P., Neukom H., Deuel H., *Arch. Biochem. Biophys.* **90**, 46 (1960).
4. Albersheim P., Neukom H., Deuel H., *Helv. Chim. Acta* **43**, 1422 (1960).
5. Anderson P. J., *J. Chromatog.* **21**, 163 (1966).
6. Ayers W. A., Papavizas G. C., Diem A. F., *Phytopathology* **56**, 1006 (1966).
7. Bailey R. W., *Oligosaccharides*, Pergamon Press, 1965, tom 4, str. 27.
8. Byrde R. J. W., Fielding A. H., *Nature* **196**, 1227 (1962).
9. Byrde R. J. W., Fielding A. H., *J. Gen. Microbiol.* **52**, 287 (1968).
10. Dean M., Wood R. K. S., *Nature* **214**, 408 (1967).
11. Demain A. L., Phaff H. J., *J. Biol. Chem.* **210**, 381 (1954).
12. Demain A. L., Phaff H. J., *Wallerstein Lab. Comm.* **20**, 119 (1957).
13. Edstrom R. D., Phaff H. J., *J. Biol. Chem.* **239**, 2403 (1964).
14. Edstrom R. D., Phaff H. J., *J. Biol. Chem.* **239**, 2409 (1964).
15. Grossman F., *Phytopathology Z.* **62**, 371 (1968).
16. Hancock J. G., *Phytopathology* **56**, 1112 (1966).
17. Hancock J. G., *Phytopathology* **58**, 62 (1968).
18. Hancock J. G., Millar R. L., *Phytopathology* **55**, 346 (1965).
19. Hasegawa S., Nagel C. W., *J. Biol. Chem.* **237**, 619 (1962).
20. Hasegawa S., Nagel C. W., *Nature* **213**, 207 (1967).
21. Hottenroth B., *Die Pektine und Ihre Verwendung*, Verlag R. Oldenbourg, München 1951, str. 143.
22. Hsu E. J., Vaughn H. R., *J. Bacteriol.* **98**, 172 (1969).
23. Jakubczyk T., *Przemysł Fermentacyjny* **2**, 59 (1965).
24. Kertesz Z. I., *Pectic Substances*. Interst. Publish. New York 1951, str. 333.
25. Kertesz Z. I., w *Comprehensive Biochemistry*, red. Florin M., Stotz E. H., Elsevier Publ. Comp. 1963, tom 5, str. 239.
26. Linker A., Meyer K., Hoffman Ph. *J. Biol. Chem.* **219**, 13 (1956).
27. Mcmillan J. D., Phaff H. J., Vaughn R. H., *Biochemistry* **3**, 572 (1964).
28. Mcmillan J. D., Vaughn R. H., *Biochemistry* **3**, 564 (1964).
29. Moran F., Starr M. P., *Eur. J. Biochem.* **11**, 291 (1969).
30. Moore L. D., Couch H. B., *Phytopathology* **58**, 833 (1968).
31. McNicol L. A., Baker E. E., *Biochemistry* **9**, 1017 (1970).
32. Nagel C. W., Anderson M. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **112**, 322 (1965).
33. Nagel C. W., Hasegawa S., *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 590 (1967).
34. Nagel C. W., Vaughn R. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 344 (1961), **94**, 328 (1961).
35. Nagel C. W., Vaughn R. H., *J. Bacteriol.* **83**, 1 (1962).
36. Nasuno S., Starr M. P., *J. Biol. Chem.* **241**, 5298 (1966).
37. Nasuno S., Starr M. P., *Phytopathology* **56**, 1414 (1966).
38. Nasuno S., Starr M. P., *Biochem. J.* **104**, 178 (1967).
39. Neukom H., *Chimia* **14**, 105 (1960).
40. Neukom H., Deuel H., *Chem. Ind.* **22**, 683 (1958).
41. Okamoto K., Hatanaka Ch., Ozawa J., *Berich. Ohara Inst. Land. Biol. Okayama Univ.* **12**, 107 (1964).

42. Okamoto K., Hatanaka Ch., Ozawa J., *Berich. Ohara Inst. Land. Biol. Okayama Univ.* **12**, 116 (1964).
43. Okamoto K., Hatanaka Ch., Ozawa J., *Berich. Ohara Inst. Land. Biol. Okayama Univ.* **13**, 6 (1965).
44. Papavizas G. C., Ayers W. A., *Phytopathology* **56**, 1269 (1966).
45. Preiss J., Ashwell G., *J. Biol. Chem.* **238**, 1571 (1963).
46. Sherwood R. T., *Phytopathology* **54**, 907 (1964).
47. Stacey M., Barker S. A., *Polysaccharides of Microorganisms*, Oxford at the Clarendon Press 1960, str. 3.
48. Starr P. M., Moran F., *Science* **135**, 920 (1962).
49. Starr P. M., Nasuno S., *J. Gen. Microbiol.* **46**, 425 (1967).
50. Vollmert B., *Makromolek. Chemie* **5**, 110 (1950).
51. Waravdekar V. S., Saslaw L. D., *J. Biol. Chem.* **234**, 1945 (1959).
52. Warren L., *Nature* **186**, 237 (1960).
53. Weissbach A., Hurwitz J., *J. Biol. Chem.* **234**, 705 (1959).
54. Whistler R. L., BeMiller I. N., *Advan. Carbohydr. Chem.* **13**, 313 (1958).
55. Wojciechowicz M., *Wiad. Chem.* **74**, 312 (1953).

ZOFIA POREMBSKA *

Arginaza z tkanek ureotelicznych i urikotelicznych kręgowców

The Arginase from Tissues of Ureotelic and Uricotelic Vertebrates

Occurrence of arginase in liver and other tissues of ureotelic animals and its isolation are presented, as well as the physical and chemical properties of the enzyme, and occurrence of isoenzymes. Some properties of the arginase from uricotelic animals are also described.

I. Występowanie arginazy i jej rozmieszczenie wewnątrz komórek

Arginaza (aminohydrolaza L-argininy EC 3.5.3.1.) katalizuje hydrolizę argininy do ornityny i mocznika. Enzym ten jest szeroko rozpowszechniony w przyrodzie i występuje w tkankach wielu zwierząt. Wśród kręgowców najbogatszym źródłem jest wątroba ssaków, gdzie zachodzi proces biosyntezy mocznika. Arginazę wykazano również w nerkach psa, kota, królika, szczura i człowieka, w śledzionie szczura i myszy, w mięśniu sercowym myszy (17) oraz mięśniu sercowym człowieka (44), w gruczołach ślinowych podżuchwowych, podjęzykowych i przyusznych szczura (31), w gruczołach ślinowych podżuchwowych i przyusznych wołu i świni (Gąsiorowska, dane niepublikowane), w mózgu świni (60), szczura (57), psa, człowieka, małpy, wołu i szczura (45), kota i żaby (8), w krwinkach czerwonych człowieka, owcy, wołu i świni (10), w jądrach psa, kota, królika i szczura (17), w płucach ryb i świni (33, 34) oraz w wątrobie, nerce, trzustce, śledzionie, sercu, mięśniu, jądrach i jajnikach wielu ryb chrzęstno-szkieletowych (12).

Występowanie arginazy w innych tkankach ssaków poza tkanką wątroby zależy często od rodzaju zwierzęcia; na przykład stwierdzono arginazę w czerwonych krwinkach człowieka, owcy, wołu i świni, a nie znaleziono jej w krwinkach małpy, szczura, królika, kota i psa (10). Odnosi się to również do mięśnia sercowego — Poremska i Kędra (dane niepublikowane) znalazły arginazę w mięśniu sercowym człowieka, a nie wykazały jej obecności w mięśniu sercowym szczura.

* Dr, Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Warszawa

Porównanie danych o aktywności arginazy z różnych tkanek u różnych gatunków zwierząt jest trudne ze względu na stosowanie przez autorów odmiennych warunków oznaczania, jak temperatura, stężenie argininy itp., nie zawsze optymalnie dobranych. W tabelicy 1 przedstawiono aktywność arginazy w tkankach szczura, oznaczaną w identycznych i optymalnych warunkach. W wątrobie aktywność jest największa, w nerce i śliniance około trzydziestokrotnie niższa, a w mózgu tysiąc-krotnie mniejsza. Należy zwrócić również uwagę na występowanie różnic w aktywności arginazy z tego samego narządu, lecz u różnych gatunków zwierząt. W wątrobie i nerce ssaków najwyższą aktywność enzymu stwierdzono u myszy (17).

Tablica 1

Aktywność arginazy w tkankach szczura wg 19

Tkanka	Aktywność
	μ mole ornityny/g świeżej tkanki/min.
Wątroba	330
Nerka	10
Gruzoł ślinowy podżuchowy	9
Mózg	0,28

Wiek i płeć decydują również w dużym stopniu o zawartości arginazy, osobniki męskie posiadają zwykle wyższe wartości niż osobniki żeńskie (23).

Z badań nad rozmieszczeniem arginazy w poszczególnych frakcjach podkomórkowych wynika, że w wątrobie szczura (19, 38) oraz w nerce, śliniance i mózgu szczura (19) enzym znajduje się przede wszystkim w jądrach, mitochondriach i mikrosomach, a tylko nieznaczny procent ogólnej aktywności odnaleźć można w supernatancie 105 000g (tablica 2).

Tablica 2

Aktywność arginazy we frakcjach podkomórkowych (a/ według 38, b/ według 19)

Frakcja	Aktywność arginazy (%)					
	a) Wątroba szczura	Wątroba aksołotla	b) Tkanki szczura			
			Wątroba	Nerka	Ślinianka podżuchowa	Mózg
Jądra	40	3	40	45	47	34
Mitochondria	19	1,0	24	35	35	49
Mikrosomy	37	3	28	9	8	5
Supernatant	4	93	7	4	3	4

Zwraca uwagę niska zawartość arginazy w mikrosomach nerki, mózgu i ślinianki w porównaniu z mikrosomami z wątroby.

W przeciwieństwie do tkanek szczura, u aksolotla całą aktywność arginazy wykrywa się w supernatancie wątroby (38).

II. Metody otrzymywania arginazy

1. *Oczyszczanie.* Preparaty arginazy o wysokim stopniu oczyszczenia uzyskano w wielu pracowniach wyłącznie z wątroby ssaków. Enzym najczęściej ekstrahowano z tkanek buforem o odczynie obojętnym, w obecności jonów Mn^{2+} . Jeszcze do niedawna oczyszczając arginazę stosowano denaturację nieaktywnych białek w podwyższonej temperaturze, wytrącanie enzymu acetonem i alkoholem oraz kilkakrotne wysalanie siarczanem amonowym (2, 3, 21, 22, 24, 33, 41, 46, 47, 51). W ostatnich latach zastosowano do oczyszczania arginazy chromatografię na *CM-* i *DEAE-celulozie* (55, 56), *DEAE-* i *CM-Sephadex* (32, 36) oraz sączenie na żelu *Sephadex* (27, 43).

W 1940 roku Richards i Hellerman (46) jako jedni z pierwszych uzyskali częściowo oczyszczone preparaty arginazy. W kilka lat później enzym o wyższym stopniu oczyszczenia otrzymano w kilku innych pracowniach (24, 33, 41, 47). Arginazę w formie krystalicznej otrzymali z wątroby konia, owcy, i wołu Bach i Killip (2, 3), nie podali jednak kryteriów czystości dla swoich preparatów. Podobnie nieustalony jest stopień oczyszczenia arginazy otrzymanej z wątroby ludzkiej przez Summerra i Manninga (58). Grassmann, Horman i Janowski (21) otrzymali z wątroby cielęcej preparat arginazy oczyszczony 270 razy, o aktywności specyficznej 5400 jednostek/mg azotu białkowego. Arginazę o aktywności 5180 jednostek/mg białka otrzymał Schimke (55) z wątroby szczura. Oba preparaty były homogeniczne elektroforetycznie oraz w ultrawirówce. Kossmann, Hintze, Lange i Menne (32), wprowadzając do preparatyki chromatografię na *CM-* i *DEAE-Sephadex*, podali bardzo wydajną metodę wyodrębniania arginazy, dzięki której otrzymali z wątroby szczura preparaty o dużej czystości. Menne, Zeidler (36) stosując podobną preparatykę wyizolowali arginazę z wątroby psa. Ponieważ warunki oznaczania aktywności oczyszczonych preparatów arginazy z różnych źródeł nie są identyczne, trudno ocenić, który z preparatów enzymatycznych jest białkiem o najwyższej czystości. Hirsch-Kolb i Greenberg (27) obliczyli, że uzyskana przez nich z wątroby szczura arginaza o aktywności 19 500 μ moli/min./mg azotu białkowego jest preparatem o najwyższym stopniu oczyszczenia, podczas gdy preparaty Schimke (55) wykazują aktywność 14 800, a Kossman i wsp. (32) — 4700.

2. *Oznaczanie aktywności.* Aktywność arginazy można oznaczać mierząc przyrost mocznika lub ornityny. Mocznik oznacza się pośrednio przez mierzenie CO_2 (1, 2) lub części NH_3 (28) powstających w wyniku działania ureazy. Bezpośrednio mocznik oznacza się kolorymetrycznie metodą ksanthydrolową (18) lub za pomocą dwuacetylomonoooksymu (1, 2, 53), α -izonitrozopropiofenonu (61) lub odczynnika Ehrlicha w modyfikacji H a g a n a i D a l l a m a (26). Przyrost ornityny oznacza się metodą C h i n a r d a (16). Do oznaczania aktywności arginazy stosuje się też spektrofotometryczną metodę W a r d a i S r e r e (62), lub metodę izotopową — polegającą na pomiarze $^{14}\text{CO}_2$ powstałego ze znakowanej argininy (14).

Za jednostkę arginazy (AU) przyjęto ilość enzymu, która w ciągu 1 minuty w temperaturze 25° , w pH 9,5, z substratu o stężeniu 0,285M uwalnia $1\mu\text{mol}$ mocznika (61).

III. Własności fizyczne i chemiczne

1. *Ciężar cząsteczkowy.* Greenberg i wsp. (24) stwierdzili, że współczynnik sedymentacji dla bardzo oczyszczonych preparatów arginazy z wątroby konia wynosi 5,95. Obliczony z S_{20} oraz współczynnika dyfuzji ciężar cząsteczkowy jest równy 138 000. Takie same wartości otrzymano dla oczyszczonych preparatów arginazy z wątroby wołu, konia i owcy (3), wątroby szczura (54) oraz wątroby psa (36). W 1968 roku Hirsch-Kolb i Greenberg (27) drogą ultrawirowania oraz ze współczynnika dyfuzji i współczynnika sedymentacji otrzymali nieco niższe wartości dla arginazy z wątroby szczura. Ich preparaty, oczyszczone w znacznym stopniu, miały ciężar cząsteczkowy 118 000. Wykazali oni ponadto, że jony Mn^{2+} , dializa wobec Co^{2+} oraz inkubacja preparatów w pH 5,9 i 8,3, tzn. w warunkach, w których zmniejsza się aktywność arginazy, nie wpływają na wartości współczynnika sedymentacji enzymu, a zatem i na jego ciężar cząsteczkowy.

Oznaczone za pomocą sączenia na *Sephadex G-100* ciężary cząsteczkowe arginazy z innych tkanek są bardzo zbliżone. Ciężar cząsteczkowy częściowo oczyszczonej arginazy z mózgu wołu (20) oraz z nerki, ślinianki i mózgu szczura (19) wynosi 120 000.

2. *Skład aminokwasowy i budowa cząsteczki.* W tablicy 3 przedstawiono skład aminokwasowy arginazy z wątroby cielęcej (21), arginazy z wątroby konia (24) oraz arginazy z wątroby szczura (27). Wszystkie trzy preparaty charakteryzuje wysoka zawartość glicyny, argininy i lizyny. Zwraca uwagę niski poziom aminokwasów siarkowych w arginazie z wątroby szczura. Tylko ślady cystyny są obecne w arginazie z wątroby konia. Cysteiny nie znaleziono w arginazie z wątroby psa (36).

G r a s s m a n n i w s p. (21) wykazali, że wysokooczyszczony preparat

Tablica 3

Skład aminokwasowy oczyszczonych preparatów arginazy według: a. (21), b. (24), c. (27)

Aminokwas	Wątroba cielęcia (a)	Wątroba konia (b)	Wątroba szczura (c)
	% azotu	% azotu	Ilość reszt/mol białka
Kwas asparaginowy	7,8	5,91	87,0
Kwas glutaminowy	7,46	7,36	87,0
Glicyna	12,6	8,52	90,0
Alanina	7,7	2,76	64,2
Seryna	6,22	5,45	60,0
Treonina	5,29	4,74	68,1
Walina	6,61	7,87	85,8
Izoleucyna	4,04	11,0	51,0
Leucyna	7,62		71,1
Feniloalanina	3,97	2,64	31,0
Histydyna	2,35	4,87	23,1
Lizyna	14,3	11,32	87,3
Arginina	12,4	11,61	32,5
Metionina	0,0	1,16	12,8
Prolina	0,0	5,56	71,1
Tryptofan	nie oznaczono	nie oznaczono	12,2
Cystyna	nie oznaczono	ślady	7,2

arginazy z wątroby cielęcej zawiera pewien procent cukru. Komponent cukrowy znaleźli również Menne i Zeidler (36) w cząsteczce arginazy z wątroby psa. Natomiast arginaza z wątroby szczura (27) nie zawiera cukru bądź tylko jego ślady.

Budowa cząsteczki arginazy nie jest dotąd poznana. Jedyne informacje na ten temat pochodzą z badań Hirsch-Kolb i Greenberga (27). Autorzy stwierdzili, że arginaza z wątroby szczura w obecności 8M mocznika dysocjuje na cztery nieaktywne podjednostki, o identycznym ciężarze cząsteczkowym równym 30 800.

3. *Ruchliwość elektroforetyczna.* Preparaty arginazy z wątroby ssaków różnią się ruchliwością oraz kierunkiem wędrówki w polu elektrycznym. Punkt izoelektryczny arginazy z wątroby cielęcej (21) jest w pH 4,05, a podczas elektroforezy bibułowej w buforze weronalowym o pH 8,6 białko wędruje w kierunku anody. Natomiast enzym z wątroby szczura podczas elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w pH 8,6 i 5,0 (55), w pH 7 (13) oraz w pH 8,3 i 8,6 (27) wędruje do katody. Białkiem kationowym, podobnie jak arginaza szczura jest enzym z wątroby ludzkiej (11).

4. *Stabilność oraz wpływ pH na aktywność enzymu.* Arginaza z wątroby ssaków w pH 6,7—7,3 (2) jest białkiem stabilnym. Oczyszczone preparaty przechowywane w tym środowisku w +4° lub -20° nie tracą

swej aktywności w czasie kilku tygodni (13, 23, 27, 55). Natomiast przechowywane w roztworach o pH poniżej 6 lub powyżej 10 tracą aktywność (2, 23). Glicyna (0,02M) i ornityna (0,0025M) stabilizują oczyszczone preparaty arginazy (23). Enzym wykazuje dużą odporność na podwyższoną temperaturę. Arginaza z wątroby konia w pH 7,5, w obecności jonów Mn^{2+} i w temperaturze 70° dopiero po 177 minutach traci połowę aktywności (24), natomiast enzym z wątroby szczura ulega denaturacji w temperaturze 55° (25).

Optimum pH arginazy z wątroby ssaków wynosi 9,2—10,4 (3, 22, 33, 51, 56), przy pH poniżej 7 i powyżej 10 aktywność enzymu gwałtownie spada. Optimum zależy w znacznym stopniu od aktywującego kationu i przesuwa się ku niższym wartościom pH , gdy jon Mn^{2+} jest zastąpiony przez jony Ni^{2+} i Co^{2+} (23). Arginaza w wyciągach z mózgu szczura i człowieka (45) oraz w wyciągach z nerki, ślinianki i mózgu szczura (19) wykazuje dwa optima pH , jeden przy 7,0—7,5 oraz drugi przy 9,5.

5. *Aktywacja jonami metali dwuwartościowych.* Jony Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} i Ni^{2+} aktywują arginazę z wielu źródeł (24, 37, 47, 51) oraz stabilizują ją podczas ogrzewania w podwyższonej temperaturze (24). Proces aktywacji jest skomplikowany i zależy od wielu czynników jak pH , temperatura, stężenie jonów metalu oraz od rodzaju tkanki i gatunku zwierzęcia.

Roché i wsp. (49, 50) wykazali, że zwiększenie stężenia jonów Mn^{2+} powyżej pewnej wartości nie wpływa na aktywność arginazy, natomiast Ni^{2+} i Co^{2+} powodują jej obniżenie.

Proces aktywacji przez metale nie jest ostatecznie wyjaśniony i wymaga dalszych badań. Dotychczasowe obserwacje wskazują, że rodzaj łączenia jonów metalu z enzymem może być różny u różnych gatunków zwierząt (42). Palacios i wsp. (42) na podstawie badań nad arginazą z wątroby aksolotla uważają, że istnieją dwa różne kompleksy enzymu z jonami metalu: jeden warunkujący stabilność białka, drugi — własności katalityczne.

6. *Specyficzność.* Arginaza jest enzymem o dużej specyficzności substratowej (22, 23, 38). Hydrolizuje L-argininę i tylko w nieznacznym stopniu L-kanawaninę (23). Wolna grupa karboksylowa, wolna grupa guanidynowa oraz odpowiednia długość łańcucha węglowego w granicach czterech jednostek $-CH_2$ są niezbędne do działania arginazy (48). Fosfoarginina, N-metyloarginina, estry metylowe i etylowe oraz guanidynowe analogi jak kwas β -guanidynopropionowy, γ -guanidynomasłowy, δ -guanidynowalerianowy nie są hydrolizowane przez enzym (23, 48).

7. *Powinowactwo enzymu do substratu.* Wartości stałej Michaelisa w dużym stopniu zależą od pH oraz obecności dwuwartościowych jonów metali. Dla arginazy z większości źródeł stwierdzono największe powinowactwo do argininy w obecności jonów Mn^{2+} w przedziale pH 8,5—9,6;

w *pH* niższym i wyższym wartości K_m były wyższe (2, 3). Stałe Michaelisa oznaczane w optymalnych warunkach wynoszą 2,5—4,5mM dla arginazy z wątroby konia (24), 7mM dla arginazy wołu, owcy i konia (3) oraz 2,4mM dla enzymu z wątroby szczura (54). Mora i wsp. (40) porównując K_m arginazy z wątroby kilku ureotelicznych kręgowców ustalili, że wartości ich wynoszą od 6 do 40mM. Podobne powinowactwo do argininy wykazuje arginaza z innych tkanek. Dla enzymu z nerki, ślinianki i mózgu szczura (19) oraz mózgu wołu (20) K_m wynosi od 5 do 7mM (tablica 4).

Arginina w stężeniach ponad 170mM hamuje aktywność arginazy z wątroby ssaków (19, 39). Jednak wpływ argininy na aktywność enzymu nie jest dostatecznie zbadany.

Tablica 4

Stałe Michaelisa arginazy z tkanek szczura (14)

Tkanka	K_m (mM)
Wątroba	5,0±0,52
Nerka	4,0±0,45
Ślinianka podszczękowa	3,6±0,35
Mózg	6,7±0,54

Aminokwasy zasadowe: lizyna i ornityna hamują arginazę z wielu źródeł (13, 15, 19, 20, 29, 39, 40). Jony Cu^{2+} , Zn^{2+} i Ag^+ oraz bufor cytrynianowy i boranowy (23) są inhibitorami enzymu.

IV. Arginaza z innych tkanek ureotelicznych kręgowców

Arginaza z innych tkanek poza wątrobą nie jest dobrze poznana. Nie otrzymano dotąd żadnego preparatu dostatecznie oczyszczonego. Dlatego też nie wiadomo dotychczas, czy arginaza z innych tkanek, nie biorąca bezpośrednio udziału w procesie ureogenezy, ma identyczne właściwości jak enzym z wątroby.

Częściowo oczyszczone preparaty arginazy z krwinek czerwonych człowieka wykazują optimum *pH* oraz powinowactwo do argininy takie samo jak arginaza z wątroby ludzkiej (9). Gąsiorowska i wsp. (20) badając arginazę z mózgu wołu oraz z nerki, ślinianki i mózgu szczura (19) wykazali, że podobnie jak arginaza z wątroby szczura, jest ona aktywowana jonami Mn^{2+} , jej powinowactwo do argininy jest tego samego rzędu, a K_m mieści się w granicach od 5 do 7mM (tablica 4). Enzym z tych tkanek jest hamowany aminokwasami zasadowymi, lizyną i ornityną, a jego przybliżony ciężar cząsteczkowy wynosi 120 000. Arginaza z róż-

nych tkanek różni się stabilnością, najszybciej ulegają denaturacji preparaty z mózgu wołu i mózgu szczura.

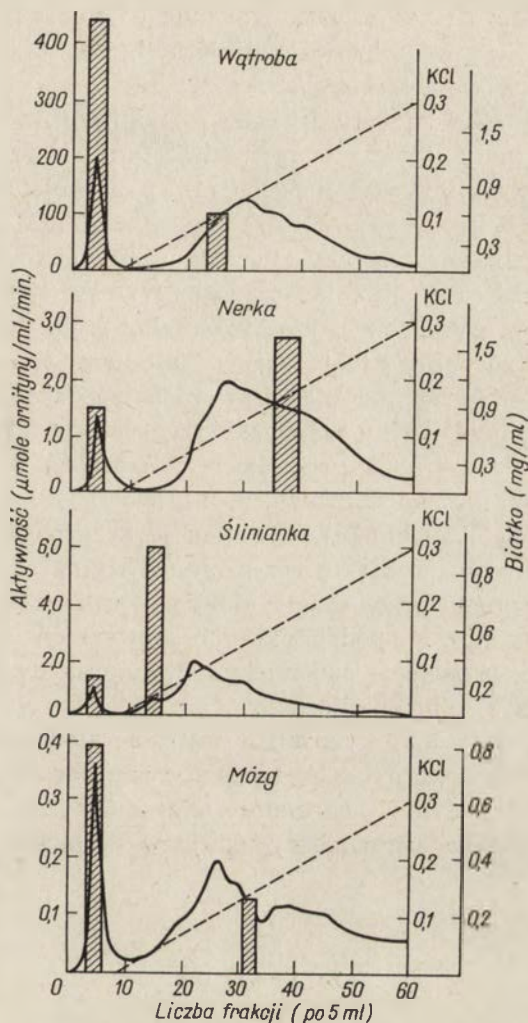
8. *Izoenzymy arginazy w tkankach ssaków.* Tylko w nielicznych pracach sygnalizowano heterogenność arginazy. Kalab i Pelican (30) po podaniu owcy i szczurom czterochlorku węgla, wykazali za pomocą elektroforezy na żelu agarowym sześć aktywnych frakcji arginazy w surowicy szczura oraz jedną, lecz odmienną od nich, frakcję w surowicy owcy. Baret i wsp. (4) stwierdzili obecność dwu form arginazy w wątrobie, nerce i jelicie ryby *Raja clavata*. W 1965 roku Cabello i wsp. (11) zaobserwowali, że częściowo oczyszczone preparaty arginazy z wątroby i czerwonych krwinek człowieka podczas elektroforezy na żelu agarowym w pH 8,6 rozdzielały się na dwa składniki, różniące się ruchliwością i właściwościami immunochemicznymi. Fakt ten potwierdziły późniejsze badania Bascur i wsp. (5), którzy za pomocą chromatografii na CM-celulozie stwierdzili obecność dwu form arginazy w wątrobie ludzkiej.

Gąsiorowska i wsp. (20) wykazali obecność dwu izoenzymów arginazy w mózgu wołu oraz czterech różnych izoenzymów w wątrobie, nerce, śliniance i mózgu szczura. Autorzy (19) stwierdzili, że w każdej z badanych przez nich tkanek szczura występują dwie frakcje arginazy (rysunek 1). Frakcja pierwsza była obecna w każdej tkance, lecz jej aktywność stanowiła różny procent ogólnej aktywności arginazy, natomiast druga frakcja była dla każdej tkanki szczura odmienna i charakterystyczna. Ciężar cząsteczkowy białka każdej z frakcji wynosi 120 000, co wskazuje, że nie są to aktywne podjednostki enzymu.

Izoenzymy arginazy z tkanek szczura mają podobne powinowactwo do substratu, różnią się natomiast stabilnością oraz odmiennym sposobem hamowania przez aminokwasy zasadowe, lizynę i ornitynę. Występowanie izoenzymów arginazy w tkankach wielu ssaków potwierdziły badania Porembskiej i wsp. (dane nieopublikowane), którzy wykazali ich obecność w wątrobie i nerce psa, kota, królika, wołu, świni, świnki morskiej, konia, cielęcia oraz wątrobie, nerce, śliniance podzuchwowej, mięśniu sercowym, mięśniu gładkim oraz krwinkach czerwonych człowieka. Porembska i Kędra (44) ustaliły, że pojawianie się aktywności arginazy w surowicy chorych może być dogodnym testem diagnostycznym we wczesnym rozpoznaniu zawału mięśnia sercowego.

V. Arginaza z tkanek urikotelicznych kręgowców

Przez wiele lat panował powszechnie pogląd, że arginaza występuje tylko u zwierząt ureotelicznych. Stosując mało czułe metody nie znaleziono jej w tkankach urikotelicznych kręgowców. Przyczyną niepowo-



Rys. 1. Izoenzymy arginazy w tkankach szczura (19)

▨ — aktywność, — — — białko

dzeń był również fakt, że nie oznaczano jej w optymalnych warunkach oraz badano u tych gatunków zwierząt urikotelicznych, które charakteryzuje najniższa aktywność enzymu.

W ciągu ostatnich dziesięciu lat znaleziono arginazę w wielu tkankach urikotelicznych kręgowców. Brown i Cohen (7) wykazali obecność enzymu w wątrobie jaszczurki i aligatora, Bunatian i Davtian (8) — w mózgu kurczęcia, Tamir i Ratner (59) w wątrobie i mózgu kurczęcia, a Mora i wsp. (40) w wątrobie jaszczurki i węża. Brown (6) badał arginazę w wątrobie ptaków różnych gatunków i stwierdził duże

różnice aktywności: na przykład w wątrobie gołębia aktywność arginazy wynosiła 0,26 μ mola powstałego mocznika na 1g tkanki, w wątrobie kurczęcia 4 μ mole, a w wątrobie zimorodka 220 μ moli.

Mora i wsp. (40) badając arginazę w wątrobie zwierząt ureotelicznych i urikotelicznych podali, że wartości K_m arginazy z wątroby kurczęcia, jaszczurki i węża wynoszą 100—200 mM i są około 10-krotnie wyższe od K_m arginazy z wątroby zwierząt ureotelicznych (6mM—40mM). Stwierdzili także, że arginaza z wątroby zwierząt ureotelicznych jest hamowana przez nadmiar substratu, natomiast zjawiska tego nie obserwowali w przypadku arginazy z wątroby zwierząt urikotelicznych. Enzym ten, w odróżnieniu od arginazy z wątroby szczura, jest hamowany przez *p*-chlorortęciobenzoesan, a merkaptoetanol przywraca jego aktywność (39). Arginaza zwierząt urikotelicznych ma ciężar cząsteczkowy 276 000, czyli dwukrotnie wyższy od arginazy ureotelicznej. Arginaza z wątroby ssaków (człowieka, małpy, psa, kota, krowy, świni, owcy) (40) — cytują dane nie publikowane za R. T. Schimke) daje reakcje krzyżowe z przeciwciałami królika skierowanymi przeciwko oczyszczonej arginazie z wątroby szczura. Natomiast reakcji precypitacji nie daje arginaza z wątroby jaszczurki i kurczęcia (40). Na podstawie tych spostrzeżeń Mora i wsp. (40) przypuszczają, że w świecie zwierzęcym występują dwa rodzaje arginazy: „ureoteliczna” i „urikoteliczna”.

Rossi i Grazi (52) wykazali w wątrobie głodzonych kurcząt arginazę o cechach ureotelicznych. Autorzy nie znajdowali jej nigdy w wątrobie kurcząt odżywianych normalnie. Natomiast nie ustalono dotychczas, czy urikoteliczna arginaza występuje w tkankach zwierząt ureotelicznych.

LITERATURA

1. Archibald R. M., *J. Biol. Chem.* **157**, 507 (1945).
2. Bach S. J., Killip J. D., *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 273 (1958).
3. Bach S. J., Killip J. D., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 336 (1961).
4. Baret R., Mourgre M., Pellegrin J., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **160**, 1796 (1966).
5. Bascur L., Cabello J., Veliz M., Gonzalez A., *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 149 (1966).
6. Brown G. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **114**, 184 (1966).
7. Brown G. W. Jr., Cohen P. P., *Biochem. J.* **75**, 82 (1960).
8. Buniatian H. Ch., Davtian M. A., *J. Neurochem.* **13**, 743 (1966).
9. Cabello J., Basilio C., Prajoux V., *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 148 (1961).
10. Cabello J., Prajoux V., Basilio C., Plaza M., *Comp. Biochem. Physiol.* **6**, 111 (1962).
11. Cabello J., Prajoux V., Plaza M., *Biochim. Biophys. Acta* **105**, 583 (1965).
12. Campell J. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 448 (1961).

13. Campbell J. W., *Comp. Biochem. Physiol.* **18**, 179 (1966).
14. Carulli N., Kaihara S., Wagner H. N. Jr., *Analyt. Biochem.* **24**, 515 (1968).
15. Castaneda M., Martuscelli J., Mora J., *Biochim. Biophys. Acta* **141**, 276 (1967).
16. Chinard F. P., *J. Biol. Chem.* **199**, 91 (1952).
17. Dixon M., Webb E. C., w *Enzymes*, Longmans, Green i Co. Ltd, Londyn 1964, str. 642.
18. Engle H., Engle F., *J. Biol. Chem.* **167**, 535 (1946).
19. Gąsiorowska I., Poremska Z., Jachimowicz J., Mochna-cka I., *Acta Biochim. Polon.* **17**, 19 (1970).
20. Gąsiorowska I., Poremska Z., Mochna-cka I., *Acta Biochim. Polon.* **16**, 175 (1969).
21. Grassman W., Hormann H., Jankowski O., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **312**, 273 (1958).
22. Greenberg D. M., *The Enzymes*, red. J. B. Summer i K. Myrback, Academic Press, New York 1951, t. 1, str. 893.
23. Greenberg D. M., w *The Enzymes*, red. E. D. Boyer, H. Lardy i K. Myrback, Academic Press, New York 1960, t. 4, str. 257.
24. Greenberg D. M., Bagot A. E., Roholt O. A. Jr., *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 446 (1956).
25. Greenberg D. M., Mohamed M. S., *Arch. Biochem.* **8**, 365 (1945).
26. Hagan I. J., Dallam R. D., *Anal. Biochem.* **22**, 518 (1968).
27. Hirsch-Kolb H., Greenberg D. M., *J. Biol. Chem.* **243**, 6123 (1968).
28. Hunter A., Dauphinnee J., *J. Biol. Chem.* **85**, 627 (1929).
29. Hunter A., Downs C. E., *J. Biol. Chem.* **157**, 427 (1945).
30. Kalab M., Pelikan V., w *Abstracts Sixth International Congress of Biochemistry*, New York 1964, tom 4, 81, str. 315.
31. Kochakian C. D., Endahl B. R., Hall H. D., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **89**, 289 (1955).
32. Kossmann K. T., Hintze R., Lange K., Menne F., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **346**, 163 (1966).
33. Kossmann K. T., Lange K., Menne F., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **335**, 250 (1964).
34. Lange K., Kossmann K. T., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **335**, 229 (1964).
35. Menne F., Kossmann K. T., Lange K., *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **332**, 314 (1963).
36. Menne F., Zeidler B., *Herbattagung der Gesellschaft für Biologische Chemie Bd.* 349 (1968).
37. Mohamed M. S., Greenberg D. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **8**, 349 (1945).
38. Mora J., Martuscelli J., Ortiz-Pineda J., Soberon G., *Biochem. J.* **96**, 28 (1965a).
39. Mora J., Tarrab J., Bojail L. F., *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 206 (1966).
40. Mora J., Tarrab R., Martuscelli J., Soberon G., *Biochem. J.* **96**, 588 (1965b).
41. Olomucki A., Verrier J. M., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **37**, 1353 (1955).
42. Palacios R., Huitron C., Soberon G., *Biochem. J.* **114**, 449 (1969).
43. Poremska Z., Gąsiorowska I., Mochna-cka I., *Acta Biochim. Polon.* **15**, 171 (1968).

44. Porembaska Z., Kędra M., *Bull. Acad. Polon. Sci.* **18**, 137 (1970).
45. Ratner S., Morrell H., Carvalho E., *Arch. Biochem. Biophys.* **91**, 280 (1960).
46. Richards M. M., Hellerman L., *J. Biol. Chem.* **134**, 237 (1940).
47. Robbins K. C., Shields J., *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 63 (1956).
48. Roche J., w *Biochimie Comparée des Acides Basiques. Colloques int. Cent. natn. Rech. Scient.* **92**, 221 (1960).
49. Roche J., Nguyen-van-Thoai, Verrier J., *Compt. Rend. Acad. Sci* **236**, 1435 (1954).
50. Roche J., Nguyen-van-Thoai, Verrier J., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **148**, 782 (1954).
51. Roholt O. A. Jr., Greenberg D. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 454 (1956).
52. Rossi N., Grazi E., *European J. Biochem.* **7**, 348 (1969).
53. Satoh P. S., Yohei Ito., *Anal. Biochem.* **23**, 219 (1968).
54. Schimke R. T., *J. Biol. Chem.* **237**, 459 (1962).
55. Schimke R. T., *J. Biol. Chem.* **239**, 3808 (1964).
56. Schimke R. T., Brown M. B., Smallnam E. T., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **102**, 587 (1963).
57. Sporn M. D., Dingman W., Defalco A., Davies R. K., *J. Neurochem.* **5**, 62 (1959).
58. Summer D., Manning R. T., *Nature* **207**, 79 (1965).
59. Tamir H., Ratner S., *Arch. Biochem. Biophys.* **102**, 249 (1963).
60. Tomilson S., Westall R. G., *Nature* **188**, 235 (1960).
61. Van Slyke D. D., Archibald R. M., *J. Biol. Chem.* **165**, 293 (1946).
62. Ward R. L., Srere P. A., *Anal. Biochem.* **18**, 102 (1967).

KAZIMIERZ KLECZKOWSKI *

Wykorzystanie mocznika przez organizmy nie zawierające ureazy

Urea Utilisation by the Urease-Free Organisms

Some suggestions concerning the utilisation of urea by organisms in which no urease has been detected were reviewed.

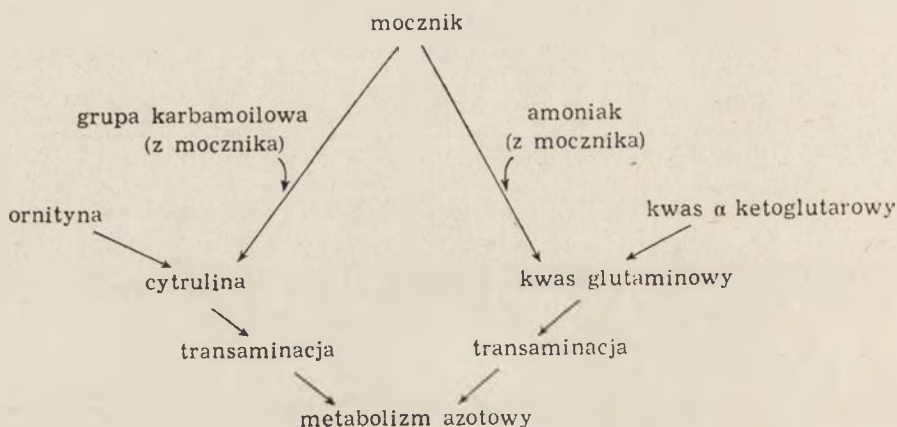
W ostatnich latach ukazało się szereg publikacji dotyczących wykorzystania mocznika przez wiele gatunków drożdży i jednokomórkowych glonów, w których nie wykryto aktywności ureazy (1, 3, 5, 7, 9, 14, 16, 31). Brak aktywności ureazy w bezkomórkowych wyciągach roślin tłumaczy się często obecnością naturalnych inhibitorów tego enzymu (4, 18, 23, 24). Spostrzeżenia te jednak nie odnoszą się do tych gatunków drożdży i jednokomórkowych glonów, u których nie wykryto aktywności ureazy mimo stosowania różnych metod frakcjonowania, między innymi chromatografii kolumnowej.

Na podstawie wyników dotychczasowych badań wysuwa się przypuszczenia i hipotezy o mechanizmie wykorzystania mocznika przez organizmy nie zawierające ureazy. Walker (31), a za nim Thomas i Krauss (28), Hattori (10), Bollard (2) oraz Nandi (19) przypuszczają, że mocznik mógłby być włączany do metabolizmu azotowego komórki, jeśli przemiany cyklu ornitynowego byłyby odwracalne. Zgodnie z tymi założeniami proces ten powinien się w zasadzie rozpoczynać od kondensacji mocznika z ornityną z wytworzeniem argininy. W ten sposób usiłowano tłumaczyć znaczne nagromadzenie się argininy w komórkach organizmów rosnących na moczniku jako jedynym źródle azotu (6, 19). Powyższy przebieg reakcji jest jednak mało prawdopodobny, ponieważ rozpad argininy na mocznik i ornitynę katalizuje arginaza, należąca do hydrolaz, a tego typu przemiany znane są jako nieodwracalne.

Dane doświadczalne zarówno Katinga (14) na *Torulopsis utilis* z zastosowaniem ^{14}C -mocznika, jak również Hattori (11) na *Chlorella vulgaris* wskazują na nieznaczne tylko włączanie ^{14}C z mocznika do argininy w porównaniu z włączaniem do innych aminokwasów.

* Prof. dr, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

Kating (14) hodując *Torulopsis utilis* na ^{14}C -moczniku znalazł najwyższą właściwą aktywność w cytrulinie. Na tej podstawie, autor przypuszcza, że mocznik jest wykorzystywany przez *Torulopsis utilis* w sposób



Schemat 1. Wykorzystanie mocznika przez *Torulopsis utilis* wg Katinga (14)

przedstawiony na schemacie 1. Schemat ten, jakkolwiek bardzo ciekawy, nie znalazł jednak eksperymentalnego potwierdzenia.

Eckert i wsp. (6) badając wpływ różnych związków zawierających azot na aktywność enzymów cyklu ornitynowego u *Torulopsis utilis* stwierdzili znaczną represję syntezy arginazy w obecności mocznika jako jedyne go źródła azotu w pożywce. Spostrzeżenie to może tłumaczyć zjawisko nagromadzania argininy w komórkach.

W wyniku dalszych badań Hattori (11) zmienił swój pogląd (10) na wykorzystywanie mocznika przez glon *Chlorella*. Przypuszcza on, że w tych glonach występuje akceptor A, dotychczas niezidentyfikowany, który reaguje z wolnym amoniakiem lub też z grupą aminową mocznika dając hipotetyczny związek $A-(\text{NH}_2)_2$.

Walentine i Wolfe (30) badając przemianę allantoiny w ekstraktach ze *Streptococcus allantoicus* stwierdzili, że ekstrakty te rozkładają fosforolitycznie lub arsenolitycznie mocznik na karbamoilofosforan i kwas oksaminowy. Kofaktorami tej przemiany są NAD, Mg i fosforan lub arsenian. Pochodne mocznika jak metylomocznik, etylomocznik i tiomocznik nie są substratami w wyżej wymienionej przemianie. Autorzy nie stwierdzili bezpośredniej fosforolizy mocznika i przypuszczali, że mocznik łączy się z aldehydową resztą kwasu glioksalowego tworząc glioksalomocznik, który przekształca się w kwas karbamoilooksaminowy, a następnie rozkłada na karbamoilofosforan i kwas oksaminowy (schemat 2).

Dużą zawartość ^{14}C w hydantoinie po 0,5 i 1 minucie inkubacji tłumaczą autorzy łatwością nieenzymatycznego zamykania pierścienia kwasu hydantoinowego z utworzeniem hydantoiny.

Tablica 1

Zmiany radioaktywności (imp./min) aminokwasów i pochodnych hydantoiny w zależności od czasu inkubacji komórek *Candida flareri* z ^{14}C , -mocznikiem według Cooka i Boultera (3)

Badany związek	Czas inkubacji w minutach					
	0,5	1	2	6	10	20
Kwas asparaginowy	śl.	śl.	326	290	508	76
Kwas glutaminowy	śl.	śl.	54	906	924	622
Kwas argininobursztynowy	śl.	28	92	966	1172	500
Asparagina	śl.	śl.	96	101	54	44
Treonina	0	0	18	226	260	166
Glutamina	0	0	0	112	130	śl.
Cytrulina	12	48	91	1986	1176	326
Kwas γ -aminomasłowy	śl.	62	śl.	śl.	śl.	śl.
Arginina	0	18	20	46	134	112
Prolina	0	0	0	śl.	40	34
Izoleucyna	0	0	0	śl.	22	12
Ornityna	śl.	14	22	0	0	0
Kwas karbamoiloasparaginowy	15	61	181	756	412	215
Kwas hydantoino-5-octowy	śl.	śl.	20	137	28	15
Kwas hydantoinowy	150	164	76	11	śl.	0
Hydantoina	125	131	72	0	0	0

* śl. — mniej niż 10 imp./min

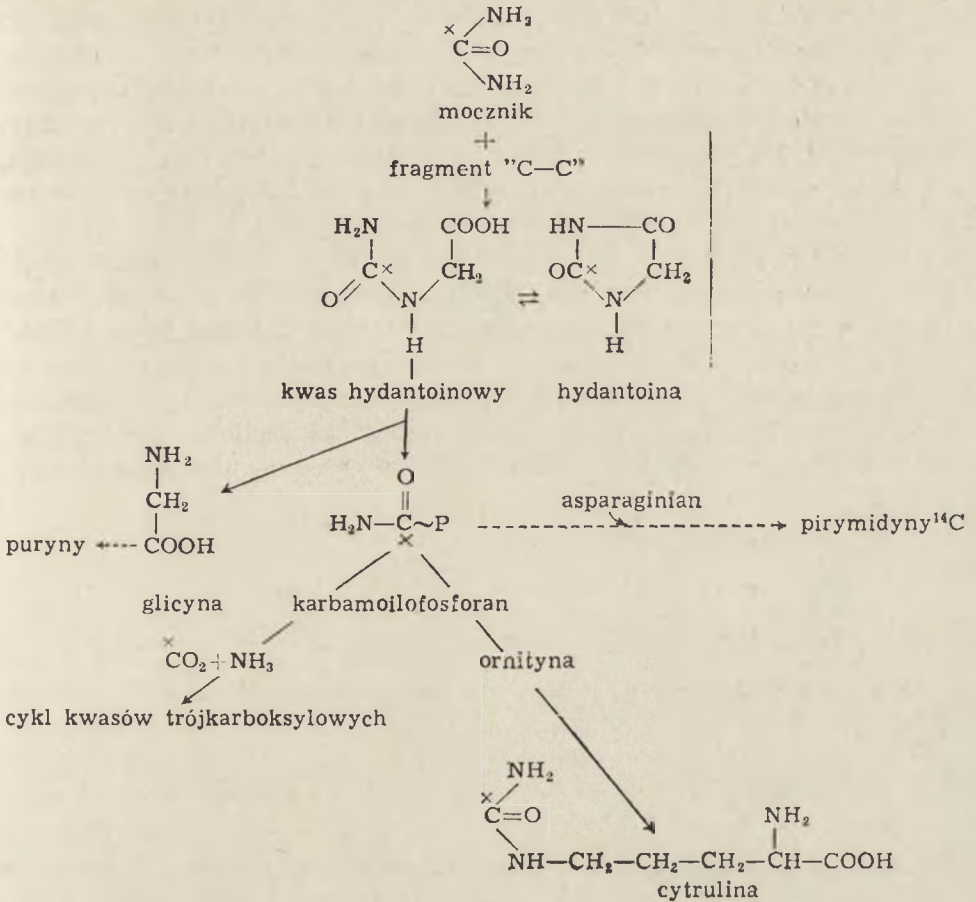
Nie stwierdzono aktywności w Gli, Ser, Ala, Wal, Tyr, Fen, His i Liz

Cook i Boulter (3) przypuszczają, że z mocznika i nieznanego dwuwęglowego fragmentu powstaje kwas hydantoinowy, który z kolei rozpada się na karbamoilofosforan i glicynę. Grupa ureidowa karbamoilofosforanu może być przeniesiona na ornitynę lub asparaginian albo ulegać rozkładowi do CO_2 i amoniaku. Hipotezę autorów przedstawia schemat 3. Przypomina on w pierwszym swoim etapie kondensację mocznika z kwasem glioksalowym (również dwuwęglowy związek) (schemat 3) w procesie degradacji allantoiny przez *Streptococcus allantoicus* (29).

Roon i Levenberg (26) nie zdołali potwierdzić *in vitro* żadnego z ogniw proponowanego przez Cooka i Boultera (3) schematu włączania mocznika do metabolizmu komórkowego u *Candida utilis*.

Wszystkie omówione wyżej prace z wyjątkiem prac Valentine'a i Wolfe'a (30) przeprowadzono na żywych komórkach, a zatem wnioski wyciągnięte z tych badań należy w zasadzie traktować jako mniej lub bardziej udokumentowane hipotezy.

Furutani i wsp. (8) badając wykorzystywanie mocznika przez pachnotkę ogrodową (*Perilla frutescens*, Britton) wykazali redukcję NAD



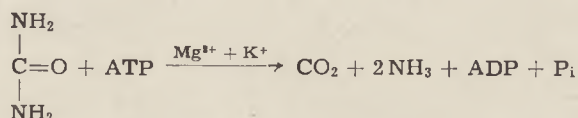
Schemat 3. Synteza karbamoilofosforanu z mocznika u *Candida flareri* wg Cooka i Boultera (3)

lub NADP w obecności mocznika jako substratu przez preparat z tych roślin. Enzym katalizujący tę reakcję nazwano dehydrogenazą mocznikową, w odróżnieniu od dehydrogenazy amonowej, która ma inne optimum *pH* i inną wrażliwość na aktywatory i inhibitory. Aktywność dehydrogenazy mocznikowej wykryto również w tkankach zwierzęcych (20, 21). O m u r a i wsp. (22) po uzyskaniu z liści pachnotki częściowo oczyszczonego preparatu enzymatycznego podjęli próbę zbadania mechanizmu katalizowanej reakcji oraz identyfikacji jej produktu. Aktywujące działanie na redukcję NAD lub NADP przez mocznik wywierają nieorganiczne fosforany w małych ilościach. Fosforany wykazują to działanie tylko w przypadku mocznika jako substratu, natomiast hamują dehydrogenazę amonową. Podobny efekt wykazują związki flawinowe. Zarówno ATP, ADP, jak i AMP nie wpływają na szybkość redukcji NADP w obecności mocznika jako substratu (22).

O m u r a i wsp. (22), mimo uzyskania stosunkowo wyczerpujących

danych o aktywatorach i inhibitorach dehydrogenazy mocznikowej, nie zidentyfikowali produktu tej przemiany. Stwierdzili jedynie, że synteza znakowanych związków z ^{14}C -mocznika zwiększa się po dodaniu ornityny do mieszaniny inkubacyjnej, a asparaginian i bursztynian nie wykazują tego efektu. Na podstawie przytoczonych danych autorzy przypuszczają, że nie rozłożony przez ureazę mocznik w obecności dehydrogenazy mocznikowej może być wykorzystany do syntezy argininy.

W 1968 roku Roon i Levenberg (26) w krótkim komunikacie podali bardzo ciekawy schemat rozkładu mocznika na amoniak i dwutlenek węgla, katalizowanego przez preparaty z *Candida utilis* i *Chlorella utilis*. Do badań kinetycznych autorzy używali częściowo oczyszczonych preparatów z *Candida utilis*, hodowanych na moczniku jako jedynym źródle azotu. Okazało się, że rozkład mocznika zachodzi przy udziale ATP oraz jonów Mg^{2+} i K^+ , prawdopodobnie według następującej reakcji:

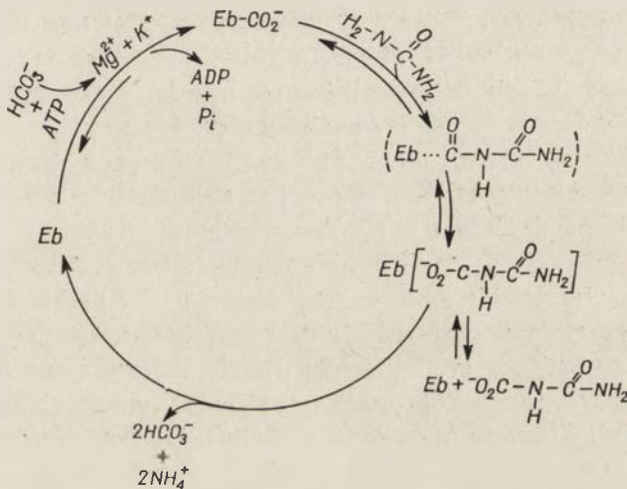


Enzym katalizujący tę przemianę nazwano amidoliazą ATP:mocznik (ADP). Mechanizm rozkładu mocznika przez ten enzym jest jednostopniowy i uzależniony od obecności ATP. Roon i Levenberg (26) przypuszczają, że ATP jest w tej przemianie donatorem energii i może uczestniczyć w bezpośrednim przenoszeniu grup $-\text{NH}_2$ mocznika najpierw na odpowiednie ugrupowanie łańcucha białkowego enzymu, a potem na właściwy akceptor, na przykład α -ketoglutaran lub kwas glutaminowy. Jeśli środowisko nie zawiera akceptora, aminowana reszta łańcucha białkowego enzymu ulega hydrolizie i uwalnia się amoniak. W tym przypadku końcowym produktem przemiany, podobnie jak w reakcji katalizowanej przez ureazę, jest amoniak i dwutlenek węgla. Inną interesującą możliwością wiążą autorzy (26) z udziałem biotyny. Okazało się bowiem, że dodanie do mieszaniny inkubacyjnej $4\ \mu\text{g}/\text{ml}$ awidyny powoduje zahamowanie badanej przemiany w 44%, a $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ hamuje ją w 100%. Dodatek biotyny po wprowadzeniu awidyny do mieszaniny inkubacyjnej nie znosi inhibicji. Jeśli natomiast biotynę doda się przed awidyną, szybkość reakcji nie ulega zmianie. Na tej podstawie autorzy wnioskują, że aktywność badanego enzymu uwarunkowana jest obecnością biotyny, która pełniłaby rolę koenzymu.

Atom węgla mocznika mógłby być bezpośrednio przenoszony w postaci związanej z biotyną, prawdopodobnie w formie grupy karbamoilowej, na nieznanego akceptor. Nie udało się jednak wykazać syntezy karbamoilofosforanu; po dodaniu do mieszaniny inkubacyjnej karbamoilotransferazy ornitynowej i ornityny, jako akceptora grupy karbamoilowej karbamoilo-

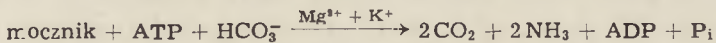
fosforanu, nie odnaleziono ^{14}C znakowanego mocznika w grupie ureidowej cytruliny.

Ostatnio Roon i Levenberg (27) oraz Whitney i Cooper (32) wykazali, że reakcja katalizowana przez amidoliazę ATP:mocznik (ADP) zachodzi tylko w obecności kwaśnego węgla, co potwierdziło przypuszczenie (26), że biotyna jest częścią składową tego enzymu. Według uzupełnionego schematu (schemat 4) pierwszą reakcją w procesie rozkładu mocznika jest karboksylacja biotyny z udziałem kwaśnego węgla w obecności ATP, Mg^{2+} i K^+ , a następnie zaktywowany kompleks CO_2 -biotyna-enzym przyłącza mocznik. W dalszym etapie z kompleksu uwalnia się karboksylo-N-mocznik (kwas allofanowy), który jako nietrwały rozpada się na węglan i amoniak. Węglan jest zatem zarówno jednym z substratów, jak i jednym z produktów tej przemiany i stąd wnioskuje się, że pełni on rolę autokatalityczną.



Schemat 4. Rozkład mocznika przy udziale amidolazy, ATP:mocznik (ADP) z *Candida utilis* wg Roon i Levenberg (27)

Whitney i Cooper (32) przedstawiają następująco rozszerzony, sumaryczny przebieg reakcji rozkładu mocznika pod wpływem amidolazy:



Ciężar cząsteczkowy amidolazy ATP:mocznik (ADP) z *Candida utilis*, oznaczony metodą sączenia na żelu *Sepharoza 4B* (27) wynosi około 600 000. Przypuszcza się (27), że enzym ten składa się z kilku podjednostek, z których przynajmniej jedna związana jest z biotyną.

Thompson i wsp. (1, 12) od szeregu lat badają metabolizm mocznika u glonu *Chlorella vulgaris*. Jak wiadomo organizm ten również nie wykazuje aktywności ureazy. Glon *Chlorella* hodowano na pożywce o nis-

kiej zawartości azotu (25). Komórki w stanie głodu azotowego z 10—30-dniowych kultur zbierano, odwirowywano, przemywano i zawieszano w pożywce zawierającej znakowany ^{14}C mocznik jako jedyne źródło azotu. Tak przygotowane zawiesiny inkubowano od 0—60 minut w 25° , a następnie komórki ekstrahowano 80% etanolem i przeprowadzano identyfikację chromatograficzną związków karbamoilowych (13). Nie stwierdzono znaczącego znakowania ^{14}C tych związków, co zdaniem autorów wyklucza bezpośrednie włączanie ^{14}C -mocznika do metabolizmu azotowego bez uprzedniego rozkładu na dwutlenek węgla i amoniak. Autorzy sugerują, że rozkład mocznika u *Chlorella* przebiega inaczej niż jego rozkład pod wpływem ureazy i zależy od energii (prawdopodobnie w postaci ATP). Sugestia ta pokrywa się z danymi przytoczonymi przez R o n a i L e v e n - b e r g a (26) dla preparatu z *Candida utilis* i z *Chlorella vulgaris*.

W naszym Zakładzie rozpoczęto badania nad wykorzystaniem mocznika przez drożdże *Torulopsis utilis*. Ta odmiana drożdży nie zawiera śladów aktywności ureazy (12) i może być idealnym materiałem do tego typu badań, ponieważ rośnie bardzo dobrze na moczniku jako jedynym źródle azotu. We wstępnej fazie badań wykazano, że otrzymany preparat enzymatyczny zawiera jedynie śladową aktywność syntezy karbamoilofosforanowej przy udziale zarówno L-glutaminy jak i jonów amonowych jako donatorów grupy aminowej. W obecności mocznika, ATP i 3-fosfoglicerynianu preparat ten syntetyzuje nieznany związek ureidowy. Dodatek do mieszaniny inkubacyjnej ornityny i karbamoilotransferazy ornitynowej zwiększa tylko nieznacznie syntezę tego związku. Na podstawie identyfikacji za pomocą chromatografii bibułowej przypuszczano, że między innymi produktem badanej przemiany jest karbamoilofosforan (15). W późniejszych badaniach okazało się, że ^{14}C z mocznika włącza się w śladowych ilościach do cytruliny, a prawie całą radioaktywność można odnaleźć w nieznanym związku ureidowym o nieco mniejszym R_f w układzie n-propanol:woda (64:36) od R_f mocznika (Kleczkowski — dane nie opublikowane). Jeśli mocznik przed dodaniem do mieszaniny inkubacyjnej rozłożono ureazą, nie stwierdzono śladów syntezy ureidowego produktu. Gdy ureazę dodawano razem z mocznikiem do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej wszystkie pozostałe składniki, aktywność enzymatyczna spadała do około 10% w porównaniu z próbami bez ureazy (15). Pomińcie w mieszaninie inkubacyjnej 3-fosfoglicerynianu obniża syntezę ureidowego związku do poziomu kontroli (termicznie inaktywowany preparat enzymatyczny z kompletem składników). Obecnie prowadzi się badania nad identyfikacją produktu, względnie produktów badanej przemiany.

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa dotyczącego badań nad mechanizmem wykorzystania mocznika przez organizmy nie zawierające ureazy należy przyjąć, że istnieje inna droga pozwalająca na włączanie mocznika do metabolizmu azotowego komórki.

Zarysowują się następujące możliwości:

- a) włączanie mocznika w reakcjach przebiegających w przeciwnym kierunku niż reakcje cyklu ornitynowego (2, 11, 19, 28, 31),
- b) wiązanie mocznika z nieznanym akceptorem A z utworzeniem hipotetycznego związku A-(NH₂)₂ (10),
- c) przyłączanie grupy karbamoilowej mocznika do ornityny (14), prawdopodobnie poprzez karbamoilofosforan, z utworzeniem cytruliny (schemat 1),
- d) fosforolityczny lub arsenolityczny rozkład zredukowanego produktu kondensacji mocznika z glioksalanem do karbamoilofosforanu (schemat 2) (30),
- e) kondensacja mocznika z nieznanym fragmentem dwuwęglowym do kwasu hydantoinowego i dalsza przemiana w karbamoilofosforan i glicynę (3) (schemat 3),
- f) odwodorowanie mocznika z utworzeniem nieznanego produktu przy udziale NAD lub NADP w obecności dehydrogenazy mocznikowej (8, 20, 21, 22),
- g) rozkład mocznika na amoniak i dwutlenek węgla przez amidolizazę ATP:mocznik (ADP) (26, 27),
- h) wiązanie mocznika z nieznanym akceptorem z utworzeniem niezidentyfikowanego związku ureidowego w obecności ATP i 3-fosfoglicerynianu (Kleczkowski — dane nie opublikowane).

Przytoczone hipotetyczne szlaki metaboliczne różnią się zasadniczo interpretacją włączania mocznika do metabolizmu azotowego przez organizmy nie zawierające ureazy. Część przytoczonych hipotez (d, f, g, h) wysunięto na podstawie badań *in vitro*. W pozostałych przypadkach opierano się na pośrednich danych, uzyskanych z doświadczeń *in vivo*. Ze wszystkich przytoczonych hipotez tylko jedna (g) ma kompletną dokumentację eksperymentalną. Pozostałym brakuje bądź identyfikacji produktu lub produktów reakcji, bądź też nie udało się dotychczas powtórzyć ciągu reakcji lub poszczególnych reakcji *in vitro*.

Wspólną przesłanką większości przedstawionych hipotez (a, c, d, e, f, h), choć są one oparte na różnych mechanizmach początkowego etapu włączania mocznika do metabolizmu azotowego organizmów nie zawierających ureazy, jest fakt znajdowania większości ¹⁴C z mocznika w aminokwasach cyklu ornitynowego (a, c, e, f), lub w niezidentyfikowanych związkach ureidowych (h).

LITERATURA

1. Baker J. K., Thompson J. F., *Plant Physiol.* **37**, 618 (1962).
2. Bollard E. G., *Symp. Soc. Exp. Biol.* **13**, 193 (1959).
3. Cook A. R., Boulter D., *Phytochemistry* **3**, 313 (1964).

4. Dąbrowska M., Kleczkowski K., Reifer I., *Acta Soc. Botan. Polon.* **35**, 257 (1966).
5. Domnas A., *J. Biochem.* **52**, 149 (1962).
6. Eckert L., Kleczkowski K., Kating H., *Arch. Mikrobiol.* **55**, 54 (1966).
7. Ellner P. D., Steers E., *Arch. Biochem. Biophys.* **59**, 534 (1955).
8. Furutani S., Omura H., Osajima Y., Yamafuji K., *Enzymology* **28**, 278 (1965).
9. Hattori A., *J. Biochem.* **44**, 253 (1957).
10. Hattori A., *J. Biochem.* **45**, 57 (1958).
11. Hattori A., *Plant Cell Physiol.* **1**, 107 (1960).
12. Hodson R. C., Thompson J. F., *Plant Physiol.* **41**, XI (1966).
13. Hodson R. C., Thompson J. F., *Plant Physiol.* **44**, 691 (1969).
14. Kating H., *Biochem. Z.* **335**, 336 (1962).
15. Kleczkowski K., VII Zjazd P.T. Biochem. Wrocław 1969, str. 142.
16. Kleczkowski K., Eckert L., Kating H., *Arch. Mikrobiol.* **54** 106 (1966).
17. Krebs H. A., Eggleston L. V., Knivett V. A., *Biochem. J.* **59**, 185 (1955).
18. Mueller E., *Nova Acta Leopoldina* **24**, Nr 155, 1 (1964).
19. Nandi D. L., *Naturwissenschaften* **45**, 246 (1958).
20. Omura H., Osajima Y., *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **25**, 487 (1961).
21. Omura H., Osajima Y., *Nature* **190**, 345 (1961).
22. Omura H., Osajima Y., Tsukamoto T., *Enzymology* **31**, 129 (1966).
23. Reifer I., Morawska G., *Bull. Acad. Polon. Sci. Biol.* **11**, 423 (1963).
24. Reifer I., Wielgat B., *Bull. Acad. Polon. Sci. Biol.* **12**, 499 (1964).
25. Reisner G. S., Gering R. K., Thompson J. F., *Plant Physiol.* **35**, 48 (1960).
26. Roon R. J., Levenberg B., *J. Biol. Chem.* **243**, 5213 (1968).
27. Roon R., Levenberg B., *J. Biol. Chem.* **245**, 4593 (1970).
28. Thomas W. H., Krauss R. W., *Plant Physiol.* **30**, 113 (1955).
29. Valentine R. C., Bojanowski R., Gaudy E., Wolfe R. S., *J. Biol. Chem.* **237**, 2271 (1962).
30. Valentine R. C., Wolfe R. S., *Nature* **191**, 925 (1961).
31. Walker J. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **38**, 561 (1952).
32. Whitney P. A., Cooper T. G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **40**, 314 (1970).

JADWIGA SKORKOWSKA-ZIELENIEWSKA *

Synergizm żelaza i miedzi w organizmie

Interrelationship of Iron and Copper in the Body

Recent data on the metabolism of iron and copper and their interrelationship in the body are discussed.

I. Uwagi wstępne

Nowsze badania znacznie rozszerzyły wiedzę o metabolizmie żelaza i miedzi w organizmie. Zwrócono większą uwagę na mechanizm absorpcji żelaza z pożywienia i rolę, jaką w tym procesie odgrywają niektóre inne składniki mineralne, witamina C oraz inne czynniki modyfikujące (1, 6, 15, 21).

Część autorów ściśle wiąże metabolizm żelaza z metabolizmem miedzi (16, 17, 18, 38, 42, 43, 67, 68), na co inni nie zwracają większej uwagi, lub nie potwierdzają tej współzależności (55, 78, 80). Skutkiem tego na ogół nie przywiązują się większej wagi do wzajemnego powiązania metabolizmu obu tych składników. Na rozbieżność poglądów wskazują między innymi dane przytoczone w tablicy 1, która przedstawia zawartość miedzi i żelaza w niektórych preparatach farmaceutycznych. Na jedną część miedzi zawartej w tych preparatach przypada od 10 do 3300 części żelaza, a do niektórych preparatów miedzi w ogóle się nie dodaje.

O panującej rozbieżności opinii o roli miedzi w metabolizmie żelaza świadczą również zestawione w tablicy 2 dane, dotyczące zalecanego dawkowania tych składników w dietach doświadczalnych dla zwierząt. Miedź w tzw. „fizjologicznych normach” zalecana jest w ilości od 10 do 3000 μg dziennie, a żelazo w ilości 200—8700 μg .

W żywieniu ludzi żelazo również zalecane jest w bardzo różnych dawkach, od około 1 mg żelaza dostępnego (80), poprzez 12 mg żelaza w większości norm pokarmowych (3, 32, 72) do 40 mg żelaza ogólnego przy diecie jarskiej (31).

* Dr, Katedra Technologii i Higieny Żywności Człowieka, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Tablica 1

Zawartość miedzi i żelaza w niektórych preparatach farmaceutycznych

Preparaty farmaceutyczne	Miedź mg	Żelazo mg	Stosunek Cu:Fe
Vitalal „Polfa” (pastylka)	ok. 0,001	3,3	1:3300
Decavit (czekoladka)	0,05	5,0	1:100
Partironin „Polfa” (1 granulek)	ok. 0,05	ok. 4,0	1:80
Heptuna Plus „Pfizer” (pastylka)	1,0	75,0	1:75
Viterra „Pfizer” (pastylka)	1,0	10,0	1:10
Ascofer „Jedność” (pastylka)	0	ok. 27,0	0

Tablica 2

Zalecane dzienne dawki miedzi i żelaza dla szczurów i kurcząt

Według	Miedź µg/dzień	Żelazo µg/dzień	Stosunek Cu:Fe
Diety doświadczalne dla szczurów			
Luckey (50)	870	8700	1:10
Reddy i wsp. (62)	100	800	1:8
McCoy (54)	500—1000	2500	1,5—1:2,5
Cuthbertson (26)	300	750	1:2,5
Albritton (3)	200	500	1:2,5
Abrarow (2)	3000	—	—
Uesaka i wsp. (75)	200—600	—	—
Underwood (76)	10—50	—	—
Diety doświadczalne dla kurcząt			
Hill i wsp. (42)	10—50	200	1:20—1:4
Simpson i wsp. (65)	460	1040	1:2,6

Zawartość miedzi w dziennym pożywieniu człowieka wynosi średnio około 2 mg. Ponieważ w praktyce żywienia ludzi, w przeciwieństwie do żywienia zwierząt, nie obserwuje się na ogół objawów niedoborów tego składnika, ilość ta uważana jest za wystarczającą dla pokrycia zapotrzebowania na miedź.

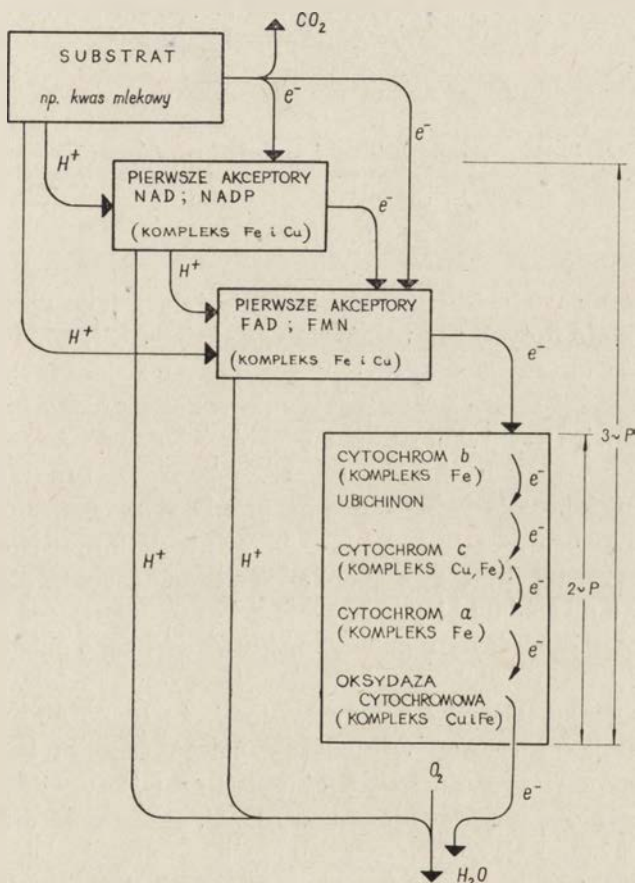
II. Występowanie żelaza i miedzi w organizmie człowieka

Według Finch a (31) i Drabkina (28) żelazo w organizmie występuje w trzech frakcjach białek złożonych: 1) frakcja zasadnicza, na którą składa się żelazo hemoglobiny, mioglobiny i enzymów komórkowych (frakcja ta zawiera około 70% żelaza występującego w organizmie); 2) frakcja magazynująca czyli żelazo zapasowe, występujące głównie w wątrobie, śledzionie i szpiku kostnym w formie ferrytyny i hemosyderyny; 3) frakcja

transportująca — *trans*-feryna (syderofilina) — β_1 -globulina surowicy, w której jedna cząsteczka białka wiąże dwa atomy żelaza, przy czym łatwiej związane jest żelazo dwuwartościowe.

Ostatnie lata przynoszą coraz więcej danych o enzymach tkankowych łańcucha oddechowego (11). Wyodrębniono cztery kompleksy enzymatyczne, z których każdy zawiera żelazo, a co najmniej dwa kompleksy zawierają miedź (33).

Na schemacie 1 zamieszczono schemat reakcji „kaskady elektronów” (11, 33). Na stopniach „kaskady” zaznaczono występowanie żelaza i miedzi w kompleksach enzymatycznych.



Schemat 1. Występowanie kompleksów enzymatycznych Cu i Fe w reakcjach „kaskady elektronów”

Poza enzymami oddechowymi, miedź w organizmie człowieka wg Scheinberga (64) i Owena (58) występuje w wielu białkach złożonych: ceruloplazminie, cerebrokuperinie, oksydazie polifenolowej, hepatokuperinie oraz syntazie porfobilinogenowej.

Z niedoborem miedzi wchodzącej w skład oksydazy lizyny związane są zaburzenia w biosyntezie elastyny i kolagenu, powodujące powstawanie tętniaków naczyniowych u zwierząt karmionych pożywieniem bez dodatku miedzi, a chelatowanie miedzi przez lityrogeny prowadzi do ciężkich schorzeń tkanki łącznej (5, 10, 65).

Według najnowszych poglądów powstawanie wola endemicznego jest wynikiem braku w pożywieniu wolnej miedzi, odgrywającej rolę w transporcie jodu (34). Przy niedoborze miedzi obserwowano również obniżenie wrażliwości smakowej (41).

Ze względu na doniosłe znaczenie żelaza i miedzi dla fizjopatologii nieco szerzej będzie omówiona gospodarka ogólnoustrojowa tymi składnikami.

III. Absorpcja żelaza i miedzi z pożywienia

1. Uwagi ogólne

Według opinii wielu badaczy wchłanianie żelaza jako zjawisko fizjologiczne nie zostało dotychczas należycie wyjaśnione (14, 15, 19, 30, 31, 48). Przez wiele lat uznawana była hipoteza Granicka (37), zakładająca regulację absorpcji żelaza przez wysycenie odpowiedniego białka, apoferrytyny. Całkowite wysycenie miało ograniczać dowóz żelaza do ustroju na zasadzie tzw. „bloku śluzówkowego”. Późniejsze badania podważyły hipotezę Granicką. Jako jeden z pierwszych Reissman (63) stwierdził u psów wyższą absorpcję żelaza, niżby to wynikało z możliwości wiązania przez apoferrytynę oraz z szacunkowego zapotrzebowania. Następnie Smith i Paniaciulli (69) stwierdzili znaczny wzrost absorpcji żelaza u ludzi przy stopniowym podwyższaniu dawek tego składnika. Wzrost absorpcji przekraczał wielokrotnie szacunkowe zapotrzebowanie.

Crosby (25) i Conrad (23) dowiedli, że błona śluzowa może do pewnego stopnia regulować wchłanianie żelaza poprzez komórki cylindryczne, które po wysyceniu żelazem blokują prawie zupełnie wchłanianie tego składnika przez okres swojego trwania, tj. przez kilka dni. W związku z tym żelazo z komórek cylindrycznych może nie przechodzić do krwiobiegu, zwłaszcza przy wysyceniu organizmu tym składnikiem. Callender (14) twierdzi jednak, że „blok śluzówkowy”, jeżeli w ogóle ma miejsce, jest stosunkowo niesprawnym czynnikiem regulującym absorpcję żelaza.

Nie ma również zgodnych danych dotyczących miejsca absorpcji żelaza. Używając żelaza radioaktywnego, Darrel i Mitchell (27) stwierdzili, że jest ono najszybciej wchłaniane w dwunastnicy, inni autorzy uważają natomiast, że najintensywniejsza absorpcja żelaza zachodzi w części odźwiernikowej żołądka (13, 51, 57).

2. Wewnątrzustrojowe czynniki modyfikujące absorpcję żelaza

Większość badaczy potwierdza fakt zwiększonej absorpcji żelaza u osobników z niedoborem pokarmowym tego składnika lub po krwotokach, jednak niektórzy twierdzą, że wzrost ten jest nieznaczny i absorpcję uzależniają prawie wyłącznie od różnej dostępności żelaza (29, 45, 56).

F i n c h (30, 31) podaje, że przy badaniu absorpcji żelaza z produktów pszennych ludzie zdrowi wchłaniali 4,5% dawki, a grupa z niedoborem żelaza 7,8%. Badania C a l l e n d e r (14) przy użyciu standardowej dawki żelaza farmaceutycznego 5 mg ^{59}Fe w formie siarczanu wykazały, że ludzie z niedoborem żelaza wchłaniali średnio 56% dawki, a zdrowi średnio 30%. Stosując jako źródło żelaza radioaktywnego hemoglobinę i podając analogiczną dawkę 5 mg żelaza, autorka ta stwierdziła absorpcję w grupie z niedoborem żelaza w wysokości średnio 25%, a u osobników zdrowych średnio 13%.

Inni badacze zwrócili uwagę na rolę soku żołądkowego w absorpcji żelaza. J a c o b s i wsp. (44) stwierdzili, że ludzie z niedokrwistością niedobarwliwą, cierpiący na niedokwaśność żołądka, wchłaniali żelazo z hemoglobiny w podobnym stopniu co i ludzie o normalnej kwasocie żołądka.

Nieco inne doświadczenie wykonali G o l d b e r g i wsp. (36). Użyli oni standardowych posiłków z dodatkiem śladowych ilości żelaza i stwierdzili wyższą absorpcję żelaza w grupie ludzi z normalną kwasotą żołądka w porównaniu do grupy z niedokwasotą.

K o e p k e i wsp. (46) uważają, że w soku żołądkowym występuje czynnik stymulujący wchłanianie żelaza. Według nich czynnik ten miałby działać podobnie jak znany tzw. „czynnik wewnętrzny” przy wchłanianiu witaminy B₁₂. Hipotezę taką wysuwają oni na podstawie danych doświadczalnych, wskazujących, że żelazo podane z sokiem żołądkowym psów cierpiących na niedobór żelaza jest lepiej wchłaniane niż żelazo podawane z sokiem żołądkowym zwierząt zdrowych. L u k e i wsp. (51) podają, że czynnik regulujący wchłanianie żelaza, tj. wiążący w żołądku nadmiar tego składnika, ma charakter białkowy; nazwali go gastroferryną. Czynnik ten produkowany jest tylko przez osobników o organizmie wystarczająco wysyconym żelazem. Przy niedoborze żelaza brak jest gastroferryny i wówczas żelazo z pożywienia wchłaniane jest bez przeszkód. M o r g a n i wsp. (57) w doświadczeniach izotopowych na ludzkim soku żołądkowym wykazali, że gastroferryna ma także charakter węglowodanowy.

C a l l e n d e r i B r a u n (15) zwracają uwagę na rolę soku trzustkowego w absorpcji żelaza. Przy uszkodzonej trzustce następuje bowiem znaczny wzrost absorpcji żelaza. W soku trzustkowym znajduje się prawdopodobnie specjalny inhibitor absorpcji żelaza. Jednak doświadczenia wykonane w celu potwierdzenia tej hipotezy dały sprzeczne wyniki.

3. Czynniki pożywienia modyfikujące absorpcję żelaza i miedzi

Od dawna znany jest fakt różnej podatności żelaza na wchłanianie czyli różnej tzw. dostępności tego składnika z produktów spożywczych. Zagadnienie to postawione zostało w nowym świetle przez Finch'a (31) przy rewizji norm zapotrzebowania pokarmowego na żelazo. Różna dostępność żelaza wpływa na różny procent jego absorpcji z pożywienia. I tak zawartość w pożywieniu fosforanów i fityn, które tworzą z żelazem nierozpuszczalne sole, obniża dostępność i absorpcję, lecz fosforany i fityny nie mają wyraźniejszego wpływu na absorpcję żelaza z hemoglobiny (74). Większość prac dotyczących absorpcji żelaza podaje, że średnia absorpcja nie przekracza na ogół 10% zawartości żelaza w żywności i waha się zazwyczaj w granicach od 1—10% (32, 56).

Dodatek kwasu askorbinowego w ilości 1 g wpływa na wzrost absorpcji żelaza, na przykład z jaj do 80%, jednak ten sam dodatek kwasu askorbinowego do warzyw i wątroby nie daje tak dobrych wyników (80). Podawanie kwasu askorbinowego z FeCl_2 podwyższa resorbcję żelaza u zwierząt doświadczalnych (47).

Zwiększenie dawki wapnia z 400 do 1500 mg wpływa na znaczne zwiększenie absorpcji żelaza z pożywienia (4).

Chase (20), Gubler (38), Lahey z wsp. (49) i Cartwright z wsp. (17) w badaniach na zwierzętach wykazali istnienie synergizmu żelaza i miedzi. Według tych autorów niedobór miedzi wpływa na obniżenie wykorzystania żelaza z pożywienia. Posługując się izotopem żelaza ^{59}Fe stwierdzili oni przy niedoborze miedzi mniej żelaza w wątrobie i w składzie hemoglobiny.

Skorkowska-Zieleniewska (66, 67, 68) określiła bliżej zakres dawek miedzi, w których działa ona jako synergent w stosunku do żelaza. Zgodnie z sugestią Wienickowa (77) podzielono dawki miedzi na trzy strefy działania, tj. strefę niedoborową, biotyczną i toksyczno-farmakologiczną. Przy podziale na te strefy jako wskaźnik fizjologicznego działania miedzi wykorzystano poziom kwasów nukleinowych (RNA i DNA). Zaobserwowano, że biotyczne dawki miedzi stosowane w granicach 1—4 mg Cu/100 g pożywienia wpływały na zwiększenie absorpcji i retencji żelaza od 67 do 92% w porównaniu z absorpcją i retencją żelaza przez zwierzęta kontrolne, oraz na znaczny (około 50%) wzrost wysycenia tkanki wątrobowej tym składnikiem. Efekty te otrzymywano tylko przy biotycznych dawkach żelaza w pożywieniu (6,6—13,6 mg Fe/g), natomiast dawki miedzi i żelaza wchodzące w zakres strefy toksyczno-farmakologicznej wykazywały niekorzystny wpływ na wysycenie tkanki wątrobowej tymi składnikami oraz na poziom kwasów nukleinowych w wątrobie.

Jeżeli chodzi o absorpcję miedzi, to do czynników pożywienia wpływających na ten proces zalicza się molibden i mangan, przy czym molibden wykazuje działanie ujemne, a mangan dodatnie. W doświadczeniach na

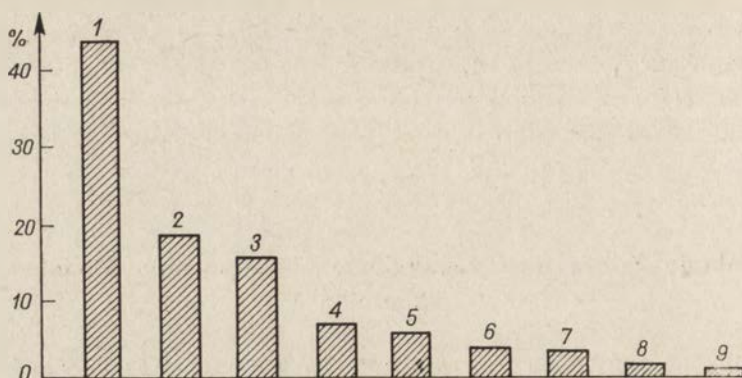
zwierzętach stwierdzono, że nadmiar molibdenu w pożywieniu wpływa niekorzystnie na absorpcję i gospodarkę miedzią w organizmie, zwłaszcza przy równoczesnym niedoborze fosforanów. Natomiast zaobserwowano, że zwiększone dawki manganu wpływają na większą absorpcję i magazynowanie miedzi w tkankach (22, 79).

IV. Wydalanie żelaza oraz zagadnienie zbilansowania niedoborów tego składnika

Badania izotopowe, przeprowadzone na ludziach (Heinrich z wsp. (40)) wykazały, że żelazo u dorosłych mężczyzn wydalane jest w ilości 5,5 mg/dzień. Wartość tę można przyjąć jako orientacyjną przy ustalaniu zapotrzebowania człowieka na żelazo. Połowa wydalonego żelaza pochodzi ze złuszczonego się nabłonka śluzówki przewodu pokarmowego, minimalna ilość ze składników krwi wydalanych przez jelito, a reszta ze złuszczonego się naskórka, ze strat z moczem oraz z potem (21, 31). Kobiety w czasie menstruacji wydają dodatkowo od 25 do 100 mg żelaza dziennie. Zbilansowanie tych strat organizmu (około 6 mg żelaza dziennie) poprzez spożycie odpowiednich ilości żelaza w pożywieniu jest praktycznie trudne do zrealizowania przy obecnych sposobach żywienia się ludzi.

Przyjmując średnią zawartość żelaza w pożywieniu dziennym w granicach 10—26 mg oraz na ogół niską absorpcję tego składnika, nie przekraczającą niekiedy 5% dawki, Finch (31) szacuje występowanie mniej lub bardziej zaawansowanej niedokrwistości z powodu zbyt niskiego spożycia żelaza u kilkuset milionów ludzi na świecie. Coons (24) twierdzi ponadto, że przy niedoborze żelaza występują liczne „bloki metaboliczne” niezależnie od upośledzonej biosyntezy porfiryn. „Bloki” takie, zdaniem tego autora, mają prowadzić do osłabienia przemiany materii i obniżenia ogólnej odporności organizmu. Głównym powodem tych zmian jest zubożenie enzymów tkankowych w żelazo, co występuje znacznie wcześniej niż ewentualne naruszenie układu syntetyzującego hemoglobinę.

Zapotrzebowanie na żelazo w polskich warunkach żywienia się ludności pokrywane jest w około 80%, przy średniej normie żelaza 12 mg dziennie na mieszkańca (7). Jeżeli jednak do przyjętej normy wprowadzi się poprawki uwzględniające płeć, wiek osób, rodzaj spożywanej diety itd., niedobór żelaza w niektórych grupach ludności naszego kraju okaże się znacznie większy, ze względu na stosunkowo duży udział w pożywieniu produktów pochodzenia roślinnego, odznaczających się bardzo niską dostępnością żelaza. Obliczony orientacyjnie udział grup produktów spożywczych w dostarczaniu żelaza przy obecnej strukturze spożycia w Polsce jest przedstawiony graficznie na rysunku 1. Należy podkreślić, że uwzględniono tu żelazo ogólne, a nie żelazo dostępne.



Rys. 1. Udział grup produktów spożywczych w dostarczaniu żelaza w przeciętnej racji pokarmowej ludności w Polsce (żelazo ogółem bez uwzględnienia stopnia jego dostępności)

1 — zbożowe, 2 — mięsne, 3 — ziemniaki, 4 — mleko, 5 — warzywa, 6 — owoce, 7 — jaja, 8 — strączkowe, 9 — ryby

Doświadczalnych dowodów na niepełne pokrycie zapotrzebowania na żelazo w żywieniu naszej ludności dostarczają wyniki badań, przeprowadzonych w Instytucie Żywności i Żywienia, nad stanem odżywienia niektórych grup ludności, sygnalizujące występowanie niedokrwistości niedobarwliwej (35, 52, 53, 70, 71), badania przeprowadzone w Instytucie Matki i Dziecka dotyczące niedokrwistości u niemowląt i dzieci (8, 9), oraz wiele innych (12, 39, 59, 60, 61, 73, 81).

Jak z powyższego przeglądu piśmiennictwa wynika, mimo licznych badań nad gospodarką żelazem i miedzią w organizmie, wiele zagadnień pozostaje nadal nie wyjaśnionych, a wielu autorów przedstawia na ten temat kontrowersyjne poglądy. Brak jednoznacznych danych dotyczy zwłaszcza takich zagadnień, jak mechanizm i stopień absorpcji żelaza i miedzi z pożywienia oraz metody określania stanu wysycenia organizmu tymi składnikami mineralnymi. Praktyczną konsekwencją tego stanu rzeczy jest duża rozpiętość ilościowa norm zapotrzebowania człowieka na oba te składniki.

Dla rozstrzygnięcia powyższych zagadnień niezbędne są dalsze badania nad metabolizmem żelaza i miedzi w organizmie, które przyczynią się do wyjaśnienia istniejących kontrowersji teoretycznych, a także przydatne będą dla praktyki klinicznej i żywieniowej.

LITERATURA

1. Abernathy R. P., Miller J., Wentworth J., Speirs M., *J. Nutr.* **85**, 265 (1965).
2. Abrarow A., *Woprosy Pitaniya* **5**, 31 (1961).
3. Albritton E. C., *Standard Value in Nutrition and Metabolism*, Saunders Comp, Philadelphia 1955.
4. Apte S. V., Venkatachalam P. S., *Indian J. Med. Res.* **52**, 213 (1964).

5. Ardelt W., *Post. Biochem.* **14**, 105 (1968).
6. Aschkenasy A., *Compt. Rend. Soc. Biol.* **159**, 1886 (1965).
7. Bartnik J., Skorkowska-Zieleniewska J., Suchenek K., Poziom i struktura spożycia niektórych składników odżywczych w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem wapnia, fosforu i żelaza. Katedra Technologii i Higieny Żywnienia Człowieka SGGW (nie publikowane), Warszawa (1966).
8. Berger M., *Prace i Mat. Nauk. J. M. D.* **5**, 241 (1965).
9. Berger M., Kochańska S., Rafalski H., *Prace i Mat. Nauk. J. M. D.* **2**, 31 (1964).
10. Bird D. W., *Nutr. Abstr. Rev.* **38**, **1**, 147 (1968).
11. Boehm R., Mayfield M., *J. Nutr.* **87**, 322 (1965).
12. Bowski H., *Przegl. Lek.* **17**, **5**, 1 (1961).
13. Bothwell T. H., Finch C. A., Iron metabolism, I. A. Churchill Ltd, Londyn 1962.
14. Callender S. T., *Proc. Nutr. Soc.* **26**, 59 (1967).
15. Callender S. T., Braun H., *Proc. Nutr. Soc.* **26**, **1**, 61, (1967).
16. Carlton W. W., Henderson W., *J. Nutr.* **85**, 65 (1965).
17. Cartwright G. E., Gubler C. J., Bush J. A., Wintrobe M., *Blood* **11**, 143 (1956).
18. Cartwright G. E., Wintrobe M. M., *Am. J. Clin. Nutr.* **14**, 224 (1964).
19. Cieślińska A., *Pol. Tyg. Lek.* **2**, 884 (1967).
20. Chase M. S., Gubler C. J., *J. Biol. Chem.* **199**, 757 (1952).
21. Coltman C. A., Rowe N. J., *Am. J. Clin. Nutr.* **18**, 270 (1966).
22. Compere R., Burny A., Rige A., Von Uytrecht E. F., *J. Nutr.* **87**, 412 (1965).
23. Conrad M. E., *Rev. Nutr. Res.* **28**, 3 (1967).
24. Coons C. M., *Ann. Rev. Biochem.* **33**, 452 (1964).
25. Crosby W. H., *Blood* **22**, 441 (1963).
26. Cuthbertson W. F. J., *Proc. Nutr. Soc.* **16**, 70 (1957).
27. Darrel R., Mitchell E. A., *J. Nutr.* **86**, 120 (1965).
28. Drabkin D. L., *Physiol. Rev.* **31**, 345 (1951).
29. Duthie H. L., *Brit. J. Haematol.* **10**, 59 (1964).
30. Finch C. A., *J. Clin. Invest.* **38**, 392 (1959).
31. Finch C. A., *Nutr. Rev.* **23**, 129 (1965).
32. Frańczuk H., Karpińska H., Rdzanek J., *Roczn. Wojsk. Inst. Hig. Epid.* str. 6 (1964).
33. Fruton J. S., Simmonds S., *Biochemia Ogólna*, tłum. z ang. PZWL Warszawa, 1966.
34. Gajewski S., *Zesz. Nauk Brom. i Chem. Toks.* **1**, 145 (1968).
35. Gastoł B., Kołtek K., *Roczn. PZH* **14**, 275 (1963).
36. Goldberg A., Lockhead A. C., Dagg J. M., *Lancet* **1**, 848 (1963).
37. Granick S., *Physiol. Rev.* **31**, 49 (1951).
38. Gubler C. J., Lahey M. E., Cartwright G. E., Wintrobe M. M., *Blood* **7**, 1075 (1952).
39. Hankiewicz J., *Pol. Tyg. Lek.* **15**, 355 (1960).
40. Heinrich M. C., Gable E. E., Meineke B., Whong D. H., *Klin. Wochschr.* **44**, 904 (1966).
41. Henkin R. I., Keiser H. R., Joffe J. A., *Lancet* **2**, 1268 (1967).
42. Hill C. H., Matrone G., Payne W. L., Barber W. C., *J. Nutr.* **80**, 227 (1963).
43. Hunt C. E., Carlton W. W., *J. Nutr.* **87**, 385 (1965).
44. Jacobs P., Bothwell T., Charlton R. W., *J. Appl. Physiol.* **19**, 187 (1964).

45. Josephs H. W., *Blood* **10**, 1 (1958).
46. Koepke J. A., Stewart W. B., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **115**, 927 (1964).
47. Kotarbińska M., *Studia nad gospodarką żelazem u prosiąt ssących*, Praca doktorska S.G.G.W. Warszawa 1958.
48. Książkiewicz-Szapiro M. D., *Pol. Tyg. Lek.* **1**, 1581 (1967).
49. Lahey M. E., Gubler C. J., Cartwright G. E., Wintrobe M. M., *Blood* **7**, 1053 (1952).
50. Luckey T. L., *Science* **120**, 3114, 196—198 (1954).
51. Luke C. G., Davis P. S., Deller D. I., *Lancet* **1**, 926 (1967).
52. Mandrowska A., Konieczna W., *Roczn. PZH* **14**, 293 (1963).
53. Mandrowska A., Konieczna W., Kowalski J., Szczygieł A., Książny S., Dietl B., *Roczn. PZH* **14**, 133 (1963).
54. McCoy R. H., *The Rat in Laboratory Investigation*, Farris and Griffith, Philadelphia 1949.
55. Mills C. F., *Proc. Nutr. Soc.* **23**, 1 (1964).
56. Moore C. V., *Am. J. Clin. Nutr.* **3**, 3 (1955).
57. Morgan D. S., Gatenby P. B. B., Weir D. G., Scott J. M., *Lancet* **7**, 861 (1969).
58. Owen C. A., Hazelrig J. B., *Am. J. Physiol.* **210**, 1059 (1966).
59. Pacanowska M., *Ped. Pol.* **40**, 509 (1965).
60. Pacanowska M., *Ped. Pol.* **41**, 15 (1966).
61. Pacanowska M., *Ped. Pol.* **41**, 23 (1966).
62. Reddy B. S., Wostman B. S., Pleasant J. R., *J. Nutr.* **86**, 2 (1965).
63. Reissman T. R., Coleman T. J., *Blood* **10**, 46 (1955).
64. Scheinberg H., *Federation Proc.* **20**, 3 (1961).
65. Simpson Ch. F., Jones J. E., Harms R. H., *J. Nutr.* **91**, 3 (1967).
66. Skorkowska-Zieleniewska J., *Zeszyty Nauk. SGGW—Technologia Rolno-Spożywcza* **4**, 145 (1966).
67. Skorkowska-Zieleniewska J., *Badania nad synergizmem żelaza i miedzi w procesie wchłaniania i wykorzystania tych składników z pożywienia (praca doktorska) SGGW, Warszawa 1967.*
68. Skorkowska-Zieleniewska J., *Zeszyty Nauk. SGGW—Technologia Rolno-Spożywcza* **5**, 59 (1969).
69. Smith M. D., Paniaciulli I. M., *Brit. J. Haematol.* **4**, 428 (1958).
70. Szczygieł A., Konieczna W., *Roczn. PZH* **13**, 356 (1964).
71. Szczygieł A., Mandrowska A., Bielińska Z., Kowalski J., Namysłowski L., Książny S., Dietl B., *Roczn. PZH* **11**, 277 (1960).
72. Szczygieł A., Siczakówna J., Nowicka L., *Normy żywienia dla osiemnastu grup ludności, PZWL, Warszawa 1965.*
73. Ścibior-Jabłonka J., *Pol. Tyg. Lek.* **19**, 39, 1487 (1964).
74. Turnbull A., Cleton F., Finch C. A., *J. Clin. Invest.* **41**, 1897 (1962).
75. Uesaka S., Kawashima R., Katoh K., *Jap. J. Zootech. Sci.* **37**, 15 (1966).
76. Underwood E. I., *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, Academic Press, New York 1956.
77. Wienczikow A. J., *Biotiki, Miedgiz* 1962.
78. Wohl M. G., Goodhart R. S., *Modern Nutrition in Health and Disease* 303. Kimpton, Londyn 1964.
79. Wojnar A. J., *Biologiczeskaja rol mikroelementow w organizmie żywotnych i czelowieka*, Wyzszaja Szkoła, Moskwa 1960.
80. Woodruff C. W., *Rev. Nutr. Res.* **20**, 5 (1959).
81. Zgorzalewicz T., *Pol. Tyg. Lek.* **18**, 67 (1964).

GRAŻYNA TUROWSKA *

Poliprenole

Poliprenols

Structure, distribution, biosynthesis and function of poliprenols from bacteria, plants and animals are reviewed.

Budowa i występowanie poliprenoli

Poliprenolami nazywamy pierwszorzędowe długołańcuchowe alkohole jednowodorotlenowe. Są one zbudowane z różnej ilości (od 5 do 24) powtarzających się reszt prenylowych. Poszczególne związki różnią się między sobą ilością wiązań podwójnych i ich konfiguracją. Poliprenole wyodrębianiano z mikroorganizmów, roślin i zwierząt. Otrzymuje się je z frakcji tłuszczowcowej po hydrolizie alkalicznej. Poliprenole oddziela się od innych składników niezmydlającej się frakcji metodą chromatografii kolumnowej, najczęściej na tlenku glinu w gradiencie eteru etylowego w eterze naftowym. Otrzymuje się w ten sposób przeważnie mieszaninę homologów. Pojedyncze poliprenole można następnie wyizolować stosując chromatografię cienkowarstwową na ziemi okrzemkowej, impregnowanej olejem parafinowym. Najlepszy rodział otrzymuje się stosując chromatografię dwukierunkową (10). Prenole układają się po przekątnej płytki, wartości R_f wzrastają ze wzrostem długości cząsteczki alkoholu. Ponadto poliprenole można rozdzielić i jednocześnie oznaczyć ich zawartość w tkance stosując chromatografię gazową (37).

Strukturę poliprenoli ustalono za pomocą badań fizyko-chemicznych. Naturę poliprenylową związku, ilość grup wodorotlenowych i ich położenie oznacza się na podstawie widma IR, spektroskopii masowej i jądrowego rezonansu magnetycznego. Konfigurację, a częściowo również i rozmieszczenie wiązań podwójnych, można określić przeprowadzając ozonolizę związku oraz na podstawie pomiaru NMR i widma IR.

Różnice w strukturze pozwalają na podzielenie poliprenoli na kilka

* Mgr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

klas. Pierwszą grupę stanowią związki, w których wiązanie podwójne o konfiguracji *trans* występuje w każdej reszcie izoprenylowej. Do grupy tej należy powszechnie występujący w roślinach 45-cio węglowy solanesol i rzadziej spotykany solanesol 50-cio węglowy. Solanesol 45, jako pierwszy z poliprenoli, wyizolowali z liści tytoniu Rowland, Latimer i Giles w roku 1956 (25). Następnie wykryto go w liściach szeregu roślin. Zagadnienie ustalenia struktury i biosyntezy solanesolu było już omawiane w *Postęпах Biochemii* przez Jachymczyka (20). We wszystkich zbadanych roślinach solanesol stanowi tylko nieznaczny procent ogólnej ilości poliprenoli (16). Większość poliprenoli zawiera wiązania podwójne zarówno w konfiguracji *cis* jak i *trans*. Grupa prenylowa na węglowodorowym końcu cząsteczki posiada dwie równocenne reszty metylowe i dlatego nie można określić jej konfiguracji. Jednak zawsze jedna z reszt metylowych jest w położeniu *trans* w stosunku do olefinowego atomu wodoru i dlatego w NMR grupa ta wykazuje cechy konfiguracji *trans*. Trzy kolejne wiązania podwójne w resztach izoprenylowych przylegających do grupy końcowej w prenolach z liści kasztanowca (42), fikusa ozdobnego (32), kauczukowca (10) i morwy (34) występują w konfiguracji *trans*, a wiązania podwójne w pozostałych resztach izoprenylowych mają konfigurację *cis*. Związkom izolowanym z poszczególnych roślin autorzy nadawali nazwy: kastaprenole, fikaprenole, heweaprenole. Dokładniejsze badania wykazały, że substancje otrzymane z tych wszystkich gatunków roślin są mieszaninami homologów zawierających od 6 do 13 reszt prenylowych. W największych ilościach występują undekaizoprenol (11) i dodekaizoprenol (12).

Zbliżone strukturą do tych alkoholi są poliprenole wyizolowane z drewna brzozy i nazwane betulaprenolami (12, 13, 38). Cząsteczki betulaprenoli są krótsze od cząsteczek kastaprenoli i zawierają 6 do 10 jednostek prenylowych oraz dwa, a nie trzy wiązania podwójne o konfiguracji *trans*.

Undekaprenol zawierający również tylko dwa wiązania podwójne o konfiguracji *trans* wyizolowano z komórek bakterii rodzaju *Lactobacillus* i nazwano baktoprenolem (15, 33).

Oprócz całkowicie nienasyconych poliprenoli są znane również alkohole częściowo uwodorowane. Do grupy tej zalicza się przede wszystkim dolichole (20). Są to jedyne poliprenole występujące powszechnie w organizmach zwierzęcych. Po raz pierwszy wyodrębnili je w roku 1960 Pennock, Hemming i Morton (22) z nerek człowieka. Później znaleziono je również w innych narządach wewnętrznych szeregu ssaków (4). Zwyczajowa nazwa — dolichol — określa grupę alkoholi zawierających od 17 do 22 jednostek prenylowych. Najczęściej występują dolichole 18, 19 i 20. W związkach tych wiązanie podwójne w końcowej reszcie prenylowej zawierającej grupę wodorotlenową jest uwodorowane. W do-

licholach zarówno z wątroby szczura jak i świni występują, podobnie jak w betulaprenolach, dwa wiązania podwójne o konfiguracji *trans* (14).

Poza tkankami zwierzęcymi dolichole wykryto w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*. Głównym składnikiem jest tu dolichol 16 (16).

Najbardziej uwodrorowane poliprenole wyizolowano z grzyba *Aspergillus fumigatus*. Poliprenole te mają, podobnie jak dolichole, uwodrorowaną końcową resztę prenylową zawierającą grupę -OH oraz resztę prenylową na przeciwnym końcu łańcucha i, najprawdopodobniej, grupę do niej przylegającą. Są to więc heksahydroprenole zawierające dwa wiązania podwójne o konfiguracji *trans*. Najczęściej występuje prenol 21 (29, 30).

Rozmieszczenie i charakterystykę dotychczas zbadanych poliprenoli przedstawia tablica 1.

Poliprenole występują w tkankach w formie wolnej lub estrowej. Estry dolicholi stanowią zawsze około 60% dolicholi danej tkanki (8). W wątrobie świni estry dolicholi rozmieszczone są prawie równomiernie w całej komórce, natomiast związki wolne przeważają we frakcji mitochondrialnej (8, 31).

Poliprenole roślinne, solanesol i związki typu kastaprenoli, występują w liściach, głównie w chloroplastach, wyłącznie w formie wolnej (27, 42). Tylko w przypadku liści tytoniu Rowland i Latimer (24) stwierdzili, że solanesol tworzy również estry, najczęściej z kwasami palmitynowym i linolenowym, rzadziej linolowym, mirystynowym i olejowym. W buraku, kasztanowcu i obrazkach plamistych (*Arum maculatum*) większość poliprenoli typu kastaprenoli zlokalizowana jest w bezbarwnej części chloroplastów w osmofilnych globulach, natomiast solanesol i nieznaczna część kastaprenoli znajduje się w lamellach chloroplastów (41).

Betulaprenole z drewna brzozy występują zarówno w formie wolnej jak i estrowej.

Dokładne badania nad charakterystyką estrów prenoli w kulturach *Aspergillus fumigatus* przeprowadzili Stone i Hemming (31). Dla porównania oznaczyli oni składniki kwasowe tłuszczów prostych i estrów steroli. Stwierdzili, że kwasy tłuszczowe estryfikujące poliprenole są różnej długości: od 12 do 24 węglowych. W estrach poliprenoli przeważają nasycone kwasy tłuszczowe, które stanowią 52% wszystkich kwasów tłuszczowych, podczas gdy w tłuszczach prostych stanowią one 24%, a w estrach steroli jedynie 7%. Kwasy tłuszczowe jednonienasycone stanowią 27% wszystkich kwasów tłuszczowych w estrach prenoli, dwunienasycone 18% i trójnienasycone 3%. Wyniki te świadczą o wybiórczym włączaniu kwasów tłuszczowych do badanych estrów. Rozmieszczenie wolnych poliprenoli i ich estrów w komórkach *Aspergillus fumigatus* przypomina rozmieszczenie wolnego i zestryfikowanego dolicholu w komórkach wątroby świni. Związki wolne przeważają we frakcji mitochondrial-

Tablica 1

Charakterystyka i występowanie poliprenoli

	n głównego składnika	Ilość wiązań <i>trans</i>	Ilość wiązań uwodor.	Zawartość w świeżej tkance	Literatura
Solanesol	9	wszystkie	—	6 moli/kg	27
<i>Nicotiana tabacum</i>	9	„	—	8 moli/kg	39
<i>Aesculus hippocastanum</i>	9	„	—	< 0,1 mg/kg	34
<i>Morus bombycis</i>	9	„	—	< 1,5 mg/kg	39
<i>Ilex equifolium</i>	9	„	—	50,0 mg/kg	39
<i>Vicia faba</i>	9	„	—		10
<i>Hevea brasiliensis</i>	9	„	—		39
<i>Ficus elastica</i>	9	„	—		17, 23
<i>Arum maculatum</i>	10	„	—	6,0 mg/kg	
Kastraprenol					
<i>Nicotiana tabacum</i>	12	3	—	0,1 mg/kg	39
<i>Aesculus hippocastanum</i>	11	3	—	47,0 mg/kg	42
<i>Morus bombycis</i>	10	3	—		34
<i>Ilex equifolium</i>	10	3	—	< 0,1 mg/kg	39
<i>Vicia faba</i>	10	3	—	< 1,5 mg/kg	39
<i>Larus vulgare</i>				1,0 mg/kg	39
<i>Umbicus rupestris</i>				0,2 mg/kg	38
<i>Hedera helix</i>				1,0 mg/kg	39
<i>Sambucus nigra</i>				2,0 mg/kg	39
<i>Polygonum cuspidatum</i>				3,0 mg/kg	39
<i>Beta vulgaris</i>	11	3	—		41

c.d. Tablicy 1

<i>Hevea brasiliensis</i>	11	3	—	—	225,0 mg/kg	10
<i>Aglonema robelinii</i>	10—13	3	—	—	700,0 mg/kg	10
<i>Ficus elastica</i>	11	3	—	—	2600,0 mg/kg	32
<i>Arum maculatum</i>	10	3	—	—	6,0 mg/kg	17
<i>Betula verrucoza</i>	10—13	3	—	—	50,0 mg/kg	38
Betulaprenol						
<i>Betula verrucoza</i>	7, 8	2	—	—	1500,0 mg/kg	12, 13
Bactoprenol						
<i>Lactobacilli acidophilus</i>	11	2	—	—		33
„ casei	11	2	—	—		33
„ arabinosus	11	2	—	—		33
„ plantarum	11	2	—	—	40,0 µg/kg	15
Z aspergillus						
<i>Aspergillus fumigatus</i>	21	2	3	—	130,0 µg/kg	5, 29
Dolichol						
<i>Arum maculatum</i>	20	2	1	—	12,0 mg/kg	2, 17
<i>Chlorella pyrenoidoza</i>	14	2	—	—	0,4 µg/kg chloro- plastu	39
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16	2	1	—		16
człowiek						
byk						22
owca						22
świnia	19	2	1	—	100,0 mg/kg	6, 8, 14
królik					20,0 mg/kg	4, 6
szczur	18	2	1	—	63,0 mg/kg	13

nej, natomiast estry rozmieszczone są prawie równomiernie w całej komórce.

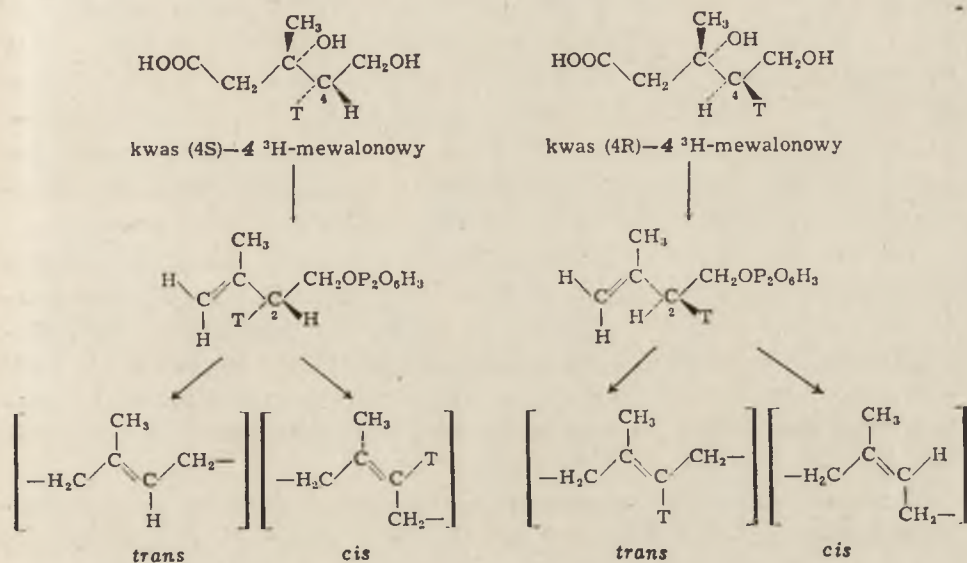
Zawartość poliprenoli zależy od wieku tkanki. Badania nad tą zależnością u roślin wyższych przeprowadzili Wellburn i Hemming (41). Zbadali oni zmiany zawartości poliprenoli w rosnących liściach obrazków plamistych i kasztanowca. Stwierdzili, że ilość kastaprenoli w obrazkach plamistych zwiększa się wraz z rozwojem liścia, od stadium pąka do liścia dojrzałego, natomiast solanesol pojawia się dopiero w liściach starych. Liście kasztanowca zawierają kastaprenole i solanesol w całym okresie swojego rozwoju. Ilość związków obu typów wzrasta podczas vegetacji, przy czym wzrost kastaprenoli jest znaczniejszy niż solanesolu: w chloroplastach 28-mio tygodniowych liści kasztanowca kastaprenoli jest 10 razy więcej niż solanesolu. Stosunek kastaprenoli w lamellach chloroplastów do kastaprenoli w osmofilnych globulach nie ulega w tym okresie zmianom.

II. Biosynteza poliprenoli

Biosynteza poliprenoli zachodzi najprawdopodobniej w analogiczny sposób jak biosynteza pozostałych terpenoidów. Zdolność do biosyntezy tych związków mają organizmy roślinne, zwierzęce i mikroorganizmy. Pierwszych danych o biosyntezie dolicholi zachodzącej w wątrobie świni dostarczyli Butterworth i wsp. (7). Badali oni poziom dolicholi w wątrobie świni hodowanej przy zastosowaniu różnych diet. Niezależnie od tego, czy świnię były karmione pokarmem naturalnym, czy syntetycznym, pozbawionym tłuszczu, czy też ze specjalnie dobranym zestawem tłuszczu, poziom dolicholi nie ulegał zmianom. Po dootrzewnowym wstrzyknięciu świni i królikowi znakowanego mewalonianu, Butterworth i wsp. (6) stwierdzili radioaktywność w dolicholach znajdujących się w wątrobie. Jednak procent radioaktywności włączonej do poliprenoli był mały i wynosił około 0,2% radioaktywności włączonej do steroli. Doświadczenia nad biosyntezą dolicholu *in vitro* przeprowadzili Gough i Hemming (14). Skrawki wątroby szczura inkubowali oni z radioaktywnym mewalonianem w buforze węglanowym o pH 7,4 w ciągu 3 godz. w temp. 37° doprowadzając CO₂ i O₂ w stosunku 5:95 i stale wstrząsając mieszaninę inkubacyjną. Doświadczenia przeprowadzili z podwójnie znakowanym mewalonianem: węglem ¹⁴C w pozycji 2 i trytem w pozycji 4R lub 4S (lakton kwasu 2-¹⁴C (4R)-4-³H₁-mewalonowego i kwasu 2-¹⁴C(4S)-4-³H₁-mewalonowego (schemat 1).

Dane NMR wskazują, że w cząsteczce dolicholu występują trzy reszty izoprenoidowe o konfiguracji *trans*, pozostałe natomiast mają konfigurację *cis*. Sugeruje to, że dolichol powstaje przez dołączenie jednostek *cis* do pirofosforanu farnezyly zbudowanego wyłącznie z jednostek o kon-

figuracji *trans*. Ponieważ wiadomo, że podczas biosyntezy poliprenoli tworzenie wiązania *trans* zachodzi z usunięciem atomu wodoru z pozycji 4S kwasu mewalonowego, a tworzenie wiązania *cis* z usunięciem atomu wodoru z pozycji 4R mewalonianu, doświadczenie z prekursorem podwójnie znakowanym miało rozstrzygnąć, czy formy *trans* i *cis* powstają już w czasie dołączania pirofosforanu izopentenylu do cząsteczek, czy też są wytwarzane wtórnie pod wpływem działania izomerazy. Mechanizm kondensacji podjednostek z wytworzeniem wiązań o konfiguracji *cis* i *trans* przedstawiony jest na schemacie 1.



Schemat 1. Włączenie trytu z kwasu (4S)-4-³H-mewalonowego i kwasu (4R)-4-³H-mewalonowego do reszty izoprenoidowej (wg 14)

Przy przejściu kwasu mewalonowego w pirofosforan izopentenylu węgiel w pozycji 4 w kwasie mewalonowym staje się węglem 2 w pirofosforanie izopentenylu. Konfiguracja wodoru i trytu nie ulega zmianie. W czasie wytwarzania wiązań o konfiguracji *cis* i *trans* nie zachodzi izomeryzacja związków

Otrzymany przez autorów stosunek ³H:¹⁴C = 15,08:18 w dolicholu 18, wskazuje, że podczas biosyntezy dolicholu z mewalonianu znakowanego trytem w pozycji 4S usuwane są tylko 3 atomy trytu, a z mewalonianu znakowanego trytem w pozycji 4R (³H:¹⁴C = 2,66:18) pozostałe atomy trytu (13). Świadczy to o powstawaniu 3 wiązań drogą kondensacji typu *trans* i pozostałych wiązań drogą kondensacji typu *cis* w cząsteczce dolicholu z wątroby szczura. Porównawcze oznaczenie stosunku ³H:¹⁴C dla skwalenu wykazało całkowite usunięcie radioaktywności z pozycji 4S mewalonianu, a zachowanie jej w pozycji 4R, co potwierdza dane, że w skwalenie wszystkie wiązania podwójne powstają drogą kondensacji typu *trans*. Autorzy otrzymali wyniki liczbowe zbliżone do teoretycznych,

co wskazuje na brak lub niską aktywność izomerazy pirofosforanu izopentenyłu w porównaniu z aktywnością prenylotransferazy. Jest to jednocześnie dowodem, że nie następuje izomeryzacja wiązań podwójnych w wytworzonym produkcie. Największy procent radioaktywności odnajdowano w dolicholu 18, który jest głównym związkiem prenolowym wątroby szczura.

W organizmach roślin synteza prenoli zachodzi zarówno wewnątrz jak i poza chloroplastami. Wellburn i Hemming (40) stwierdzili włączanie radioaktywności ze znakowanego mewalonianu do kasta-prenoli w izolowanych z liści kasztanowca chloroplastach. Po rozbiciu chloroplastów za pomocą ultradźwięków, specyficzna radioaktywność kasta-prenoli wzrosła trzykrotnie. Ponieważ z badań Goodwina (11) wiadomo, że mewalonian nie przenika przez błonę chloroplastów, radioaktywność we frakcji nienaruszonych chloroplastów pochodzi prawdopodobnie z zanieczyszczenia preparatu poliprenolami syntetyzowanymi poza chloroplastami, a przyrost radioaktywności po podziałaniu ultradźwiękami jest wskaźnikiem biosyntezy wewnątrz chloroplastów.

Badania *in vivo* nad włączaniem podwójnie znakowanego kwasu mewalonowego do betulaprenoli w obciętych gałązkach brzozy przeprowadzili Gough i Hemming (12, 13). Otrzymane stosunki $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ po podaniu kwasu $2\text{-}^{14}\text{C}$ -mewalonowego, znakowanego trytem w pozycji 4R i 4S, wskazywały na syntezę trzech wiązań podwójnych *trans* i pozostałych *cis* w wytwarzanych betulaprenolach 6 do 9. Te same stosunki otrzymali autorzy dla związków wolnych i ich estrów.

Doświadczenia te nie wyjaśniały jednak, które wiązania w cząsteczce mają konfigurację *cis*, a które *trans*. Gough i Hemming rozwiązali to zagadnienie podając gałązkom brzozy znakowane ^{14}C pirofosforan farnezyłu, geranylogeraniol i geraniol. Jedynie w przypadku podawania pirofosforanu farnezyłu procent radioaktywności włączanej do prenoli był większy niż przy stosowaniu mewalonianu i jednocześnie był większy niż włączanie do fitolu i skwalenu. Radioaktywność z geraniolu włączała się w nieznacznym stopniu, a z geranylogeraniolu praktycznie nie włączała się do betulaprenoli, natomiast włączała się do skwalenu. Brak włączania ^{14}C -geranylogeraniolu i słabe włączanie ^{14}C -geraniolu oraz wyraźne włączanie pirofosforanu ^{14}C -farnezyłu do betulaprenoli 6—9 potwierdzają hipotezę, że poliprenole powstają z *trans* farnezolu przez stopniowe przyłączanie jednostek drogą kondensacji, prowadzącej do powstania wiązania podwójnego o konfiguracji *cis*. A zatem reszty prenylowe o konfiguracji *trans* muszą znajdować się na węglowodorowym końcu cząsteczki (13).

Przytoczone dane dotyczą biosyntezy poliprenoli zawierających dwa wiązania o konfiguracji *trans*. Przez analogię uważa się, że w prenolach o trzech wiązaniach w konfiguracji *trans* występują one również na końcu węglowodorowym i powstają przez dołączenie jednostek prenylowych

drogą kondensacji *cis* do pirofosforanu geranylogeraniolu o wszystkich wiązaniach podwójnych *trans*.

Stone i Hemming (30) zajęli się ponadto ustaleniem pierwotnej struktury wiązań podwójnych w poliprenolach częściowo uwodorowanych, otrzymanych z kultury *Aspergillus fumigatus*. Na podstawie pomiaru radioaktywności po podaniu podwójnie znakowanego mewalonianu ustalili, że w cząsteczce tych poliprenoli występują 4 wiązania o pierwotnej konfiguracji *trans*. Z danych NMR wiadomo, że poliprenole wyodrębnione z tego grzyba zawierają jedynie dwa wiązania o konfiguracji *trans*. Przypuszcza się, że w czasie biosyntezy uwodorowane zostają 2 wiązania *trans*, prawdopodobnie przy węglowodorowym końcu cząsteczki i jedno wiązanie *cis* w reszcie izoprenoidowej zawierającej grupę wodorotlenową. Prawdopodobnie uwodorowanie poliprenoli jest etapem końcowym ich biosyntezy (29). Nie ma jednak bezpośrednich danych doświadczalnych, potwierdzających te przypuszczenia.

Bloch i wsp. (1, 21), wyizolowali i częściowo scharakteryzowali syntetazę długołańcuchowych pirofosforanów prenylowych z komórek bakterii *Micrococcus lysodeicticus*. Enzym wysalali siarczanem amonu z preparatu enzymatycznego, otrzymanego po lizie komórek i odwirowaniu części stałych. Następnie enzym oczyszczali przez kilkakrotne wysalanie, elektroforezę na akrylamidzie i chromatografię na DEAE-celulozie. Po tym oczyszczaniu aktywność specyficzna enzymu względem pirofosforanu farnezylu wzrosła 24 razy. Enzym ten katalizuje reakcję wydłużania łańcucha pirofosforanów poliprenylowych przez dołączanie pirofosforanu izopentenylu. Największą aktywność wykazuje on w reakcji pirofosforanu izopentenylu z pirofosforanem geranylu, słabszą z pirofosforanem farnezylu, najslabszą z pirofosforanem geranylogeranylu. Produktem reakcji są głównie alkohole o łańcuchach z 35 i 40 atomów węgla. Produkt reakcji można wyekstrahować rozpuszczalnikami organicznymi dopiero po uprzednim podziałaniu kwasem, co sugeruje istnienie powiązania produktu z enzymem. Wskazuje na to również fakt, że po podaniu radioaktywnego prekursora znakowanego węglem ^{14}C lub fosforem ^{32}P radioaktywność wykrywa się w enzymatycznej frakcji białkowej. Stabilność wiązania produktu z enzymem w środowisku kwaśnym jest taka sama jak nieorganicznego pirofosforanu. Przypuszczalnie więc produkt jest łańcuchowym związkiem pirofosforanoprenylowym, dołączonym lub zaadsorbowanym na enzymie.

III. Rola poliprenoli

Pirofosforany prenoli o wszystkich wiązaniach podwójnych w konfiguracji *trans* są prawdopodobnie prekursorami łańcucha bocznego poliizoprenoidowych chinonów. Często zachodzi korelacja między długością sola-

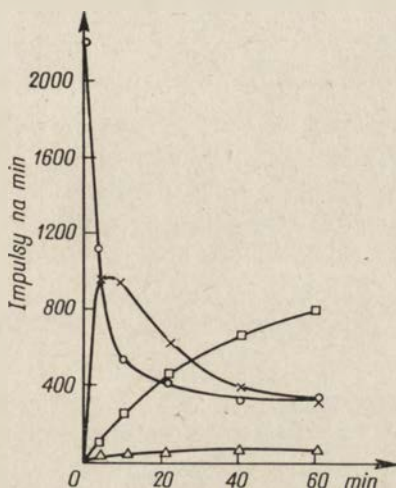
nesolu występującego w tkance a długością łańcucha bocznego chinonów; na przykład liście tytoniu zawierają 45-cio węglowy solanesol i tyle samo atomów węgla jest w poliprenolowym łańcuchu występującego tam w dużych ilościach plastochinonu. Natomiast w kolbach obrazków plamistych występuje 50-cio węglowy solanesol i ubichinon 50 (23, 27).

Jedynych danych o możliwości kondensacji pirofosforanów poliprenoli z rdzeniem aromatycznym dostarczyli Stoffel i Martius (28). Stwierdzili oni, że w wyniku reakcji pomiędzy metylo-naftochinonem lub 5,6-metoksy-2-metylobenzochinonem i pirofosforanami alkoholi prenylowych, jak farnesol, geranylogeraniol i solanesol, powstają produkty, które wykazują maksimum absorpcji przy 275nm analogiczne do maksimum absorpcji chinonu. Reakcja kondensacji była katalizowana przez frakcję mitochondrialną z wątroby szczura. Autorzy nie stwierdzili analogicznej reakcji po podaniu pirofosforanu fitolu.

Prawdopodobnie pochodną poliprenoli jest także kauczuk. Poliprenole występują w większych ilościach w liściach roślin kauczukodajnych. Poliprenole z *Hevea brasiliensis* lub *Ficus elasticus* zawierają w cząsteczce jedynie 4 wiązania o konfiguracji *trans*, pozostałe natomiast o konfiguracji *cis*, podczas gdy kauczuk wytwarzany przez te rośliny uważany jest za związek, w którym wszystkie wiązania podwójne mają konfigurację *cis*. Jednak Waller (36) przypuszcza, że w cząsteczce kauczuku występuje kilka wiązań o konfiguracji *trans*, których obecność jest maskowana dużą przewagą wiązań podwójnych o konfiguracji *cis*. Uważa on, że chociaż kauczuk nazywany jest węglowodorem, w naturalnych warunkach występuje on prawdopodobnie w formie pirofosforanu alkoholu izoprenoidowego.

Dokładniej poznano udział poliprenoli bakteryjnych w biosyntezie ścian komórkowych. Prenole te występują głównie w formie pirofosforanów, wolny poliprenol wykryto jedynie w mikroorganizmach z rodzaju *Lactobacillus*. Według Schera i wsp. (26) pirofosforan poliprenylowy znajduje się w błonie bakteryjnej i działa jako akceptor fosforanów cukrów pochodzących z wodnego środowiska wewnątrzkomórkowego. Cząsteczka cukrowa zostaje dołączona do reszty fosforanowej prenylu, a następnie może wiązać drugą cząsteczkę cukrowca i w ten sposób powstaje łańcuch poliglikanów wchodzących w skład ściany komórkowej. Autorzy przeprowadzili *in vitro* biosyntezę mannanu stosując enzymy bakteryjne. Bezkomórkowy wyciąg *Micrococcus lysodeicticus* katalizuje włączanie mannozy z GDP-mannozy do mannozylofosfopoliprenolu i mannanu. Po podaniu znakowanej węglem ^{14}C GDP-mannozy radioaktywność jej szybko spada, a po 10 min znakowanie pochodnej prenylowej osiąga maksymalną wartość. Radioaktywność w mannanie wzrasta w sposób ciągły, ale wolniej niż w tej pochodnej i po 1 godzinie jeszcze nie osiąga maksimum. Zmiany ilościowe w radioaktywności poszczególnych związków, przedstawione na

rysunku 1, wskazują na istnienie między nimi bezpośrednich powiązań typu prekursor-produkt. Analiza składu prenylowego kompleksu lipidowo-cukrowego wykazała, że jest nim całkowicie nienasycony undekaprenol (91%) z dodatkiem dodeka- i dekaprenoli, zawierający dwa wiązania o konfiguracji *trans*.



Rys. 1. Dynamika syntezy poliprenylowej pochodnej mannozy, mannozyldwuglicerydu i mannanu z GDP-mannozy (wg 26)

Skład mieszaniny inkubacyjnej: preparat enzymatyczny z *Micrococcus lysodeicticus*, GDP-mannoza, bufor Tris-jabłczan, pH 8,5 i Tris-HCl, pH 7,6 w stosunku molowym około 20:1. ●—● GDP-mannoza, ×—× pochodna prenylowa, △—△ mannozyldwugliceryd, □—□ mannan (wg Schera i wsp. (26))

Higashi i wsp. (19) stwierdzili, że preparat enzymatyczny, otrzymany po lizie komórek *Micrococcus lysodeicticus*, syntetyzuje kompleks: lipid-pirofosforan-dwucukier-pięciopeptyd, produkt pośredni w biosyntezie glikopeptydów ścian komórkowych. Składnikiem lipidowym tego kompleksu jest, podobnie jak w syntezie mannanu, undekaprenol. W obecności ATP kompleks może wiązać egzogenną glicynę, przekształcając się w bardziej złożone glikopeptydy ściany bakteryjnej. Autorzy przeprowadzili również biosyntezę peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii *Staphylococcus aureus* używając preparatu enzymatycznego otrzymanego z tych bakterii i egzogennego undekaprenolu wyizolowanego z roślin. Inne prenole roślinne były znacznie słabszymi substratami w tej reakcji (18). Podobny udział związków poliprenylowych stwierdzili Wright i wsp. (43) w biosyntezie O-antygeny, składnika błon *Salmonella anatum* oraz Brooks, Baddiley i Douglas (3, 9) w biosyntezie poli N-acetyloglukozoaminy z błon *Staphylococcus lactis*.

Wyniki ostatnich prac nad biosyntezą peptydocukrów z wątroby szczura i wielocukrów ze ścian komórek roślinnych wskazują na udział

poliprenoli również w tych procesach. Behrens i Leloir (2) stwierdzili, że mikrosomalna frakcja z wątroby szczura katalizuje przeniesienie glukozy z UDP-glukozy na akceptor lipidowy, identyczny ze związkiem otrzymanym przez chemiczne ufosforylowanie dolicholu. Produktem reakcji jest dolicholomonofosfoglukoza, w której reszta fosforanowa pochodzi z fosforanu dolicholu, a glukoza powiązana jest z resztą fosforanową wiązaniem o konfiguracji β . Otrzymana pochodna jest substratem w reakcji z glicyloglicyną, katalizowanej przez enzymy mikrosomalne. Produktem tej reakcji jest prawdopodobnie peptydoglikan.

Villemez (35) wyodrębnił lipidowy związek pośredni w biosyntezie wielocukrowców ścian komórkowych siewek fasoli. Otrzymany związek jest chromatograficznie identyczny z mannilipidem wydzielonym z *Micrococcus lysodeicticus* (26). W wyniku hydrolizy kwasowej związek rozpada się na mannozo 1-fosforan i składnik tłuszczowcowy, którym jest, jak wykazała wstępna charakterystyka za pomocą spektroskopii masowej długołańcuchowy poliprenol (35).

Z zestawienia danych o udziale poliprenoli w biosyntezie peptydocukrów i wielocukrów, katalizowanej przez enzymy pochodzące zarówno z mikroorganizmów jak i organizmów roślinnych i zwierzęcych wynikałoby, że poliprenole są koenzymami niezbędnymi w tej reakcji.

LITERATURA

1. Allen C. M., Alworth W., Macrae A., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **242**, 1895 (1967).
2. Behrens N. H., Leloir L. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **66**, 153 (1970).
3. Brooks D., Baddiley J., *Biochem. J.* **115**, 307 (1969).
4. Burgos J., Hemming F. W., Penncock J. F., Morton R. A., *Biochem. J.* **88**, 170 (1963).
5. Butterworth P. H., Burgos J., Hemming F. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **114**, 398 (1966).
6. Butterworth P. H., Draper H. H., Hemming F. W., Morton R. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 646 (1966).
7. Butterworth P. H., Draper H. H., Hemming F. W., Pennock F. J., Morton R. A., *Biochem. J.* **89**, 32P (1963).
8. Butterworth P. H., Hemming F. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 503 (1968).
9. Douglas L. J., Baddiley J., *FEBS Letters* **1**, 114 (1968).
10. Dunphy P. J., Kerr J. D., Pennock J. F., Whittle K. J., Feeney J., *Biochim. Biophys. Acta* **136**, 136 (1967).
11. Goodwin T. W., w *Biosynthetic Pathways in Higher Plants*, red. J. B. Pridham, T. Swain, Academic Press, New York 1965, str. 66.
12. Gough D. P., Hemming F. W., *Biochem. J.* **105**, 10C (1967).
13. Gough D. P., Hemming F. W., *Biochem. J.* **117**, 309 (1970).
14. Gough D. P., Hemming F. W., *Biochem. J.* **118**, 163 (1970).

15. Gough D. P., Kirby A. L., Richards J. B., Hemming F. W., *Biochem. J.* **118**, 167 (1970).
16. Hemming F. W., *Biochem. J.* **113**, 23P (1969).
17. Hemming F. W., Morton R. A., Pennock F. R. S., Pennock J. F., *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* **158**, 291 (1963).
18. Higashi Y., Siewert G., Strominger J. L., *Federation Proc.* **27**, 294 (1968).
19. Higashi Y., Strominger J. L., Sweely Ch. C., *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.* **57**, 1878 (1967).
20. Jachymczyk W., *Post. Biochem.* **11**, 75 (1965).
21. Kandutsch A. A., Paulus H., Levin E., Bloch K., *J. Biol. Chem.* **239**, 2507 (1964).
22. Pennock J. F., Hemming F. W., Morton R. A., *Nature* **186**, 470 (1960).
23. Pennock J. F., Hemming F. W., Morton R. A., *Biochem. J.* **82**, 11P (1962).
24. Rowland R. L., Latimer P. H., *Tabaco Sci.* **3**, 1 (1959) wg S. Stone K. J., Hemming F. W., *Biochem. J.* **109**, 877 (1968).
25. Rowland R. L., Latimer P. H., Giles J. A., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4680 (1956).
26. Scher M., Lennarz W. J., Sweeley Ch. C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 1313 (1968).
27. Stevenson J., Hemming F. W., Morton R. A., *Biochem. J.* **88**, 52 (1963).
28. Stoffel W., Martius C., *Biochem. Z.* **333**, 440 (1960).
29. Stone K. J., Butterworth P. H., Hemming F. W., *Biochem. J.* **102**, 443 (1967).
30. Stone K. J., Hemming F. W., *Biochem. J.* **104**, 43 (1967).
31. Stone K. J., Hemming F. W., *Biochem. J.* **109**, 877 (1968).
32. Stone K. J., Wellburn A. R., Hemming F. W., Pennock J. F., *Biochem. J.* **102**, 325 (1967).
33. Thorne K. J. I., Kodicek E., *Biochem. J.* **99**, 123 (1966).
34. Toyoda M., Fukawa H., Shimizu T., *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **43**, 688 (1969).
35. Villemez C. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **40**, 636 (1967).
36. Waller G. R., w *Progress in The Chemistry of Fats and other Lipids*, red. R. T. Holman, Pergamon Press 1969, str. 199.
37. Wellburn A. R., Hemming F. W., *J. Chromatog.* **23**, 51 (1966).
38. Wellburn A. R. Hemming F. W., *Nature* **212**, 1364 (1966).
39. Wellburn A. R., Hemming F. W., *Phytochemistry* **5**, 969 (1966).
40. Wellburn A. R., Hemming F. W., *Biochem. J.* **104**, 173 (1967).
41. Wellburn A. R., Hemming; F. W., w *Biochemistry of Chloroplasts* red. T. W. Goodwin, Academic Press 1966, tom 1, str. 173.
42. Wellburn A. R., Stevenson J., Hemming F. W., Morton R. A., *Biochem. J.* **102**, 313 (1967).
43. Wright A., Dankert M., Fennessey P., Robbins P. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 1798 (1967).

EWA LENARTOWICZ *, STEFAN KLITA **

Bezpośrednia translacja DNA w układach bezkomórkowych

Direct Translation of DNA in the Cell-Free Systems

Some problems concerning the direct translation of DNA in the cell-free systems, occurring with omission of the transcription process are discussed.

Kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) zawiera zaszyfrowaną w sekwencji nukleotydów informację genetyczną dotyczącą budowy, a zatem i właściwości syntetyzowanych białek. W myśl współczesnych poglądów nie uczestniczy on jednak bezpośrednio w biosyntezie polipeptydu *in vivo*, lecz steruje tym procesem, determinując strukturę matrycy dla wytwarzanych białek. Tę bezpośrednią matrycę stanowi w komórce informacyjny RNA (mRNA) o sekwencji nukleotydów komplementarnej do odpowiednich odcinków nici DNA, genów. Mechanizm przekazywania informacji genetycznej jest tematem wielu prac przeglądowych (23, 24, 26, 27, 58).

Doświadczenia modelowe nad syntezą białek *in vitro* przeprowadza się zazwyczaj w układach bezkomórkowych, złożonych z rybosomów i układu enzymów syntetyzujących polipeptydy oraz odpowiednich soli, ATP, GTP i aminokwasów (42). W takim układzie można obserwować wbudowywanie radioaktywnych aminokwasów do frakcji białkowej. Jak dowodzą wyniki badań na układach bezkomórkowych matrycą dla syntezy białka mogą być jedynie polinukleotydy pozbawione struktury drugorzędowej (17, 33, 46, 54, 56), co oznacza przede wszystkim występowanie w formie jednoniciowej. Spełnienie tego warunku jest niezbędne dla wytworzenia specyficznego kompleksu polinukleotydu z rybosomami. *In vivo* warunek ten spełniany jest jedynie przez mRNA, bowiem zarówno RNA rybosomów (rRNA) jak przenoszący (tRNA) charakteryzują się bogatą strukturą dru-

* Dr, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Warszawa

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

Wykaz stosowanych skrótów: poli rU — kwas polirybouydylowy, poli dC — kwas polidezoksyrybocytydylowy, poli dA — kwas polidezoksyryboadenylowy, poli dTG — kopolimer kwasu dezoksyrybotymidylowego i dezoksyryboguaninylowego, poli dT — kwas polidezoksyrybotymidylowy, poli dAG — kopolimer kwasu dezoksyryboadenylowego i dezoksyryboguaninylowego, poli dAI — kopolimer kwasu dezoksyryboadenylowego i dezoksyryboinozynowego, poli dCA — kopolimer kwasu dezoksyrybocytydylowego i dezoksyryboadenylowego, poli rCA — kopolimer kwasu rybocytydylowego i ryboadenylowego

gorzędową, a DNA występuje w formie dwuniciowej spirali. Natomiast *in vitro*, kiedy możliwe jest podanie tych występujących w organizmie polinukleotydów w formie zdenaturowanej (co oznacza rozerwanie wiązań wodorowych między łańcuchami), mogą one odegrać rolę matrycy dla syntetyzowanych polipeptydów. Szczególnie interesujące wydaje się przekształcenie w tego rodzaju matrycę cząsteczki DNA ze względu na różnice strukturalne w stosunku do naturalnego mRNA: zastąpienie rybozy przez dezoksyrybozę i uracylu przez tyminę.

Stymulację włączania aminokwasów do białka przez DNA, bez jednoczesnego wzmocnienia syntezy RNA, zauważyli w 1961 roku Frenster, Allfrey i Mirsky (19) w układzie bezjądrowym z jąder grasicy. W kilka lat później zaobserwowano to zjawisko także w bezkomórkowych układach bakteryjnych (18) i roślinnych (11).

Proces bezpośredniej translacji DNA wykazuje odmienne właściwości w układach bezkomórkowych różnego pochodzenia. W układach bakteryjnych synteza polipeptydów zachodzi pod wpływem DNA wyłącznie jednociowego i jedynie w obecności neomycyny lub pokrewnych jej antybiotyków aminoglikozydowych. Natomiast w układach z jąder grasicy i z *Chlorella pyrenoidosa* matrycą mogą być także DNA dwuniciowe, a translacja ich zachodzi zarówno w nieobecności, jak w obecności neomycyny (tablica 1).

Tablica 1

Warunki dla bezpośredniej translacji DNA w układach bezkomórkowych różnego pochodzenia

Pochodzenie układu	DNA jako matryca		Działanie neomycyny
	Jednociowy	Dwuniciowy	
<i>Escherichia coli</i>	+	—	niezbędne
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	+	+	stymulujące
Jądra grasicy	+	słaba aktywność	bez wpływu

Translacja DNA, przynajmniej w układach bakteryjnych, przebiega analogicznie do translacji RNA, przy zachowaniu tego samego znaczenia kodonów, z udziałem tych samych czynników i tRNA w zapoczątkowaniu syntezy łańcucha polipeptydowego (tzw. inicjacji).

I. Translacja DNA w układach bakteryjnych

1. Wiązanie DNA z rybosomami

Podstawowym warunkiem specyficznej interakcji (czyli połączenia się) polinukleotydu z rybosomami jest brak drugorzędowej struktury w obrębie jego cząsteczki (17, 33, 46, 54, 56). Reguła ta odnosi się do wszystkich

badanych rybopolinukleotydów, tak naturalnych jak i syntetycznych, a także do znakomitej większości polidezoksyrybonukleotydów. Wydaje się zatem, że rodzaj reszty cukrowej (ryboza lub dezoksyryboza) nie ogranicza w sposób zdecydowany możliwości wiązania się polinukleotydu z rybosomem. Wyjątek stanowią jedynie nieliczne polidezoksyrybonukleotydy syntetyczne, co zostanie omówione w dalszej części artykułu.

Pierwsze dane o łączeniu się DNA z rybosomami bakterii przedstawili T a k a n a m i i O k a m o t o (1963) (55) opierając się na wynikach analizy sedymentacyjnej. Mieszaninę rybosomów (lub ich podjednostek) i radioaktywnego DNA o buforze z dodatkiem jonów Mg^{2+} (w stężeniu 5 mM) rozdzielano za pomocą wirowania w gradiencie sacharozy. Natywny DNA nie wchodził wcale w połączenie z rybosomami bądź tworzył „lekki” kompleks z co najwyżej trzema rybosomami. Dopiero po zniszczeniu struktury drugorzędowej DNA za pomocą formaldehydu wytworzył się właściwy kompleks polirybosomowy, co przejawiało się przesunięciem radioaktywności do frakcji cięższej od rybosomów. Wykazano ponadto, że DNA, podobnie jak RNA, wiąże się z podjednostką 30S rybosomów. Zjawisko to zaobserwowano w nieobecności antybiotyków; późniejsze badania (30, 50) wykazały, że neomycyna, niezbędna do translacji DNA w układach bakterijskich, nie ma wpływu na wiązanie z rybosomami ani DNA, ani RNA.

Dokładniejszą analizę przyłączania się DNA do rybosomów przeprowadzili S a l a s i B o l l u m (50) używając syntetycznych homopolidezoksyrybonukleotydów. Wykazali oni, że polidezoksyrybonukleotydy, podobnie jak ich analogi zawierające rybozę, łączą się z rybosomami tylko w obecności jonów Mg^{2+} , nie potrzeba natomiast w środowisku kationów jednowartościowych, źródła energii ani enzymatycznej frakcji białek rozpuszczalnych. Prawdopodobnie DNA i RNA przyłączają się do tego samego miejsca na rybosomie, o czym świadczy komeptycyjne hamowanie wiązania poli rU przez poli dC i jego analogi. Polidezoksyrybonukleotydy zawierające wyłącznie zasady pirymidynowe wykazują znacznie wyższe powinowactwo do rybosomów (równie niska stała dysocjacji kompleksu jak w przypadku poli rU) niż polimery z zasadami purynowymi, wśród których poli dA nie jest w ogóle przyłączany w pokojowej temperaturze. Zastąpienie atomów wodoru w poli dC podstawnikami alkilowymi drastycznie obniża jego zdolność do wiązania się z rybosomami, co mogłoby świadczyć o udziale mostków wodorowych tworzących się między pierścieniami zasad. W stanie wysycenia przez polidezoksyrybonukleotyd, stosunek poli dC do rybosomów (w molach) wynosi około 1 (jak w przypadku poli rU czy poli rC), a stosunek poli dT i dI do rybosomów jest w przybliżeniu o połowę niższy.

Tworzenie się polirybosomów *in vitro* z udziałem RNA faga f2 lub jednoniciowego DNA faga fd wymaga obecności N-formylometionylo-

-tRNA i GTP (4). Rodzaj komponentu cukrowego w polinukleotydzie jest więc bez znaczenia dla przebiegu specyficznej inicjacji *in vitro*.

Opisane polirybosomy zawierają wyłącznie rybosomy powiązane bezpośrednio z nicią DNA, czym różnią się one od kompleksów DNA-mRNA-rybosomy tworzących się *in vivo* w czasie syntezy RNA na matrycy DNA (2, 6, 48).

2. Zapoczątkowanie syntezy łańcucha polipeptydowego

Inicjacja, czyli zapoczątkowanie syntezy łańcucha polipeptydowego na matrycy DNA zachodzi podobnie jak na matrycy RNA. W przypadku mRNA specyficzna synteza polipeptydu rozpoczyna się od wytworzenia kompleksu złożonego z podjednostki 30S rybosomu, mRNA i inicjującego N-formylometionyl-tRNA (FM-tRNA), po czym zostaje dołączona podjednostka 50S. Kolejnym etapem jest przyłączenie następnego aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) i utworzenie pierwszego wiązania peptydowego (45). W roztworach o niskich stężeniach jonów Mg^{2+} (0,005 M), w których nie tworzą się niespecyficzne połączenia FM-tRNA_F z rybosomami, wiązanie tego tRNA do rybosomów uwarunkowane jest obecnością polinukleotydu (21).

Morgan i wsp. (35) zaobserwowali wiązanie się FM-tRNA_F do rybosomów po dodaniu do układu poli dTG. Proces ten przyspiesza neomycyna, podczas gdy wprowadzenie czynników inicjujących nie ma wpływu. Natomiast synteza kopolipeptydu kodowanego przez poli dTG (w 0,005 Mg^{2+}) zależy nie tylko od obecności FM-tRNA_F, ale również od czynników inicjujących, neomycyny oraz pozostałych składników układu włączającego aminokwasy do polipeptydu.

Wiązanie się FM-tRNA_F do rybosomów zaobserwował również Bretschner (4) po dodaniu do nie zawierającego neomycyny układu kolistego, jednoniciowego DNA faga fd oraz GTP. W tym przypadku trudno jest ocenić ilościowo rolę czynników inicjujących w procesie przyłączania FM-tRNA_F do kompleksu DNA faga fd z rybosomami, bowiem preparat rybosomowy zawierał te czynniki od początku. Zależność tego procesu od GTP świadczyłaby jednak o ich udziale w reakcji wiązania się FM-tRNA_F z kodonami inicjującymi fagowego DNA. Analiza produktu wykazała, że zapoczątkowanie syntezy łańcuchów peptydowych zachodzi tylko w ograniczonej liczbie specyficznych miejsc DNA.

Spośród dwóch tRNA specyficznych dla metioniny (tRNA_F i tRNA_M) jedynie ta forma, na której reszta metioniny może ulegać formylacji pełni funkcję inicjującego tRNA. Znakiem rozpoznawczym dla matrycy, zarówno RNA jak DNA oraz dla czynników inicjujących jest jednak nie sama obecność grupy formylowej, ale nieznanne jeszcze dokładnie różnice w strukturze tRNA obu tych rodzajów (7, 14, 35, 51). Na podobnej zasadzie

następuje rozróżnienie obu rodzajów tRNA specyficznego dla metioniny przez enzymy formylujące ten aminokwas. Proces ten zachodzi, jak dziś wiadomo, na etapie aminoacylo-tRNA (9, 28, 29).

3. Wiązanie się aminoacylo-tRNA z kompleksem DNA-rybosom

Specyficzne wiązanie aminoacylo-tRNA z rybosomami polega na wzajemnym rozpoznaniu i łączeniu kodonu matrycy polinukleotydu z odpowiadającym mu antykodonem tRNA. Matrycą wiążącą może być, prócz jednoniciowego RNA, również jednoniciowy DNA, co stwierdzono przy zastosowaniu syntetycznych polidezoksyrybonukleotydów (tablica 2A) (35). Uzyskane wyniki świadczą o specyficzności tego wiązania: poli dCA zawierający kodony dla histydyliny i treoniny wiąże histydylo-tRNA i treonilo-tRNA, a nie wiąże walilo-tRNA ani cysteilo-tRNA; doświadczenia z poli dTG i poli dT wykazały pełną równoznaczność uracylu i tyminy w kodonach matrycy. Nie łączący się z rybosomami poli dA (50) nie wzmaga także wiązania lizylo-tRNA (kodon AAA odpowiada lizynie). W tym przypadku natura komponentu cukrowego odgrywa istotną rolę, skoro poli rA tworzy kompleks z rybosomami wiążący lizylo-tRNA (43).

Gdy używa się jako matrycy syntetycznych polidezoksyrybonukleoty-

Tablica 2A i B

Wpływ syntetycznych polidezoksyrybonukleotydów i antybiotyków aminoglikozydowych na wiązanie aminoacylo-tRNA (aa-tRNA) do rybosomów w bezkomórkowym układzie z *E. coli*

A. Wpływ polidezoksyrybonukleotydów w obecności neomycyny (10 µg/ml) wg danych Morgana i wsp. (35)				B. Wpływ antybiotyków w obecności DNA łososia (0,5 mg/ml) wg danych Masukawy i Tanaki (30)	
Matryca	¹⁴ C-aa-tRNA	Związany ¹⁴ C-aa-tRNA (µmole)		Antybiotyk	Związany ¹⁴ C-aa-tRNA (imp/min)
		-Matryca	+Matryca		
poli dCA	Tre	0,66	3,70	—	1170
	His	0,54	6,65	Kanamycyna 10 µg/ml	1940
	Wal	0,73	0,41	Neomycyna 10 µg/ml	1860
	Cys	0,34	0,30		
poli dTG	Wal	0,73	4,07	Streptomycyna 20 µg/ml	1800
	Cys	0,32	2,11		
poli dT	Fen	0,36	2,40	Kasugamycyna 640 µg/ml	1120
poli dA	Liz	0,73	0,73		

dów neomycyna nie wpływa wyraźnie ani jednoznacznie na wiązanie aa-tRNA (35). Natomiast w obecności naturalnych DNA Masukawa i Tanaka (30) stwierdzili wzmożenie tego procesu przez antybiotyki (tablica 2B). Stymulatorami są antybiotyki aminoglikozydowe zawierające ugrupowanie streptaminy, jak kanamycyna, neomycyna, streptomycyna (tablica 2B). Natomiast kasugamycyna, nie zawierająca ugrupowania streptaminy, nie wpływa bezpośrednio na wiązanie aa-tRNA, znosi jednak działanie neomycyny i kanamycyny. Wzmożenie wiązania aa-tRNA przez antybiotyki mogłoby stanowić, zdaniem autorów, istotę ich wpływu na syntezę polipeptydów. Jednak fakty świadczą przeciwko tej hipotezie: połączenie aa-tRNA z matrycą DNA zachodzi także w nieobecności antybiotyków, a synteza polipeptydu uwarunkowana jest przez neomycynę również wtedy, gdy nie wpływa ona pobudzająco na wiązanie aa-tRNA (35).

O ile w obecności długołańcuchowych polidezoksyrybonukleotydów aa-tRNA wiążą się z rybosomami, to oligodezoksyrybonukleotydy w przeciwieństwie do ich analogów rybozowych, nie mają wpływu na ten proces (43). Fenyloalanylo-tRNA nie wiąże się z rybosomami w obecności syntetycznego oligonukleotydu d(T)₁₂, natomiast wiąże się w obecności nawet trójnukleotydu r(U)₃.

4. Synteza polipeptydów na matrycy DNA

DNA jako matryca. Proces syntezy polipeptydów na matrycy DNA w układach bakteryjnych opisali po raz pierwszy Holland i McCarty (1964) (18). Wykazali oni, że zdenaturowany DNA z komórek HeLa i komórek L myszy pobudza włączanie aminokwasów w bezkomórkowym układzie z *E. coli*. DNA z innych źródeł nie wykazywały tej własności. Okazało się później, że działanie DNA z komórek HeLa i L związane było z obecnością streptomycyny w pożywkach (31). Jednocześnie stwierdzono, że podobny wpływ wywierają zdenaturowane DNA różnego pochodzenia pod warunkiem obecności antybiotyków aminoglikozydowych w środowisku inkubacyjnym (tablica 3A). W przeciwieństwie do zdenaturowanego DNA natywny nie wpływa na syntezę białka niezależnie od podania antybiotyków. W wyniku denaturacji cieplnej, w miarę rozwijania się podwójnej spirali, DNA coraz silniej aktywuje syntezę białka (32).

Nie tylko brak struktury uporządkowanej czyli występowanie w postaci pojedynczej nici, lecz także skład zasad decyduje o możliwości kodowania aminokwasów przez DNA. Niezmiernie ważny jest stosunek zasad purynowych do pirymidynowych w jego łańcuchu (49). Badania z zastosowaniem syntetycznych polidezoksyrybonukleotydów dowiodły, że własności matrycy dla syntezy białka wykazują polimery złożone bądź wyłącznie z nukleotydów pirymidynowych (jak poli dT, poli dC), bądź polimery o stosunku zasad purynowych do pirymidynowych 1:1. Natomiast zarówno

Tablica 3A i B

Wpływ zdenaturowanego DNA różnego pochodzenia oraz niektórych antybiotyków aminoglikozydowych na włączanie ^{14}C -fenyloalaniny do polipeptydów w układzie z *E. coli*, wg danych Mc Carthy'ego i Hollanda (31)

A. Wpływ DNA różnego pochodzenia w obecności neomycyny (10 $\mu\text{g/ml}$)		B. Wpływ antybiotyków w obecności DNA łososia (0,8 mg/ml)	
DNA*	Włączenie ^{14}C -fenyloalaniny $\times 10^{-2}$ (imp/min.)	Antybiotyk	Włączenie ^{14}C -fenyloalaniny (imp/min)
	60	—	15
50 μg DNA łososia	267	10 μg neomycyny	363
60 μg DNA myszy	479	10 μg kanamycyny	129
50 μg DNA królika	484	10 μg streptomycyny	34
50 μg DNA ropuchy	426		

* objętość mieszaniny inkubacyjnej wynosiła 0,5 ml

homo- jak kopolidezoksyrybonukleotydy zawierające jedynie zasady purynowe (jak poli dA, poli dI i poli dAG, poli dAI) oraz kopolimery z przewagą zasad purynowych (np. w stosunku 2:1) nie mają wpływu na wbudowywanie aminokwasów do białka. Brak aktywności matrycowej poli dA i poli dI jest związany z niezdolnością tych polimerów do wiązania się z rybosomami (50), prawdopodobnie dotyczy to również polidezoksyrybonukleotydów z przewagą zasad purynowych.

W obecności neomycyny jednoniciowy DNA jest równie efektywną matrycą jak RNA; należy jednak pamiętać, że szybkość syntezy polipeptydów uwarunkowana jest, poza efektywnością matrycy, także aktywnością enzymów (zarówno uczestniczących w syntezie jak nukleolitycznych) w stosowanych układach bezkomórkowych. Przy niskiej aktywności nukleaz translacja DNA może zachodzić niemal liniowo nawet przez 90 minut (35). Szybkość tego procesu zwiększa się wraz z ilością podawanego DNA (4, 18, 32); na przykład w przypadku DNA z faga T2 włączanie fenyloalaniny do polipeptydu jest wprost proporcjonalne do stężenia DNA, przynajmniej do 600 $\mu\text{g/ml}$ przy 30 min. inkubacji (32).

Kodowanie aminokwasów przez DNA. W miarę postępu badań nad bezpośrednią translacją DNA *in vitro*, coraz większe zainteresowanie budził problem wierności odczytywania sekwencji trypletów w łańcuchu polidezoksyrybonukleotydowym. W 1965 roku Mc Carthy i Holland (31) zauważyli współzależność między składem zasad w naturalnych DNA i częstotliwością występowania poszczególnych aminokwasów w syntetyzowanym *in vitro* polipeptydzie. Obserwacja ta nasuwała przypuszczenie o jednakowym znaczeniu kodonów RNA i DNA, a także o równoznaczności uracylu i tyminy. Ta droga sprawdzania sensu trypletów kodu genetycz-

nego nie rokowała jednak nadziei wobec nieznamośći sekwencji nukleotydów w łańcuchach DNA. Nowe możliwości otworzyło dopiero opanowanie metod syntetyzowania *in vitro* matryc polidezoksyrybonukleotydowych, złożonych z jednakowych lub różnych zasad ściśle określonych pod względem składu i sekwencji (35). Okazało się wówczas, że poli dT, tak samo jak poli rU i, równie skutecznie, koduje fenyloalaninę (35, 49), a poli dC, podobnie jak poli rC, jest matrycą dla poliproliny (49). Poli dCA i poli dTG o naprzemiennej sekwencji zasad, analogicznie do odpowiadających im polimerów zawierających rybozę, wpływają na współzależną inkorporację dwu aminokwasów, tych samych, niezależnie od komponentu cukrowego (35). Wyniki tych i wielu innych doświadczeń wskazują, że znaczenie trypletów kodu genetycznego jest takie samo bez względu na rodzaj reszty cukrowej w łańcuchu polimeru, przy czym tymina i uracyl spełniają tę samą funkcję.

Zgodność kodowania aminokwasów przez matryce rybo- i dezoksyrybonukleotydowe jest tym bardziej godna uwagi, że te ostatnie wymagają obecności antybiotyków aminoglikozydowych w układach syntetyzujących polipeptydy *in vitro*. Od dawna było wiadome, że antybiotyki z tej grupy wywołują błędy podczas translacji matryc RNA. Streptomycyna powoduje dwuznaczność zasad pirymidynowych, a neomycyna może być przyczyną błędnego odczytania aż dwu zasad w tym samym kodonie (8). Jednakże wierność translacji DNA znacznie przewyższa wierność translacji odpowiadających im RNA w obecności neomycyny, a w niektórych przypadkach dorównuje translacji RNA w nieobecności antybiotyków (35). Poli dT w obecności neomycyny jest odczytywany tak samo jak poli rU, w jej nieobecności — oba polimery włączają do syntetyzowanej polifenyloalaniny nieznaczne ilości alaniny (35, 49). Translacja poli dCA okazała się abosolutnie wierna: żaden z dwu kodowanych aminokwasów nie może być zastąpiony przez inny (35). Taką wierność wykazuje poli rCA tylko w nieobecności antybiotyków, podczas gdy działanie neomycyny wprowadza do jego translacji cały szereg błędów. W przeciwieństwie do poli dCA, poli dTG przy braku cysteiny (TGT) może zamiast niej włączać argininę (CGT), a przy braku waliny (GTG) — alaninę (GCG), kwas glutaminowy (GAG) i glicynę (GGG). Błędy te nie są jednak związane z komponentem cukrowym matrycy, ponieważ w tych samych warunkach poli rUG przejawia podobną dwuznaczność o wyższym nasileniu (8). Ponadto, w przypadku poli dTG, dostępność aminokwasów właściwych dla jego kodonów znacznie redukuje włączanie innych aminokwasów (35). W obecności wszystkich aminokwasów, żaden spośród pięciu badanych polidezoksyrybonukleotydów o skewencje nie uporządkowanej nie kodował aminokwasów odpowiadających kodonom o zasadach nie występujących w matrycy (49).

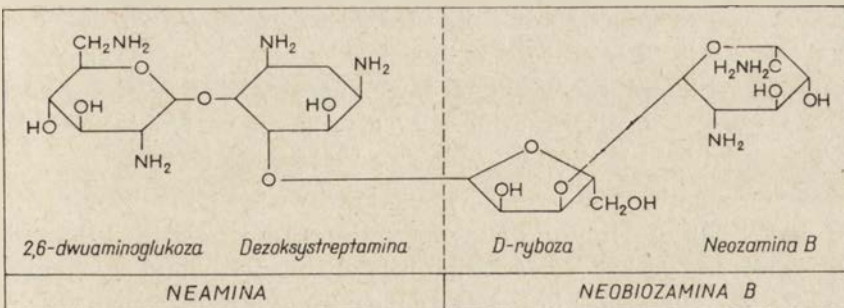
Dane te wskazują, że DNA w obecności neomycyny stanowi pełnowartościową matrycę, odczytywaną zgodnie z ustalonym przez Nirenberga dla

RNA układem kodonów i zachowującą w znacznym stopniu wierność translacji.

Brak udziału informacyjnego RNA przy translacji DNA. Identyczność kodu przy translacji RNA i DNA jest wystarczającym dowodem funkcjonowania DNA jako bezpośredniej matrycy dla syntezy peptydów, z pominięciem etapu transkrypcji. Wiadomo ponadto, że matrycą dla syntezy mRNA z udziałem zależnej od DNA polimerazy RNA jest właśnie natywna, dwuniciowa postać DNA. Co więcej, jednoniciowy DNA jest inhibitorem biosyntezy mRNA (33). Stymulowana przez DNA *in vitro* synteza polipeptydów jest tylko w znikomym stopniu wrażliwa na obecność aktywnomycyny D (inhibitor transkrypcji) (18, 32, 33), lecz skutecznie hamują ją inhibitory translacji, jak puromycyna czy chloramfenikol (18, 33), a także dezoksyrybonukleaza (33).

Wpływ antybiotyków. Spośród badanych antybiotyków (tablica 3B) najefektywniejszym aktywatorem bezpośredniej translacji DNA okazała się neomycyna (31, 33, 35), a w słabszym stopniu działają kanamycyna, streptomycyna (30, 31, 33) i gentamicyna (35). Wszystkie te antybiotyki hamują prawidłową syntezę białka oraz wywołują lub wzmagają dwuznaczność translacji RNA (33). Należąca do tej samej grupy spektynomycyna, antybiotyk nie zakłócający wierności translacji RNA, nie stymuluje także translacji DNA.

W celu ustalenia jakie ugrupowania strukturalne antybiotyku aktywują translację DNA, badano działanie poszczególnych produktów rozpadu neomycyny (I). Okazało się, że o ile sama dezoksyestreptamina pozostaje nieaktywna, to połączenie jej z dwuaminoglukozą tzw. neamina już stymuluje translację DNA, chociaż słabiej niż nienaruszona neomycyna. Zablockowanie pierwszorzędowych grup aminowych zarówno w neaminie jak neomycynie całkowicie znosi tę aktywność (33).



I

Dla uaktywnienia DNA jako matrycy w syntezie polipeptydów wystarczający jest kontakt antybiotyku z samym DNA: już działanie streptomycyną przez 20 minut nadaje DNA własności matrycowe (31). Jest to

przyczyną stymulacji syntezy białka przez DNA wyodrębniony z różnych tkanek hodowanych w obecności antybiotyków aminoglikozydowych (32). W hodowlach antybiotyki przenikają do jądra komórek, gdzie zachodzi *in vivo* asocjacja z DNA. Połączenie takie pozwala cząsteczce DNA zachować własności matrycowe nawet po gotowaniu i traktowaniu alkaliami, jest zatem bardzo trwałe. Produkty trawienia DNA z aktywnego DNA mogą (po zniszczeniu enzymu przez zagotowanie) przekazać własności matrycowe jednoniciowemu DNA. Na tej podstawie McCarthy i Holland (32) twierdzą, że aktywność matrycowa nie jest zależna od wewnętrznych właściwości samego DNA, lecz jest uwarunkowana przyłączeniem się do niego odpowiedniego antybiotyku. Hipotezę tę potwierdzają dane Zimmera i wsp. (59) wykazujące wysokie powinowactwo antybiotyków streptomycynopodobnych do DNA, z którym przy niskiej sile jonowej wiążą się za pośrednictwem reszt fosforanowych, a w wyższych stężeniach tworzą nierozpuszczalny kompleks.

Uaktywnienie DNA jako matrycy przez asocjację z antybiotykiem nie wyklucza możliwości, że zasadnicze dla translacji DNA działanie antybiotyków dotyczy rybosomów, a nie DNA. Ewentualność ta wydaje się bardziej prawdopodobna z punktu widzenia współczesnej wiedzy o działaniu antybiotyków. Wskazywałby też na to fakt, że uwarunkowanie translacji DNA przez antybiotyki jest ograniczone do bakteryjnego typu rybosomów i nie występuje w wypadku rybosomów z jąder grasicy (40) czy glonu *Chlorella* (13). A zatem uaktywniony DNA mógłby pełnić funkcję tylko przENOŚNIKA cząsteczek antybiotyku. Jak wiadomo antybiotyki streptomycynopodobne wiążą się z podjednostką rybosomalną 30S (20), wpływając na fizyczne własności rybosomów (25) i mechanizm translacji (34). Jedno z białek podjednostki 30S, ulegając zmianom funkcjonalnym, decyduje o wrażliwości czy odporności szczepu bakterii względem tych antybiotyków (1, 47). Rybosomy pochodzące ze szczepów opornych na streptomycynę nie wiążą streptomycyny i nie ulegają jej działaniu (20, 47). A zatem jeśli translacja DNA mogła zachodzić w układach ze szczepów opornych na antybiotyki aminoglikozydowe, oznaczałoby to, że związki te działają wyłącznie na DNA. Niestety, ze względu na rozbieżność danych (33, 35) kwestii tej nie można uznać za rozstrzygniętą.

W nieobecności antybiotyków w układach bakteryjnych jednoniciowy DNA nie tylko nie stymuluje syntezy polipeptydów, ale blokując miejsca wiążące matrycę na rybosomach, hamuje endogenne wbudowywanie aminokwasów (30, 40). Ostatnio Bretschler (5) wykazał za pomocą analizy autoradiograficznej, że w nieobecności antybiotyków i w wąskim zakresie stężenia jonów Mg^{2+} (7—11 mM) syntetyzowane są na matrycy DNA dwupeptydy (połączenia formylometioniny z różnymi aminokwasami). W tych warunkach może więc tworzyć się wiązanie peptydowe, ale kompleks jest tak niestabilny, że już dwupeptydy są uwalniane. Wiadomo

zatem, że antybiotyki nie są potrzebne ani do wiązania DNA z rybosomami (30, 50, 55), ani do przyłączenia aa-tRNA do powstałego kompleksu (30, 35), ani do wytworzenia wiązania peptydowego (5). Jeżeli jednak w ich nieobecności nie dochodzi do syntezy polipeptydów, a już dwupeptydy zostają uwalniane, być może ułatwiają one translokację czyli przemieszczanie się rybosomów wzdłuż nici DNA (31, 35) lub podnoszą stabilność kompleksu mającego utrzymać rosnący łańcuch peptydowy (5). Efekt ten mógłby być związany ze zmianami konformacyjnymi i funkcjonalnymi, którym ulegają pod wpływem antybiotyków aminoglikozydowych rybosomy, a szczególnie podjednostka 30S (1, 34, 47, 52, 53).

Uaktywnianie funkcji matrycowych przez neomycynę nie ogranicza się do DNA, ale ma charakter bardziej uniwersalny. Neomycyna umożliwia translację wielu polinukleotydów nie wykazujących w innych warunkach własności matrycowych (17, 33). Pod jej wpływem mogą być wykorzystane jako matryce RNA rybosomalny i przenoszący, których aktywność wielokrotnie wzrasta po denaturacji cieplnej. Również polirybonukleotydy o strukturze drugorzędowej, na przykład poli C, i dlatego wykazujące bardzo słabe działanie matrycowe, ulegają aktywacji w obecności neomycyny. Podobnej aktywacji ulegają też polimery z grupami metylowymi (jak poli N₁-metylo-rA czy poli N₃-metylo-rU), które to podstawniki znacznie osłabiają funkcje matrycowe. Można z tych danych wywnioskować, że neomycyna zmniejsza niektóre ograniczenia wynikające ze struktury matrycy i w efekcie pobudza translację polinukleotydów nieodczytywanych w innych warunkach. Należy jednak pamiętać, że neomycyna i pokrewne jej antybiotyki aminoglikozydowe *in vivo* skutecznie hamują syntezę białka, a *in vitro* translację matryc polirybonukleotydowych, zarówno naturalnych jak syntetycznych, i z reguły zniekształcają treść kodu RNA.

II. Translacja DNA w bezkomórkowym układzie z glonu

Chlorella pyrenoidosa

Bezpośrednią translację DNA w materiale pochodzenia roślinnego opisano jedynie w układzie z glonu *Chlorella pyrenoidosa*. Dane na ten temat pochodzą wyłącznie z prac Gallinga (11, 12, 13). W odróżnieniu od układów bakteryjnych w układzie z *Chlorella* matrycą dla syntezy białka może być zarówno DNA jednoniciowy jak dwuniciowy. W obu przypadkach translacja DNA może zachodzić w nieobecności antybiotyków aminoglikozydowych, które wywierają tylko wpływ stymulujący.

Rybosomy *Chlorella*, w przeciwieństwie do bakteryjnych, zdolne są do tworzenia kompleksu z dwuniciowym DNA (13). Po inkubacji układu bezkomórkowego z natywnym, znakowanym DNA odnaleziono 40% po-

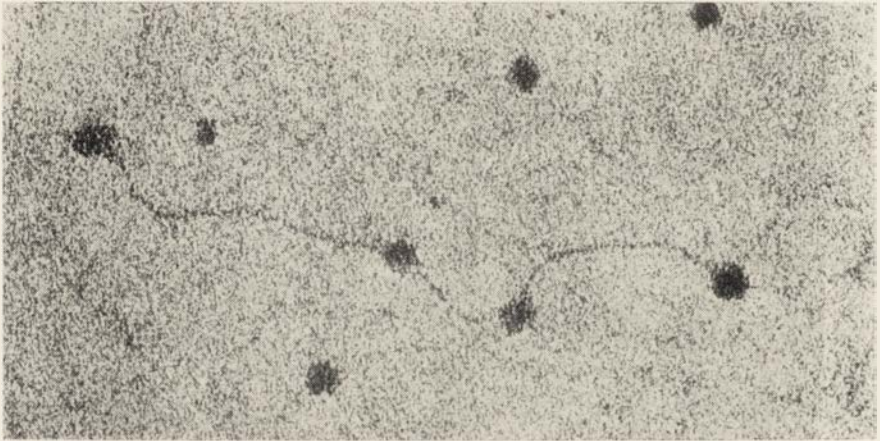
danej radioaktywności we frakcji rybosomalnej. Polisomy wyodrębnione z tej frakcji dają w mikroskopie elektronowym charakterystyczny obraz nierozgałęzionej nici połączonej z pojedynczymi rybosomami (rysunek 1). Grubość łańcucha łączącego rybosomy wskazuje na dwuniciową formę cząsteczki DNA. Jest to forma DNA ulegająca transkrypcji, jednakże kompleks ten tworzy się także w obecności aktynomycyny D i przedstawia obraz całkowicie różny od obrazów obserwowanych w przypadku kompleksu DNA-RNA-rybosomy (2, 48), w którym pojedyncze rybosomy lub ich ugrupowania połączone są z nicią DNA za pośrednictwem odchodzących od niej w formie odgałęzień nici RNA. Dotychczasowe badania nad interakcją polinukleotydów z rybosomami wykazują, że drugorzędowa struktura polinukleotydów stanowi przeszkodę w tym wiązaniu i praktycznie w kompleksy mogą wchodzić jedynie formy jednoniciowe. Jednakże w dwu przypadkach po infekcji komórek bakteryjnych fagami znaleziono odporne na działanie rybonukleazy polisomy złożone z kilku lub kilkunastu rybosomów i dwuniciowego RNA (15, 19). Przyczyny umożliwiające w niektórych przypadkach wiązanie z rybosomami polinukleotydów dwuniciowych nie są dotychczas wyjaśnione.

Dwuniciowy DNA nie tylko wchodzi w kompleks z rybosomami *Chlorella*, ale staje się wówczas równie efektywną matrycą dla syntezy polipeptydów jak DNA zdenaturowany (11). Działanie to, proporcjonalne do ilości, wykazują DNA z różnych źródeł. W obecności DNA w dużych stężeniach (250 μ g/ml) szybkość włączania aminokwasów wzrasta 3-4-krotnie. Na włączanie aminokwasów wpływa aktywująco uprzednie traktowanie rybosomów *Chlorella* 1% dezoksychohanem, co jednocześnie hamuje translację natywnego RNA (11, 12).

Zachodząca pod wpływem DNA synteza polipeptydów w układzie z *Chlorella* jest niezależna od podania CTP i UTP oraz tylko w nieznacznym stopniu wrażliwa na działanie rybonukleazy (13). Aktynomycyna nie działa na ten proces, natomiast chloramfenikol (działający na etapie translacji) hamuje go. Fakty te wykluczają możliwość transkrypcji i wskazują tym samym na bezpośrednią translację DNA.

Chociaż translacja DNA w układzie z *Chlorella* nie wymaga obecności żadnych antybiotyków, to jednak ulega ona silnej aktywacji pod wpływem neomycyny (13). Przy stężeniu neomycyny 125 μ g/ml i jednoczesnej obecności DNA, poziom włączania aminokwasów do polipeptydów podnosi się aż 28-krotnie. Kinetyka włączania aminokwasów w tych warunkach jest jednak całkowicie inna niż w układzie nie zawierającym neomycyny i wykazuje podobieństwo do kinetyki translacji poli rU.

Zdolność do bezpośredniej translacji DNA nie jest ogólną właściwością rybosomów glonów. Układ bezkomórkowy z glonu *Anacystis nidulans* odpowiada wzmożoną syntezą białka na podanie RNA, nie reaguje jednak na podanie DNA (12).



Rys. 1. Polirybosom utworzony z rybosomów połączonych z dwuniciowym DNA.
Powiększenie 304 000× (13)

III. Translacja DNA w bezjądrowych układach z jąder grasicy

Wiadomości o bezpośredniej translacji DNA *in vitro* w materiale pochodzenia zwierzęcego dotyczą wyłącznie bezjądrowego układu z jąder grasicy. W układzie tym jednoniciowa forma DNA jest efektywniejszą matrycą dla syntezy białka niż dwuniciowa (38). W przeciwieństwie do innych znanych układów, w układzie zawierającym materiał z jąder grasicy neomycyna nie ma żadnego wpływu na stymulowane przez DNA wbudowywanie aminokwasów (40).

Rybosomy z jąder grasicy zdolne są do tworzenia kompleksów z DNA różnego pochodzenia, zarówno natywnym jak zdenaturowanym (36). Podobną zdolność wykazują także cytoplazmatyczne rybosomy z grasicy, wątroby i retikulocytów (41). Naturalny RNA lub poli rU hamuje przyłączanie DNA do rybosomów, z czego można wywnioskować, że DNA dzieli z RNA miejsce wiążące na rybosomach.

W układzie zawierającym rybosomy i frakcję pH 5 z jąder grasicy DNA zdenaturowany, a w słabszym stopniu również DNA natywny, stymuluje wbudowywanie aminokwasów (10, 38, 40). Neomycyna nie ma wpływu na ten proces (40). Szybkość syntezy białka wzrasta wraz z ilością dodawanego DNA aż do stężenia wysycającego miejsca wiążące na rybosomach (około 190 µg RNA/mg rybosomów) (38). Działanie DNA w układzie z grasicy jest wielokrotnie słabsze niż w układach bakteryjnych. W pewnej mierze może to być związane z ogólnie niższą aktywnością układów bezkomórkowych z tkanek ssaków, co obserwowano także w obecności matryc RNA (3, 22, 44).

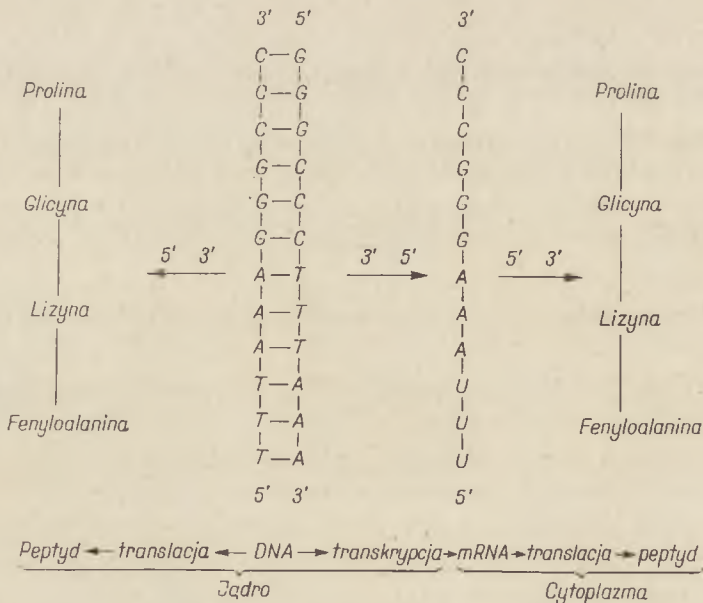
Porównanie stosunku włączania poszczególnych aminokwasów przez DNA o różnych składach zasad wskazuje, że tryplet adeninowy koduje lizynę, a tymidynowy — fenyloalaninę. Oznacza to, że kodony DNA są odczytywane jako równoznaczne z kodonami RNA (przy czym tymina zastępuje uracyl). A zatem DNA w bezjądrowym układzie z jąder grasicy, podobnie jak w układach bakteryjnych zawierających neomycynę, stanowi bezpośrednią matrycę dla syntezy polipeptydów (38).

Brak udziału informacyjnego RNA w syntezie białka stymulowanej przez DNA potwierdzają dodatkowo następujące właściwości tego procesu: 1) niewrażliwość na aktynomycynę D, 2) niezależność od podania CTP i UTP, 3) brak wzmożenia syntezy RNA, 4) wyższa efektywność DNA jednoniciowego niż dwuniciowego (37, 38).

Różnice między układami bakteryjnymi i układem grasicowym w wykorzystywaniu DNA jako matrycy związane są głównie z naturą samych rybosomów (40). Badania układów heterologicznych z jąder grasicy i komórek *E. coli* wykazały, że niezależnie od pochodzenia współdziałających enzymów, translacja DNA w przypadku rybosomów grasiczych zachodzi bez udziału neomycyny i jest niewrażliwa na wysokie stężenia sRNA,

podczas gdy w wypadku rybosomów bakteryjnych niezbędne są antybiotyki aminoglikozydowe, a translacja jest hamowana przez nadmiar sRNA.

W związku z możliwością występowania dwu mechanizmów syntezy białka *in vivo*, Na o r a (39) wysuwa hipotezę, według której w chromosomach informacja genetyczna byłaby odczytywana jednocześnie z obu nici DNA dwiema różnymi drogami. W proponowanym modelu zakłada się, że podczas gdy jedna z nici DNA ulega transkrypcji z udziałem polimerazy RNA zależnej od DNA i następuje przejściowe rozłączenie obu nici na odcinku około 170Å, druga nić wiąże się z rybosomami i staje się bezpośrednią matrycą dla syntezy białka. Ponieważ informacyjny RNA i nie ulegająca transkrypcji nić DNA zawierają te same kodony w tej samej sekwencji, a kierunek translacji obu matryc jest jednakowy (5'— — — 3'), syntetyzowane na nich polipeptydy byłyby identyczne pod względem składu i sekwencji aminokwasów, a także polarności wiązań peptydowych (schemat 1). Pewne białka, jak γ -globuliny, hemoglobina, dehydrogenaza mleczanowa, czy histony, syntetyzowane są również w jądrze i można by przypuszczać, że uczestniczy w tych procesach DNA. Nie jest to jednak dowód przesadzający o wykorzystywaniu drugiej, nie ulegającej transkrypcji nici DNA jako bezpośredniej matrycy dla syntezy białek. Obecność pewnych białek zarówno w cytoplazmie, jak w jądrze może być rezultatem działania tego samego, typowego mechanizmu biosyntezy białka z udziałem mRNA jako matrycy. Wydaje się, że mechanizm syntezy białka proponowany przez Na o r e, chociaż dotychczas nie udowodniony, teoretycznie jest możliwy.



Schemat 1. Synteza białka wg modelu Na o r y (39)

Uwagi końcowe

Wydawać by się mogło, że możliwość bezpośredniej translacji DNA *in vitro*, której przykłady opisano w niniejszej pracy, burzy dotychczasowy model ciągu reakcji prowadzących do syntezy łańcucha polipeptydowego. W rzeczywistości jednak mamy tu do czynienia z nietypowym zjawiskiem, z reakcją przebiegającą *in vitro* w warunkach całkowicie odmiennych od tych, jakie znamy lub możemy przewidywać w żyjącej komórce. Aby cząsteczka DNA mogła pełnić rolę bezpośredniej matrycy dla polipeptydu syntetyzowanego w bezkomórkowych układach bakteryjnych, przede wszystkim musi ona być w formie jednoniciowej, a ponadto niezbędny jest antybiotyk z grupy aminoglikozydowych. Wiadomo tymczasem, że natywny DNA charakteryzuje się strukturą dwuniciową, a jedynie u pewnej części małych bakteriofagów znajdujemy, jako materiał genetyczny, jednoniciowy DNA (16). A zatem cząsteczka natywnego DNA, występująca *in vivo* w stanie dużego uporządkowania, nie spełnia warunków charakteryzujących matrycę dla syntezy polipeptydu u bakterii. Dalszą barierą jest udział antybiotyku w bezpośrednim odczytywaniu kodonów pojedynczej nici DNA. Można wprowadzić założenie istnienia w komórce czynnika o podobnym typie działania, choć nie będącego antybiotykiem, dotychczas jednak brak wiadomości choćby o próbach wykrycia go.

Trudno także, przynajmniej na podstawie dotychczasowego stanu badań, wyciągnąć ogólniejsze wnioski z wyników badań nad bezpośrednią translacją DNA w układach z organizmów eukariotycznych. Wiązanie się z rybosomami natywnej cząsteczki DNA, a także stymulowanie włączania aminokwasów przez dwuniciową matrycę, jest w kontekście naszych pojęć o mechanizmie syntezy białka rewelacją. Dotychczasowe dane ograniczają się jednak tylko do układów z *Chlorella pyrenoidosa*, oraz — ale już z gorszym rezultatem — z jąder grasicy. Poza tym, wyniki prac nad *Chlorella pyrenoidosa* nie dają się powtórzyć w układzie otrzymanym z innego glonu (*Anacystis nidulans*), co nie pozwala na nadanie tym zjawiskom cech uniwersalności w odniesieniu do eukariontów.

Jakie są zatem korzyści wyniesione przez biochemię molekularną z badań nad własnościami matrycowymi jednoniciowych DNA w układach bakteryjnych? Przede wszystkim uzyskano niejako wtórne potwierdzenie znaczenia wszystkich 64 trypletów kodu genetycznego. Następnie — znacznie wyższa wierność odczytywania matrycy DNA niż RNA w obecności antybiotyków aminoglikozydowych daje możliwość pogłębienia badań nad tak intrygującym zjawiskiem, jak dwuznaczność kodu genetycznego. I wreszcie — prawdopodobieństwo, że translację jednoniciowego DNA warunkuje wywołana przez antybiotyk zmiana konformacji rybosomu, stwarza szansę bardziej wnikliwego poznania jego struktury i funkcji.

LITERATURA

1. Birge E. A., Kurland C. C., *Science* **166**, 1282 (1969).
2. Bladen H. A., Byrne R., Levin J. G., Nirenberg M. W., *J. Mol. Biol.* **11**, 78 (1965).
3. Bloemendal H., Bont W. S., Meisner J., *Nature* **209**, 1204 (1966).
4. Bretscher M. S., *Nature* **220**, 1088 (1968).
5. Bretscher M. S., *J. Mol. Biol.* **42**, 595 (1969).
6. Byrne R., Levin J. G., Bladen M. A., Nirenberg M. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 140 (1964).
7. Clark B. F. C., Marcker K. A., *J. Mol. Biol.* **17**, 394 (1966).
8. Davies J., Jones D. S., Khorana H. G., *J. Mol. Biol.* **18**, 48 (1966).
9. Dickerman H. W., Steers E., Redfield B. G., Weissbach H., *J. Biol. Chem.* **242**, 1522 (1967).
10. Frenster J. H., Allfrey V. G., Mirsky A. E., *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 130 (1961).
11. Galling G., *Z. Naturforsch., Sect. B.* **22**, 348 (1967).
12. Galling G., *Z. Naturforsch., Sect. B.* **22**, 687 (1967).
13. Galling G., *Z. Naturforsch., Sect. B* **24**, 321 (1969).
14. Ghosh H. P., Söll D., Khorana H. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 2455 (1967).
15. Godson G. N., Sinsheimer R. L., *J. Mol. Biol.* **23**, 495 (1967).
16. Hamilton L. D., Barclay R. K., Wilkins M. H. F., Brown G. L., Wilson H. R., Marvin D. A., Ephrussi-Taylor H., Simmons N. S., *J. Biochem. Cytol.* **5**, 397 (1959).
17. Holland J. J., Buck C. A., McCarthy B. J., *Biochemistry* **5**, 358 (1966).
18. Holland J. J., McCarthy B. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **52**, 1554 (1964).
19. Hotham-Iglewski B., Franklin R. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 743 (1967).
20. Kaji H., Tanaka Y., *J. Mol. Biol.* **32**, 221 (1968).
21. Kondo M., Eggertsson G., Eisenstadt J., Lengyel P., *Nature* **220**, 368 (1968).
22. Lengyel P., *J. Gen. Physiol.* **49**, 305 (1966).
23. Lengyel P., Söll D., *Bacteriol. Rev.* **33**, 264 (1969).
24. Lengyel P., Speyer J. F., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **47**, 1936 (1961).
25. Leon S. A., Broch T. D., *J. Mol. Biol.* **24**, 391 (1967).
26. Lipmann F., w Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis, red. V. V. Koningsberger i L. Bosch, Elsevier Publ. Comp. Amsterdam 1967, str. 177.
27. Lipmann F., *Science* **164**, 1024 (1969).
28. Marcker K., *J. Mol. Biol.* **14**, 63 (1965).
29. Marcker K., Sanger F., *J. Mol. Biol.* **8**, 835 (1964).
30. Masukawa H., Tanaka N., *J. Biochem. (Tokyo)* **62**, 202 (1967).
31. McCarthy B. J., Holland J. J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 380 (1965).
32. McCarthy B. J., Holland J. J., *Biochemistry* **5**, 1633 (1966).
33. McCarthy B. J., Holland J. J., Buck C. A., *Cold Spring Harbor Symp.* **31**, 683 (1966).
34. Modolell J., Davis B. D., *Nature* **224**, 345 (1969).

35. Morgan A. R., Wells R. D., Khorana H. G., *J. Mol. Biol.* **26**, 477 (1967).
36. Naora H., *Biochim. Biophys. Acta* **61**, 588 (1962).
37. Naora H., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 437 (1966).
38. Naora H., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 151 (1966).
39. Naora H., *J. Theoret. Biol.* **19**, 183 (1968).
40. Naora H., Kadaira K., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 425 (1966).
41. Naora H., Naora H., *Biochim. Biophys. Acta* **134**, 277 (1967).
42. Nirenberg M. W., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, 1964, tom 6, str. 17.
43. Nirenberg M. W., Leder P., *Science* **145**, 1399 (1964).
44. Nirenberg M. W., Matthaei J. H., Jones O. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **48**, 104 (1962).
45. Nomura M., Lowry C. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 946 (1967).
46. Okamoto T., Takanami M., *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 266 (1963).
47. Ozaki M., Mizushima S., Nomura M., *Nature* **222**, 333 (1969).
48. Revel M., Herzberg M., Becarevic A., Gros F., *J. Mol. Biol.* **33**, 231 (1968).
49. Salas J., Bollum F. J., *J. Biol. Chem.* **243**, 1012 (1968).
50. Salas J., Bollum F. J., *J. Biol. Chem.* **244**, 1152 (1969).
51. Salas M., Hille M. B., Last J. A., Wahba A. J., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **57**, 387 (1967).
52. Shernian M. I., Simpson M. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **64**, 1388 (1969).
53. Strigini P., Gorini L., *J. Mol. Biol.* **47**, 517 (1970).
54. Szer W., Ochoa S., *J. Mol. Biol.* **8**, 823 (1964).
55. Takanami M., Okamoto T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **13**, 297 (1963).
56. Takanami M., Okamoto T., *J. Mol. Biol.* **7**, 323 (1963).
57. Wood W. B., Berg P., *J. Mol. Biol.* **9**, 425 (1964).
58. Zagórska L., *Post. Biochem.* **14**, 537 (1968).
59. Zimmer Ch., Triebel H., Thrum H., *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 742 (1967).

EUGENIUSZ GAŚSIOR *

Inicjacja biosyntezy białka u organizmów eukariotycznych

Initiation of Protein Biosynthesis in Eucariotic Organisms

The recent view on the mechanism of the polypeptide chain initiation in eucariotic organisms is presented.

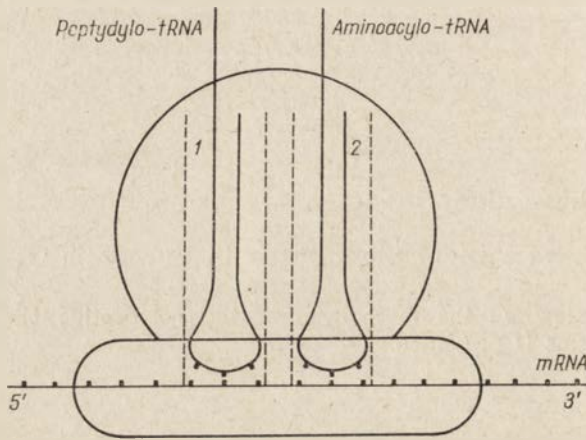
Prawidłowe odczytywanie informacji genetycznej zabezpiecza obecność kodonu startowego, znajdującego się na końcu lub w pobliżu końca 5', informacyjnego RNA. W układach bakteryjnych funkcję kodonu startowego pełni tryplet AUG (8), a także GUG, które rozpoznawane są przez odpowiedni aminoacylo-tRNA — inicjator. Jest nim wykryty przez *Marcera i Sanger*a (29) N-formylometionylo-tRNA. Komórki bakteryjne zawierają dwa akceptory metioniny: tRNA_F i tRNA_M (9). Oba te związki różnią się wyraźnie funkcją biologiczną, przy nieznacznych różnicach w składzie nukleotydowym i strukturze przestrzennej. Jedynie w połączeniu z tRNA_F metionina ulega enzymatycznej formylacji i powstały kompleks spełnia funkcję inicjatora biosyntezy białka, czego wynikiem jest umieszczenie N-formylometioniny w położeniu N-końcowym syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego. Metionylo-tRNA_M rozpoznaje również kodon AUG, ale tylko w przypadku, kiedy znajduje się on wewnątrz łańcucha mRNA. W procesie syntezy białka bakteryjnego metionina z metionylo-tRNA_M wbudowuje się w położenie wewnętrzne powstającego polipeptydu (28).

W świetle ostatnich badań zapoczątkowanie syntezy białka w układach bakteryjnych przebiegałoby w następujących etapach (16, 18, 36, 41, 42):

1. przyłączenie N-formylometionylo-tRNA do kompleksu: podjednostka 30S-mRNA. W niskich stężeniach jonów magnezowych proces ten katalizowany jest przez dwa czynniki białkowe F₁ i F₂, oraz GTP. W przyłączeniu naturalnego mRNA do podjednostki 30S uczestniczy ponadto dodatkowy czynnik enzymatyczny F₃.
2. do powstałego kompleksu — 30S-mRNA-N-formylometionylo-tRNA dołącza się następnie, w reakcji nieenzymatycznej, podjednostka 50S.

* Doc. dr, Instytut Mikrobiologii i Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Pewne dane (6) wskazują na to, że inicjatorowy tRNA umieszcza się w miejscu donatorowym rybosomu (schemat 1).



Schemat 1. Model rybosomu

1. Miejsce donatorowe lub peptydowe, 2. Miejsce akceptorowe lub aminokwasowe

W powstałym kompleksie wolne miejsce akceptorowe może zajmować aminoacylo-tRNA, którego przyłączenie stymuluje czynnik T i GTP (14), a specyficzność wiązania gwarantuje skład odpowiedniego trypletu sąsiadującego z kodonem startowym. Utworzenie pierwszego wiązania peptydowego następuje po przeniesieniu reszty N-formylometioniny na aminoacylo-tRNA. W reakcji tej uczestniczy transferaza peptydylowa, integralny składnik podjednostki 50S rybosomu (35), katalizująca utworzenie wiązania między grupą aminową aminoacylo-tRNA a grupą karboksylową N-formylometioniny. W dalszej reakcji N-formylometionilo-aminoacylo-tRNA przenoszony jest w obecności czynnika G i GTP do miejsca donatorowego w reakcji translokacji (11), z jednoczesnym przesunięciem mRNA o jeden tryplet. Do miejsca akceptorowego może przyłączać się nowy aminoacylo-tRNA i powtarza się proces wydłużania łańcucha polipeptydowego. Zakończeniu translacji mRNA towarzyszy rozkład polisomów z uwolnieniem cząsteczki białkowej, tRNA i rybosomów. Te ostatnie, według najnowszych badań, ulegają pod wpływem swoistego czynnika białkowego (49) dysocjacji na podjednostki, zdolne do wzięcia udziału w ponownej inicjacji i syntezie następnej cząsteczki białkowej. Proces syntezy białka związany byłby zatem z krążeniem podjednostek rybosomowych: polisomy — pula wolnych podjednostek (25, 36, 43).

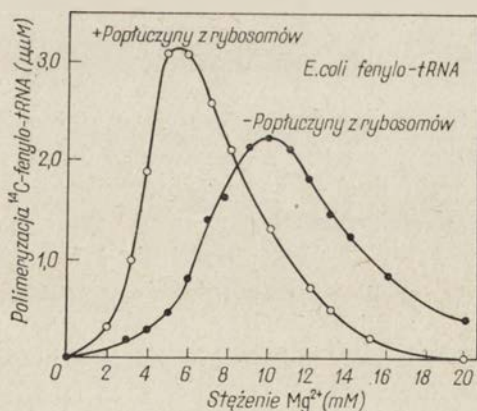
Zagadnienia zapoczątkowania biosyntezy białka w układach bakteryjnych (17) oraz procesy wydłużania i zakończenia syntezy (12) zostały omówione ostatnio w *Postęпах Biochemii*.

Rok bieżący przyniósł pierwsze publikacje na temat zapoczątkowania biosyntezy białka w komórkach organizmów wyższych. Dotyczą one wy-

odrębniania czynników białkowych pobudzających inicjację, inicjatorowego tRNA oraz mechanizmu tego procesu. Omówienie wyników tych badań jest przedmiotem niniejszego artykułu.

I. Czynniki inicjujące

W 1968 roku Miller i Schweet (34) wykazali, że w niskich stężeniach jonów magnezowych płyn otrzymany z przemycia rybosomów roztworami 0,5M KCl pobudza syntezę hemoglobiny *in vitro* w obecności oczyszczonych rybosomów retikulocytów. Stwierdzono, że produktem syntezy są kompletne łańcuchy α i β globiny. W nieobecności popłuczyn rybosomowych powstające łańcuchy nie zawierają radioaktywnego aminokwasu w położeniu N-końcowym, co świadczy o braku inicjacji syntezy nowych łańcuchów i zachodzącym z normalną szybkością wydłużaniu łańcuchów, których synteza została wcześniej zapoczątkowana. Ci sami autorzy wykazali jednocześnie, że w obecności kwasu poliurydylowego (poli U), użytego jako matryca, dodatek popłuczyn rybosomowych powoduje charakterystyczne dla procesów polimeryzacji fenyloalaniny przesunięcie optimum stężenia jonów magnezowych z 10mM do 5mM. Spostrzeżenia te wskazują na obecność w nieoczyszczonych preparatach rybosomowych czynników zapoczątkowujących biosyntezę białka. Wyniki badań Millera i Schweeta potwierdzili wkrótce Anderson i wsp. (2, 46). Rysunek 1 przedstawia wpływ popłuczyn z rybosomów retikulocytów na układ syntetyzujący polifenyloalaninę.



Rys. 1. Wpływ popłuczyn rybosomowych na polimeryzację fenyloalaniny w różnych stężeniach jonów magnezowych (46)

W 1970 roku doniesiono z laboratorium Andersona (46) o wyizolowaniu z popłuczyn rybosomowych retikulocytów dwóch czynników, M_1 i M_2 , czynnych w reakcji polimeryzacji fenyloalaniny w niskich stę-

żeniach jonów magnezu. Rozdzielone na DEAE-celulozie czynniki nie wykazują aktywności transferaz, a wyraźne pobudzenie syntezy polifenyloalaniny zaobserwowano jedynie w obecności obu dodanych frakcji. Ostatnio (38) udało się wyodrębnić trzeci czynnik inicjujący — M_3 , którego obecność, łącznie z M_1 i M_2 , jest niezbędna dla syntezy hemoglobiny *de novo*. M_3 przypomina właściwościami bakteryjny czynnik F_3 , potrzebny do inicjacji syntezy polipeptydu kodowanego przez naturalny mRNA. Funkcja pozostałych czynników omówiona będzie w następnym rozdziale.

Dwie frakcje białkowe, oznaczone jako C i D, wyizolowano również z supernatantu komórkowego zarodków pszenicy (33). Podobnie jak w doświadczeniach grupy Andersona (46), żadna z frakcji użyta oddzielnie nie wykazuje aktywności. Użyte razem wyraźnie pobudzają proces inicjacji biosyntezy białka, kierowanej przez RNA wirusa mozaiki tytoniowej, w obecności rybosomów zarodków pszenicy. Wykazano mianowicie w doświadczeniach z radioaktywnym RNA wirusa, że wyodrębnione czynniki stymulują powstawanie kompleksu pomiędzy rybosomami a RNA (32) i że utworzenie takiego kompleksu poprzedza procesy wbudowywania aminokwasów do syntetyzowanego w tym układzie białka (31). Również doświadczenia z kwasem aurinotrójkarboksylowym (ang. *aurintricarboxylic acid*), znanym inhibitorem inicjacji syntezy białka u bakterii (15), wskazują na analogię między procesem badanym przez Marcusa i wsp. (33) a inicjacją w układach bakteryjnych. Nie znana jest bliżej funkcja czynników C i D. Wiadomo jednak, że działanie ich nie jest związane z aktywnością transferaz. Warto podkreślić, że inicjacja syntezy w układzie z zarodków pszenicy wymaga obecności ATP.

II. tRNA-inicjator

Wykazano ostatnio u drożdży (39, 51), w wątrobie świnki morskiej (7) i myszy, w komórkach raka wsiękowego Krebsa II (48) i innych tkankach (26) obecność dwóch cytoplazmatycznych tRNA, akceptorów metioniny, analogicznych do bakteryjnych akceptorów tego aminokwasu. Drożdżowy metionylo-tRNA_F ulega, podobnie jak bakteryjny, procesowi formylacji *in vitro* w obecności transformylazy *E. coli*, cytoplazma organizmów wyższych nie zawiera bowiem tego enzymu (30). To tłumaczy, dlaczego N-formylomet-tRNA, mimo licznych poszukiwań, nie został wykryty w komórkach *Eucariota*.

Przytoczone obserwacje były podstawą wysuniętego przez Smitha i Marckera (48) przypuszczenia, że metionylo-tRNA_F, a nie jego formylowa pochodna, jest inicjatorowym tRNA dla biosyntezy białka w cytoplazmie organizmów wyższych. Jak się ostatnio okazało (5, 48), metionylo-tRNA_F rzeczywiście warunkuje wbudowywanie metioniny jako N-końcowego aminokwasu do syntetyzowanego polipeptydu w układzie

zawierającym rybosomy 80S, cytoplazmatyczny system enzymatyczny i polimer AUG(U)_n (n = 35). Okazało się, że podobnie jak w układzie bakterieryjnym tryplet AUG jest kodonem startowym. Brown i Smith (5), stosując syntetyczne polimery zawierające AUG w różnym położeniu od końca 5', wykazali ponadto, że proces translacji rozpoczyna się zawsze od kodonu AUG. Funkcję kodonu startowego spełnia także GUG (5).

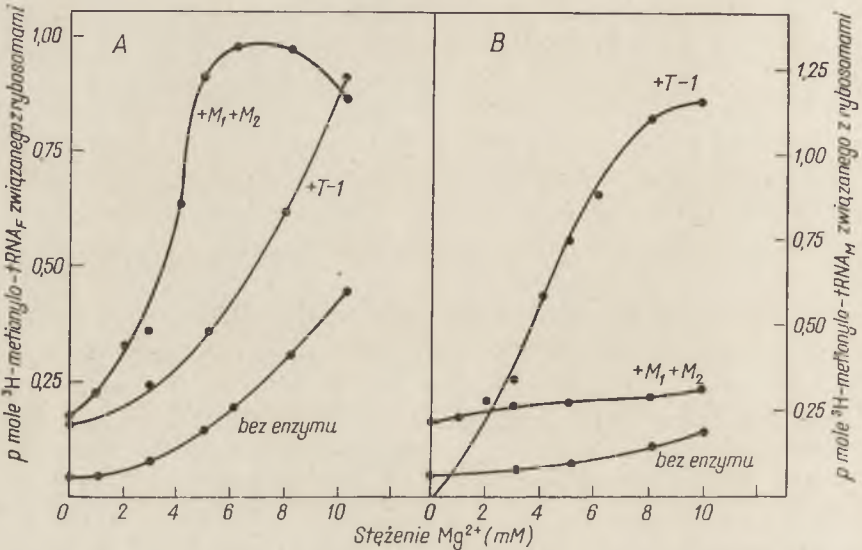
Metionilo-tRNA_M, wyodrębniony z komórek organizmów eukariotycznych, wbudowuje metioninę w położenia wewnętrzne polipeptydu (5, 22, 48) w przeciwieństwie do met-tRNA_F. Funkcja jego jest więc identyczna z bakterieryjnym met-tRNA_M.

W krótkim czasie po opublikowaniu pracy Smitha i Marckera (48) ukazały się dalsze doniesienia, wskazujące na metionilo-tRNA_F jako inicjatorowy tRNA również w syntezie naturalnych polipeptydów: hemoglobiny (22, 23) i protaminy (54). Na podkreślenie zasługują tu pomysłowo przeprowadzone przez Jacksona i Huntera (23) doświadczenia nad biosyntezą hemoglobiny. Autorzy zastosowali do badań rybosomy uprzednio preinkubowane z NaF, który swoiście hamuje procesy inicjacji (27, 40), nie wpływając natomiast na wydłużanie polipeptydów. W wyniku preinkubacji otrzymywano pozbawione polipeptydów rybosomy stanowiące zsynchronizowaną populację, zdolną do usunięcia inhibitora do inicjacji i syntezy nowych łańcuchów globiny. Stosowanie różnych stężeń sparsomycyny, znanego inhibitora procesów wydłużania łańcucha (52) i odpowiedniego czasu inkubacji pozwalało na otrzymywanie peptydów o różnej długości łańcucha. Analiza zsyntetyzowanego materiału wykazała, że wszystkie krótkie peptydy zawierały metioninę w N-końcowym położeniu, we fragmentach zarówno α jak i β łańcuchów globiny. Badania *in vivo* na zawiesinie retikulocytów dały takie same rezultaty (23). W doświadczeniach bez sparsomycyny zaobserwowano natomiast, że nowopowstałe długie łańcuchy globiny, zawierające powyżej 15—20 reszt aminokwasowych, pozbawione były N-końcowej metioniny. Fakt ten autorzy tłumaczą działaniem swoistej aminopeptydazy, odszczepiającej metioninę jeszcze przed ukończeniem syntezy pełnego łańcucha polipeptydowego. Podobne wyniki uzyskali inni badacze (22, 23) w doświadczeniach nad syntezą cytoplazmatycznych białek zwierzęcych.

W świetle powyższych danych staje się zrozumiałe, dlaczego metionina jako przejściowy N-końcowy aminokwas nie była wykrywana we wcześniejszych badaniach nad syntezą białek. Jedynym znanym dotychczas wyjątkiem pośród cytoplazmatycznych białek organizmów wyższych są łańcuchy hemoglobiny wołu i owcy, w których metionina występuje w pozycji N-końcowej (4). Jest rzeczą interesującą, że N-formylometionilo-tRNA_F może spełniać również funkcję inicjatora (22). N-formylometionina występująca w takim polipeptydzie nie jest jednak uwalniana przez aminopeptydazę (22).

Proces odszczepiania metioniny wykazuje pewne podobieństwo do analogicznej reakcji w układzie bakteryjnym; w tym ostatnim przypadku uczestniczą jednak zwykle dwa enzymy, deformylaza i aminopeptydaza (1, 50).

Uzupełnieniem przedstawionych wyżej badań są wyniki doświadczeń Shafritza i Andersona (45) nad funkcją czynników inicjujących. Wykazano, że w niskich stężeniach jonów magnezowych i w obecności AUG frakcje M_1 i M_2 przyłączają do rybosomów metionylo-tRNA_F, nie wiążą natomiast metionylo-tRNA_M. Odwrotnie zaś zachowuje się transferaza I, znany enzym wiążący aminoacylo-tRNA do rybosomów (rysunek 2).



Rys. 2. Wiązanie metionylo-tRNA do rybosomów retikulocytów w obecności czynników inicjujących M_1 i M_2 , transferazy I i AUG w różnych stężeniach jonów magnezowych (45)

Czynnik M_1 wykazuje aktywność także w stosunku do N-formylometionylo-tRNA_F. Wiązanie formylowej pochodnej może zachodzić również w nieobecności GTP i wydaje się być mniej swoiste.

III. Funkcja wolnych podjednostek rybosomowych w procesach inicjacji

W dalszym ciągu aktualne jest pytanie, czy u organizmów wyższych w procesie zapoczątkowania biosyntezy białka biorą udział wolne podjednostki rybosomowe czy też monomery 80S. Dotychczasowe badania nie dały jednoznacznej odpowiedzi, jakkolwiek coraz więcej danych przemawia za modelem inicjacji u bakterii, jako słusznym także w odniesieniu do komórek *Eucariota*. W szczególności udało się wykazać obecność wol-

nych podjednostek rybosomowych w retikulocytach (3), komórkach nowotworowych (21, 24, 53) i drożdżach (37), obok rybosomów i polisomów. Według wielu autorów (3, 20, 21, 24, 53) podjednostki rybosomowe, zanim utworzą monosomy, włączają się w struktury polisomowe, uczestnicząc więc w reakcji inicjacji. Bliższe dane na ten temat zawiera ostatnio opublikowana praca H e y w o o d a (19). Autor wykazał, że w układzie zawierającym przemyte monosomy i podjednostki rybosomowe mięśni embrionu kurczęcia oraz mRNA miozynu, jedynie natywne podjednostki 40S uczestniczą w pierwszej fazie inicjacji. Monomery 75S są nieaktywne. Kompleks zawierający podjednostkę 40S-mRNA powstaje na drodze enzymatycznej w wyniku inkubacji przemytego preparatu rybosomowego i mRNA z popłuczynami rybosomowymi i może być wyizolowany za pomocą wirowania w gradiencie sacharozy. Dodatkowa inkubacja tego kompleksu z podjednostką 60S, GTP i aminoacylo-tRNA prowadzi do powstania „pełnego” kompleksu, sedymentującego razem z rybosomami 75S. Zarówno GTP jak i aminoacylo-tRNA są niezbędne dla procesu asocjacji podjednostki 60S z pierwotnym kompleksem — 40S-mRNA i, być może, także dla stabilizacji powstałej struktury.

Za cyklicznym krążeniem podjednostek rybosomowych pośrednio przemawiają także wyniki badań nad syntezą białka w bezkomórkowym układzie z retikulocytów w obecności NaF. Dodatek tego inhibitora powoduje spadek poziomu wolnych podjednostek, a wzrost ilości monosomów, czemu towarzyszy zahamowanie biosyntezy białka. Według C o l o m b o i wsp. (10) podjednostki rybosomowe, w obecności NaF są szybko zużywane w reakcji inicjacji, co przy jednoczesnym braku regeneracji podjednostek z rybosomów 80S musi prowadzić do zahamowania biosyntezy białka. Wy tłumaczenie takie wydaje się słuszne tym bardziej, że zablokowanie syntezy białka przez aktydion, wprowadzony tuż przed dodaniem NaF do układu syntetyzującego, nie wpływa na poziom wolnych podjednostek. Sądzi się, że fluorek hamuje dysocjację monosomów przez zahamowanie utleniania glukozy w retikulocytach, z czym związany jest wyraźny spadek poziomu ATP. Można przypuszczać, że dysocjacja rybosomów retikulocytowych wymaga, w przeciwieństwie do rybosomów bakteryjnych, dostarczenia energii. Nowe dane o działaniu fluorku przedstawili ostatnio H o e r z i M c C a r t y (20). Wykazali oni, przy użyciu lizatów z retikulocytów i w obecności NaF powstawanie nowego typu polisomów, zawierających podjednostkę 40S przyłączoną do mono-, dwu-, trój- i tetrasomów. Powstawanie takich zespołów jest wynikiem zahamowania przez fluorek asocjacji podjednostki 60S z podjednostką 40S przyłączoną do mRNA. Nie wykluczone zatem, że zarówno dysocjacja jak i asocjacja rybosomów retikulocytów wymaga energii.

P e t r e (37) doniósł ostatnio o wykryciu swoistego czynnika białkowego warunkującego dysocjację rybosomów drożdży.

Nie ma dotychczas żadnych danych świadczących o tym, czy czynniki zapoczątkowujące, wyizolowane w pracowni Andersona (38, 45), są również aktywne w tworzeniu kompleksu inicjującego w obecności odpowiedniej matrycy i tRNA — inicjatora. Jedynie Brown i Smith (5) sugerują, że proces zapoczątkowania z udziałem metionilo-tRNA_F, polimerów zawierających AUG i preparatu enzymatycznego może zachodzić w obecności podjednostek rybosomowych. Za udziałem czynnika inicjującego, aktywnego w wiązaniu inicjatora do kompleksu 40S-mRNA, zdają się przemawiać wyniki doświadczeń z ostatnio wyizolowaną z supernatantu wątroby szczurzej frakcją T-X (13). Frakcja ta w niskich stężeniach jonów magnezowych stymuluje przyłączanie fenyloalanino-tRNA i jego acetylowej pochodnej do rybosomów 40S w obecności poli U jako matrycy. W obecności AUG przyłącza się również N-formylometionilo-tRNA. Wiązanie z rybosomami 80S jest wielokrotnie mniejsze niż z jednostką 40S. T-X przypomina własnościami i funkcją M₁ i M₂ retikulocytów, jakkolwiek wykazuje wyraźną aktywność jedynie w obecności 40S.

Mechanizm zapoczątkowania biosyntezy białek u organizmów wyższych daleki jest jeszcze od wyjaśnienia. Zebrany materiał nie jest wystarczający do bliższego scharakteryzowania poszczególnych etapów tego złożonego procesu. Wiele danych jest kontrowersyjnych. Mimo tych braków przedstawione wyniki badań wyraźnie sugerują, że tak jak większość procesów biochemicznych, tak i inicjacja syntezy białka u obu typów organizmów przebiega podobnie. Brak grupy formylowej w metionilo-tRNA_F-inicjatorze syntezy białek cytoplazmatycznych *Eucariota*, jest jak dotąd jedyną wyraźną różnicą pomiędzy obu układami. Można przypuszczać, że powstająca na drodze ewolucji bardziej złożona i wyspecjalizowana struktura rybosomów u organizmów wyższych, pozwoliła na ominięcie reakcji formylacji, niezbędnej dla procesów inicjacji u bakterii, w mitochondriach i chloroplastach (44, 47).

LITERATURA

1. Adams J., *J. Mol. Biol.* **33**, 571 (1968).
2. Anderson W. F., Gilbert J. M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 456 (1969).
3. Bishop J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 130 (1966).
4. Boyer S. H., Hathaway P., Pascasio F., Bordley J., Orton C., Naughton M., *J. Biol. Chem.* **242**, 2211 (1967).
5. Brown J. C., Smith A. E., *Nature* **226**, 610 (1970).
6. Caskey C. T., Beaudet A., Nirenberg M., *J. Mol. Biol.* **37**, 99 (1968).
7. Caskey C. T., Redfield B., Weissbach H., *Arch. Biochem. Biophys.* **120**, 119 (1967).
8. Clark B. F., Marcker K. A., *J. Mol. Biol.* **17**, 394 (1966).
9. Clark B. F., Marcker K. A., *Nature* **211**, 378 (1966).

10. Colombo B., Vesco C., Baglioni C., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **61**, 651 (1968).
11. Erbe R. W., Nau M. M., Leder P., *J. Mol. Biol.* **38**, 441 (1969).
12. Gąsior E., *Post. Biochem.* **14**, 485 (1968).
13. Gąsior E. — dane nie publikowane.
14. Gordon J., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **58**, 1574 (1967).
15. Grollman A. P., Stewart M. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **61**, 719 (1968).
16. Grubman M. J., Nakada D., *Nature* **223**, 1242 (1969).
17. Grzelakowska-Sztabert B., *Post. Biochem.* **14**, 509 (1968).
18. Guthrie C., Nomura M., *Nature* **219**, 232 (1968).
19. Heywood S. M., *Nature* **225**, 696 (1970).
20. Hoerz W., McCarty K. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **63**, 1206 (1969).
21. Hogan B. L. M., Korner A., *Biochim. Biophys. Acta* **169**, 139 (1968).
22. Housman D., Jacobs-Lorena M., RajBhandry U. L., Lodish H. F., *Nature* **227**, 913 (1970).
23. Jackson R., Hunter T., *Nature* **227**, 672 (1970).
24. Joklik W. K., Becker Y., *J. Mol. Biol.* **13**, 511 (1965).
25. Kaempfer R., Meselson M., Raskas H. J., *J. Mol. Biol.* **31**, 277 (1968).
26. Leis J. P., Keller E. B., *Federation Proc.* **29**, 468 (1970).
27. Lin S., Mosteller R. D., Hardesty B., *J. Mol. Biol.* **21**, 51 (1966).
28. Marcker K. A., Clark B. F., Anderson J. S., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**, 279 (1966).
29. Marcker K. A., Sanger F., *J. Mol. Biol.* **8**, 835 (1964).
30. Marcker K. A., Smith A. E., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, 1453 (1969).
31. Marcus A., *J. Biol. Chem.* **245**, 955 (1970).
32. Marcus A., *J. Biol. Chem.* **245**, 962 (1970).
33. Marcus A., Bewley J. D., Weeks D. P., *Science* **167**, 1735 (1970).
34. Miller R. D., Schweet R., *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 632 (1968).
35. Monro R. E., Maden B. E. H., Traut R. R. w Genetic Elements, red. D. Shugar, Academic Press, PWN, Londyn-New York-Warszawa, 1966, str. 179.
36. Nomura M., Lowry C. V., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 946 (1967).
37. Pêtre J., *Eur. J. Biochem.* **14**, 399 (1970).
38. Prichard P. M., Gilbert J. M., Shafritz D. A., Anderson W. F., *Nature* **226**, 511 (1970).
39. RajBhandary U. L., Ghosh H. P., *J. Biol. Chem.* **244**, 1104 (1969).
40. Ravel J. M., Mosteller R. D., Hardesty B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **56**, 701 (1966).
41. Revel M., Brawerman G., Lelong J. C., Gros F., *Nature* **219**, 1016 (1968).
42. Salas M., Hille M. B., Last J. A., Wahba A., Ochoa S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 357 (1967).
43. Schlessinger D., Mangiarotti G., Aprion D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1782 (1967).
44. Schwartz J. M., Meyer R., Einsenstadt J., Brawerman G., *J. Mol. Biol.* **25**, 571 (1967).
45. Shafritz D. A., Anderson W. F., *Nature* **227**, 918 (1970).
46. Shafritz D. A., Prichard P. M., Gilbert J. M., Anderson W. F., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **38**, 721 (1970).
47. Smith A. E., Marcker K. A., *J. Mol. Biol.* **38**, 241 (1968).
48. Smith A. E., Marcker K. A., *Nature* **226**, 607 (1970).
49. Subramanian A. R., Ron E. Z., Davis B. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **61**, 761 (1968).

50. Takeda M., Webster E. E., *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.* **60**, 1487 (1968).
51. Takhishi K., Ukita T., Nishimura S., *J. Biol. Chem.* **243**, 5761 (1968).
52. Vazquez D., Battaner E., Neth R., Heller G., Monro R. E., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**, 369 (1969).
53. Vesco C., Colombo B., *J. Mol. Biol.* **47**, 335 (1970).
54. Wigle D. T., Dixon G. H., *Nature* **227**, 676 (1970).

RECENZJE

Stoffwechselforgange und Enzymmechanismen in Zellen und Geweben, red. Cl. Pfister, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1969

Książka stanowi 23 tom Sympozjum Niemieckiego Towarzystwa Medycyny Doświadczalnej i obejmuje materiały IV Zjazdu Towarzystwa Biochemicznego NRD, który odbył się w Rostoku we wrześniu 1967 roku.

Tom zawiera 12 referatów z zakresu metabolizmu komórek i tkanek z szczególnym uwzględnieniem układów enzymatycznych i mechanizmów przemian. Większość artykułów ujmuje badania własne autorów i zawiera szczegółową dokumentację najważniejszych wyników. Jeden artykuł opublikowany jest w języku angielskim, pozostałe w języku niemieckim.

Tematyka prac nie jest podporządkowana określonej myśli przewodniej i dotyczy bardzo różnorodnych dziedzin biochemii. Obok prac o podstawowym znaczeniu teoretycznym jak H. Bielka: Struktura i funkcja rybosomów, czy E. Braunstein: Struktura i mechanizm działania enzymów zawierających jako grupę czynną fosforan pirydoksalu, zamieszczono artykuły z zakresu biochemii odżywiania (E. Kofranyi i F. Jekat: Wartość biologiczna mieszanin białek) i biochemii ewolucyjnej (G. Pfeleiderer: Ewolucja proteaz). Większość prac cechuje jednak wielostronne opracowanie literaturowe oraz syntetyczny i wnikliwy sposób ujęcia.

W zależności od zainteresowań na uwagę zasługują takie artykuły jak D. Glasser, I. Ruser, U. Berg, M. John: Soczewka oka jako przedmiot badań biochemicznych, czy L. Heilmeyer i wsp.: Regulacja glutamylsyntetazy u *E. coli*. Przemianie karnityny i jej roli w metabolizmie białek poświęcono aż dwie prace z różnych ośrodków badawczych (H. Aurich — NRD, M. Reynier — Francja). Ze względu na bardzo wnikliwie opracowanie, na uwagę zasługuje artykuł A. W. Holldorf: Mechanizmy regulacyjne metabolizmu dezoksyrybonukleozydów i dezoksyrybonukleotydydów. Do biosyntezy RNA i DNA wykorzystuje komórka, jak wiadomo, trójfosforany nukleozydów purynowych i pirymidynowych, przy czym stężenie tych prekursorów w tkankach, z wyjątkiem ATP i UTP, jest niezwykle niskie. W takich warunkach przebieg biosyntezy wymaga sprawnie funkcjonujących układów regulacyjnych i autorzy temu zagadnieniu poświęcają główną uwagę. Na podstawie wyników badań własnych i innych autorów śledzą poszczególne etapy syntezy nukleotydydów, przeciwstawiając biosyntezie *de novo* tzw. układ *Salvage pathway*, w którym podlegają wykorzystaniu preformowane zasady i nukleozydy. Badanie tych zjawisk przeprowadzają na modelu *E. coli*.

Inny referat zasługujący na wzmiankę, to praca A. Hocka: Wpływ pożywienia na aktywność enzymatyczną. Powszechnie wiadomo, że licznym procesom patologicznym towarzyszą zmiany aktywności określonych enzymów i zjawisko to wykorzystywane jest dla celów klinicznej diagnozy. Autor stara się wykazać, że ilość i jakość pożywienia wpływa również w sposób istotny na zmianę aktywności wielu enzymów osocza i komórek niektórych narządów.

W konkluzji należy stwierdzić, że książka stanowi pożyteczną lekturę dla czytelnika zainteresowanego postępem ogólnej problematyki biochemicznej. Szkoda, że jej wydanie wymagało aż dwóch lat od chwili wygłoszenia referatów na Zjeździe. Niewątpliwą zaletą zbioru są liczne zestawienia tabelaryczne, diagramy i wykresy, jak również udane reprodukcje zdjęć mikroskopowych.

J. Chmiel

A. Waksmundzki i R. Schreiter: Bibliografia Polskich Autorów z zakresu Chromatografii i Elektroforezy za lata 1947—1964, Lubelskie Towarzystwo Naukowe, Łódź 1970

W poszukiwaniu źródłowej bibliografii w zakresie chromatografii i elektroforezy prac polskich autorów znajdowaliśmy je dotychczas w II i III tomie wydawnictwa: I. Hais i K. Maček, *Handbuch der Papierchromatographie*, T. II za lata 1943—1956 i T. III — 1957—1960, oraz w zestawieniach bibliograficznych zamieszczanych w *J. Chromatog.* Polskie wydawnictwo stanowi pełne zestawienie prac polskich autorów za lata 1947—1964. Jak mi wiadomo, dalszy ciąg za lata 1964—1970 znajduje się w opracowaniu. Bibliografię zestawiała i opracowała fachowo pod względem wymogów bibliotekarskich kustosz Biblioteki UMCS mgr R. Schreiterowa, a konsultantem naukowym był prof. A. Waksmundzki, jeden z najlepszych naszych specjalistów w zakresie teorii i praktyki chromatografii. Bibliografia obejmuje wszystkie prace polskich autorów publikowane w czasopismach krajowych i zagranicznych. Spis treści obejmuje: przedmioty, wstęp, objaśnienie skrótów, wykaz tytułów czasopism i ich skrótów, właściwą bibliografię, addendum, indeks przedmiotowy i indeks autorów. Wydanie jest staranne, na dobrym papierze. Dyskusji mógłby podlegać układ indeksu przedmiotowego, który odbiega od stosowanych przez Haisa i Mačka, jak też w *J. Chromatog.* Nakład jest niewielki 300+80 egzemplarzy. To cenne wydawnictwo powinno zainteresować autorów prac z dziedziny chemii i biochemii, ponadto może służyć jako źródło informacji gdzie i u kogo należy się konsultować w wybranej tematyce.

J. Opieńska-Blauth

SPRAWOZDANIA

VIII Międzynarodowy Kongres Biochemii Montreux, 3—9 września 1970 roku

Ubiegłoroczny Kongres obradował w Szwajcarii, równolegle w trzech miejscowościach: Interlaken, Lucernie i Montreux. Tematyka sympozjów zgrupowanych w Interlaken i Lucernie została omówiona w poprzednim zeszycie Postępów, w którym przedstawiono także ogólne zasady organizacyjne i formy pracy wspólne dla całego Kongresu.

W malowniczo położonym Montreux zgrupowano obrady czterech sympozjów o zbliżonej tematyce. Przedmiotem posiedzeń poszczególnych sympozjów były kolejno:

- 1) Sympozjum Nr 5 — Kwasy nukleinowe i synteza białka
 - a) Struktura kwasów nukleinowych
 - b) Synteza DNA
 - c) Synteza RNA
 - d) Modyfikacje materiału genetycznego
 - e) Kwasy nukleinowe eukariontów
- 2) Sympozjum Nr 6 — Synteza białka i kwasy nukleinowe
 - a) Struktura rybosomów
 - b) Inicjacja
 - c) Translokacja i wydłużanie
 - d) Terminacja i czynniki dysocjacji
 - e) tRNA
 - f) Synteza białek *in vitro*
- 3) Sympozjum Nr 8 — Budowa komórki i układy wieloenzymowe
 - a) Układy wieloenzymowe
 - b) Struktury subkomórkowe
 - c) Błony
 - d) Lizosomy i peroksosomy
- 4) Sympozjum Nr 9 — Biochemia rozwoju i różnicowanie
 - a) Funkcje genów: kwasy nukleinowe
 - b) Funkcje genów: synteza białek
 - c) Regulacja aktywności genów
 - d) Kontrola funkcji DNA
 - e) Czynniki wpływające na różnicowanie

Dynamiczny, wielokierunkowy rozwój badań nad kwasami nukleinowymi i biosyntezą białka prowadzi do gwałtownego napływu nowych informacji, niejednokrotnie trudnych do usystematyzowania i oceny. Ograniczyć się przeto jedynie do fragmentarycznego omówienia najważniejszych osiągnięć, które znalazły najżywsze odbicie w przebiegu sympozjów obradujących w Montreux. Najsilniejsze wrażenie pozostawił niewątpliwie odczyt S. Spiegelmana wygłoszony w trzecim dniu obrad. Temat odczytu — synteza DNA uzależniona od RNA — aczkolwiek niezgodny z zapowiadającym programem, wzbudził niezwykle żywe, powszechne zainteresowanie. Nawiązując do prac Temina nad syntezą kwasów nukleinowych w komórkach zakażonych wirusami zawierającymi RNA, prowadzonych od 1964 roku, Spiegelman przed-

stawił najświeższe dane z tej dziedziny badań, uzyskane w jego pracowni. Wynika z nich niezbicie, że w komórkach zwierzęcych zakażonych niektórymi wirusami onkogennymi ma miejsce synteza DNA oparta o informację genetyczną zawartą w RNA tych wirusów. Odkrycie to posiada ogromne znaczenie teoretyczne. Wprawdzie jeszcze w 1958 roku Chargaff przewidywał, że kierunek przekazywania informacji genetycznej w trójce DNA-RNA-białko może być dowolny, to jednak powszechnie przyjął się przeciwstawny pogląd Cricka, znany od 1958 roku jako tzw. centralny dogmat biologii molekularnej. W myśl tego dogmatu informacja genetyczna może być przekazywana wyłącznie jednokierunkowo i nieodwracalnie od DNA poprzez RNA do białka. Wobec stwierdzenia możliwości przekazywania informacji z RNA do DNA, ten niepodważalny od 12-tu lat pogląd wydaje się być daleko idącym uproszczeniem. Ale znaczenie osiągnięć przedstawionych przez Spiegelmana nie ogranicza się do aspektów czysto teoretycznych. Wyniki dalszych badań nad polimerazą DNA zależną od RNA — o ile okaże się ona enzymem specyficznym i niezbędnym dla rozwoju nowotworów — mogą być kluczem do poszukiwań skutecznych leków antyrakowych.

Drugim dominującym nurtem dyskusji były zagadnienia związane z mechanizmem syntezy DNA w komórkach bakteryjnych i zwierzęcych. Wielu mówców (J. Cairns, H. Schaller, W. Stratling, E. Wintersberger, S. R. Schultz) podkreślało, że polimeraza DNA wykryta przez Kornberga nie może być uznana za główny enzym, katalizujący replikację DNA *in vivo*. Przytoczono dane wskazujące na występowanie polimerazy DNA o innych własnościach. Enzym ten katalizuje syntezę DNA z szybkością niemal tak wielką jaką obserwuje się *in vivo* (sto razy szybciej niż polimeraza Kornberga), wykorzystując rodzimy DNA jako matrycę. Zlokalizowany jest głównie w jądrze i innych strukturach subkomórkowych zawierających DNA. Własności te predysponują go do spełniania zasadniczej roli w procesie replikacji DNA w warunkach naturalnego środowiska wewnątrzkomórkowego.

Wiele uwagi poświęcono także budowie i biogenezie rybosomów bakteryjnych. W szczególności M. Nomura przedstawił wyniki systematycznych badań nad rekonstrukcją mniejszej ich podjednostki (30S). Badania te wykazały całą złożoność interakcji między rRNA 16S i komponentami białkowymi. Każda z 21 molekuł białka jest przyłączana do RNA w określonej kolejności i tylko w obecności określonego zestawu pozostałych komponentów białkowych. Przypuszczalnie, w podobnie uporządkowany sposób podjednostka 30S kompletuje się także w warunkach *in vivo*. Produkty pośrednie, obserwowane w trakcie rekonstrukcji, można bowiem znaleźć także w komórkach *E. coli*. Dużo trudniejszym zadaniem okazała się rekonstrukcja większych podjednostek (50S), w przypadku których nie udało się uniknąć strat rRNA 5S (R. Monier). Natomiast przebieg syntezy podjednostek 50S *in vivo* został dość szczegółowo poznany dzięki stosowaniu specyficznych inhibitorów biosyntezy białka i techniki krótkotrwałego (10—15 sek.) znakowania. Obie techniki pozwoliły wyróżnić trzy grupy składników białkowych, przyłączanych do rRNA w kolejności odpowiadającej etapom procesu dojrzewania rybosomów.

Z badań nad mechanizmem syntezy białek szczególnie szybki postęp można odnotować w dziedzinie wyodrębniania i charakterystyki czynników kontrolujących inicjację (S. Ochoa, F. Gros, M. Revel, R. Thach), wydłużanie (P. Lengyel, J. Gordon) i terminację (M. Capecchi, C. Caskey, I. Algranati, F. Kalousek) łańcucha polipeptydowego oraz określenia roli cyklicznego 3':5'-AMP w regulacji tych procesów (M. Kuwano, G. Zubay). R. W. Chambers przedstawił dowody na decydującą rolę drugorzędowej struktury tRNA w procesie ich rozpoznania przez odpowiednie syntetazy aminoacylo-tRNA.

Niewątpliwie dziesiątki innych referatów i doniesień zasługują w równej mierze na uwagę. Nie sposób jednak w krótkim sprawozdaniu odtworzyć całego bogactwa poglądów i osiągnięć zaprezentowanych na sympozjach 8-mego Kongresu. Może naj-

bardziej ogólną cechą charakterystyczną dla obecnie obserwowanego postępu w dziedzinie biochemii kwasów nukleinowych i białek jest przemijanie prawd i teorii dotychczas uważanych powszechnie za niepodważalne. Jak to sformułował Chargaff zamykając jedno z ostatnich posiedzeń, we współczesnej biochemii obowiązywać może jeszcze jeden tylko dogmat — nie tworzyć żadnych dogmatów.

J. Buchowicz

SPIS TREŚCI

D. Sołtysiak - Pawluczuk — Budowa wieloskładnikowych kompleksów enzymatycznych	379
J. Bryła — Regulacja glukoneogenezy. I. Wpływ utleniania kwasów tłuszczowych	401
T. Szymczyk, M. Jachimowicz — Metabolizm kwasów siałowych, ich prekursorów i pochodnych	417
M. Wojciechowicz — Liaza pektynianowa	437
Z. Porembska — Arginaza z tkanek ureotelicznych i urikotelicznych kręgowców	451
K. Kleczkowski — Wykorzystanie mocznika przez organizmy nie zawierające ureazy	463
J. Skorkowska - Zieleniewska — Synergizm żelaza i miedzi w organizmie	473
G. Turowska — Poliprenole	483
E. Lenartowicz, S. Klita — Bezpośrednia translacja DNA w układach bezkomórkowych	497
E. Gąsior — Inicjacja biosyntezy białka u organizmów eukariotycznych	515
Recenzje książek (<i>J. Chmiel, J. Opieńska-Blauth</i>)	525
VIII Międzynarodowy Kongres Biochemii, Montreux, 1970 (<i>J. Buchowicz</i>)	527

W 4-tym zeszycie 17-tego tomu ukażą się:

1. Ignacy Reifer, 1909 — 1971 — *J. Buchowicz*
2. Regulacja glukoneogenezy. II. Rola hormonów — *J. Bryła*
3. Biologiczna rola kwasów siałowych — *M. Jachimowicz, T. Szymczyk*
4. Elektroda tlenowa i jej zastosowanie w badaniach procesów życiowych — *J. Bielawski*
5. Spektroskopia fluorescencyjna i jej zastosowanie do badania struktury białek — *E. Próchniewicz, H. Strzelecka-Gołaszewska*
6. Kwaśne białka jąder komórkowych — *L. Kłyszajko-Stefanowicz, Z. Polanowska*
7. Biosynteza i rola rzadkich zasad w tRNA — *C. Janion*

POSTĘPY BIOCHEMII

July 1971

ARTICLES IN POLISH

Volume 17

Number 3

D. Sołtysiak-Pawluczuk — Organization of the Multienzyme Complexes (Dep. Enzymol., Inst. Biochem. Univ., Warszawa)	379
J. Bryła — Control of Gluconeogenesis. I. Effects of fatty acid oxidation (Dep. Enzymol., Inst. Biochem. Univ., Warszawa)	401
T. Szymczyk, M. Jachimowicz — Metabolism of Sialic Acids, Their Precursors and Derivatives (Dep. Chem. Physiol. Medical School, Warszawa)	417
M. Wojciechowicz — Pectate Lyase (Inst. Animal Physiol. Nutr., Pol. Acad. Sci., Jabłonna)	437
Z. Porembska — The Arginase from Tissues of Ureotelic and Uricotelic Vertebrates (Dep. Chem. Polysiol., Med. School, Warszawa)	451
K. Kleczkowski — Urea Utilisation by the Urease-Free Organisms (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	463
J. Skorkowska-Zieleniewska — Interrelationship of Iron and Copper in the Body (Dep. Technol. Hyg. Nutr., High School Agricult, Warszawa)	473
G. Turowska — Poliprenols (Inst. Biochem. Univ., Warszawa)	483
E. Lenartowicz, S. Klita — Direct Translation of DNA in the Cell-Free Systems (Nencki Inst. Exptl. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa; Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	497
E. Gąsior — Initiation of Protein Biosynthesis in Eucariotic Organisms (Inst. Microbiol. Biochem. Univ., Lublin)	515
Chronicle	527

Należy podawać kolejno: Lp., nazwisko autora i pierwsze litery imion (podaje się nazwiska wszystkich autorów w kolejności podanej w oryginalnej), skrócony tytuł czasopisma, tom (podkreślony), stronica i rok (w nawiasach). Np.: 3. Bogorad L., Granick S., *J. Biol. Chem.* 202, 793 (1953). 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 nazwiska redaktorów, oraz na końcu tom i stronicę; np.: Schneider W.C., w *Methods in Enzymology*, red. S. P. Colowick i N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, tom III, str. 680.

SPIS TREŚCI

D. Sołtysiak-Pawluczuk—Budowa wieloskładnikowych kompleksów enzymatycznych	379
J. Bryła—Regulacja glukoneogenezy. I. Wpływ utleniania kwasów tłuszczowych	401
T. Szymczyk, M. Jachimowicz—Metabolizm kwasów siałowych, ich prekursorów i pochodnych	417
M. Wojciechowicz—Liaza pektynianowa	437
Z. Porembaska—Arginaza z tkanek ureotelicznych i urikotelicznych kręgowców	451
K. Kleczkowski—Wykorzystanie mocznika przez organizmy nie zawierające ureazy	463
J. Skorkowska-Zieleniewska—Synergizm żelaza i miedzi w organizmie	473
G. Turowska—Poliprenole	483
E. Lenartowicz, S. Klita—Bezpośrednia translacja DNA w układach bezkomórkowych	497
E. Gąsior—Inicjacja biosyntezy białka u organizmów eukariotycznych	515
Recenzje książek (<i>J. Chmiel, J. Opieńska-Blauth</i>)	525
VIII Międzynarodowy Kongres Biochemii, Montreux, 1970 (<i>J. Buchowicz</i>)	527