

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

PSTBAH 22 (4)
437-558 (1976)

1976

tom 22 nr 4



PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

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

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

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

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

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i jego (ich) miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

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

Dla przejrzystości tekstu obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły rzeczowo winny informować o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści z podaniem stron publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I—1.). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku np. kwas glutaminowy (I).

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

Dr. Wojciech Rode

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1976 TOM 22 ZESZYT 4

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Pstbah 22(4)
(437-560) (1976)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

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

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

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

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Landman-Balińska

KOMITET REDAKCYJNY

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

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

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

I. Szumieli (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PANSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1976

Nakład 2170 (2068+102)	Oddano do składania 16.VII.76.
Ark. wyd. 9,0 ark. druk. 7,75	Podpisano do druku w grudniu 1976 r.
Pap. ilustr. sat. kl. V, 70 g, 70×100	Druk ukończono w grudniu 1976 r.
Zam. nr 1013/76 J-101	Cena zł 20,—

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

DANUTA FRĄCKOWIAK *, KRZYSZTOF FIKSIŃSKI **

Przekazywanie energii w jednostkach fotosyntetycznych ***

Energy Transfer in Photosynthetic Units

I. Wstęp

Od wielu lat wiadomo, że w organizmach fotosyntetyzujących zachodzi migracja energii wzbudzenia od cząsteczek absorbujących światło słoneczne („anten”), do tych w których zachodzą reakcje fotochemiczne czyli tzw. centrów reaktywnych. Pomimo dużego i ciągle rosnącego materiału doświadczalnego oraz całego szeregu rozważań teoretycznych nie udało się jeszcze ostatecznie uzgodnić poglądu na mechanizm molekularny odpowiedzialny za tę migrację.

Ukazał się już cały szereg przeglądowych opracowań referowanego zagadnienia (1 — 8), przedstawionych bądź w monografiach poświęconych całemu zjawisku fotosyntezy (np. 1, 9), bądź też w opracowaniach omawiających jedynie pierwotne procesy fotosyntezy (np. 3, 7). Autorzy tych opracowań używają różnych sposobów opisu zjawiska migracji energii. Nie jest jednak łatwy ani wybór najwłaściwszego przybliżenia fizycznego, ani też prawidłowe przejście od jednego typu opisu do innego (10, 11).

Celem niniejszego artykułu jest konfrontacja różnych współczesnych poglądów zarówno na mechanizm przekazywania energii między pigmentami aparatu fotosyntetycznego jak i na proces pułapkowania tej energii w centrach reaktywnych. Migracja energii jest wynikiem wielu aktów przekazania energii (*energy transfer*), przy czym zakłada się przeważnie, że wzbudzenie błędzi w sposób przypadkowy w układzie „anten”, aż osiągnie centrum.

* Prof. dr, ** mgr, Instytut Fizyki Politechniki Poznańskiej, Piotrowo 3, 60-965 Poznań.

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

Wykaz stosowanych skrótów: ESR — elektronowy rezonans spinowy; ENDOR — podwójny rezonans elektronowo-jądrowy; τ — średni czas życia w stanie wzbudzonym; K — liczba przekazania energii w jednostce czasu (szybkość przekazywania); D i A — donor i akceptor energii; \bar{D} i \bar{A} — momenty przejść donora i akceptora; R — odległość D — A; κ — czynnik orientacyjny; r — anizotropia emisji; LRRT — dalekozasięgowe przekazywanie rezonansowe.

Jednostką fotosyntetyczną będziemy nazywać zespół złożony z centrum reaktywnego i pracujących na jego potrzeby „anten”, nie wgłębiając się w dociekania czy i o ile takie zespoły są od siebie izolowane, tj. czy obowiązuje model „kałuży”, czy też model „jeziora” (3, 6). W pierwszym przypadku między poszczególnymi jednostkami fotosyntetycznymi istnieje bariera potencjału utrudniająca migrację energii; w drugim — energia migruje przede wszystkim do najbliższego centrum reaktywnego, gdyż zasięg migracji jest mały, a centra są rozmieszczone równomiernie wśród absorbujących cząsteczek.

Nie omawiamy również tutaj szczegółowo roli dwóch układów fotosyntetycznych występujących w glonach i roślinach wyższych, ani też rozdziału energii wzbudzenia pomiędzy te układy (12). Nie będziemy też referowali materiału na temat ewentualnego występowania przekazywania energii wzbudzenia pomiędzy układami fotosyntetycznymi.

Wiadomo bezspornie, że w jednostkach fotosyntetycznych migruje przede wszystkim energia elektronowego wzbudzenia. Migracja nośników ładunków nie jest podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za przekazywanie energii, choć ostatecznie w centrach reaktywnych następuje przekazywanie ładunku między partnerami (*charge transfer*). Wiadomo wprawdzie, że energia migruje w jednostkach fotosyntetycznych w postaci singletowego elektronowego wzbudzenia (4), jednakże ostatnie dane literaturowe (13) sugerują istotną rolę wzbudzeń trypletowych w centrach. Znalaziono np., że fotoutlenianie bakteriochlorofilu w centrach zachodzi poprzez stan trypletowy (14) oraz, że wydajności utleniania centrów reaktywnych i tworzenia stanów trypletowych są zbliżone (15). Ustalić więc należy możliwość przekazywania energii wzbudzenia z układu poziomów singletowych do poziomów trypletowych poprzez tzw. przejścia interkombinacyjne (*intersystem crossing*). Prawdopodobieństwa przejść interkombinacyjnych w cząsteczkach chlorofili i innych porfiryn zebrane są w literaturze (16, str. 160), przy czym ilość tego typu danych szybko wzrasta.

II. Stany trypletowe w jednostkach fotosyntetycznych

Obserwuje się ostatnio znaczny wzrost zainteresowania stanami trypletowymi barwników fotosyntetycznych. I tak K r a s n o w s k i j ze współpracownikami (17), badając niskotemperaturowe widma emisji znaleźli zgoła inne niż dotychczas podawane (17, 18, 12) energie i czasy życia poziomów trypletowych pigmentów chlorofilowych. Na przykład maksimum emisji $T_1 \rightarrow S_0$ chlorofilu *a* znalaziono w okolicy 985 nm, a średnie czasy życia stanu trypletowego różnych odmian chlorofilu mieściły się w przedziale 1,4—2,8 msek. Nie wykluczono jednak pewnego wpływu rozproszonego światła na te wyniki.

Zastosowano również do chlorofilu i jego pochodnych (19) bardzo obiecującą metodę badania zmian populacji poszczególnych podpoziomów trypletowych, a więc i przejść interkombinacyjnych. Jest to tzw. metoda optycznej detekcji magnetycznego rezonansu (ODMR), w której rejestruje się zmianę natężenia fluorescencji próbki umieszczonej w temperaturze kilku stopni Kelvina po dodatkowym napromieniowaniu jej mikrofalami, powodującym przejścia między podpoziomami stanu trypletowego. Wywołana mikrofalami zmiana obsadzeń trypletowych podpoziomów powoduje, wobec różnego prawdopodobieństwa przejść interkombinacyjnych z tych podpoziomów, zmianę natężenia rejestrowanego przejścia $O - O$ z pierwszego singletowego poziomu wzbudzonego do stanu normalnego $S_1 \rightarrow S_0$. Doświadczenie przeprowadza się przy tak niskim natężeniu światła wzbudzającego, że z jego wzrostem liniowo rośnie natężenie fluorescencji. Natężenie mikrofal dobiera się wysokie, tak aby uzyskać nasycenie przejść pomiędzy składowymi trypletowymi. Metodą ODMR (19) stwierdzono występowanie form tautomerycznych niektórych porfiryn, gdyż pozwala wykrywać małe ilości cząsteczek wzbudzonych do stanu trypletowego. Może mieć ona również znaczenie przy badaniach centrów.

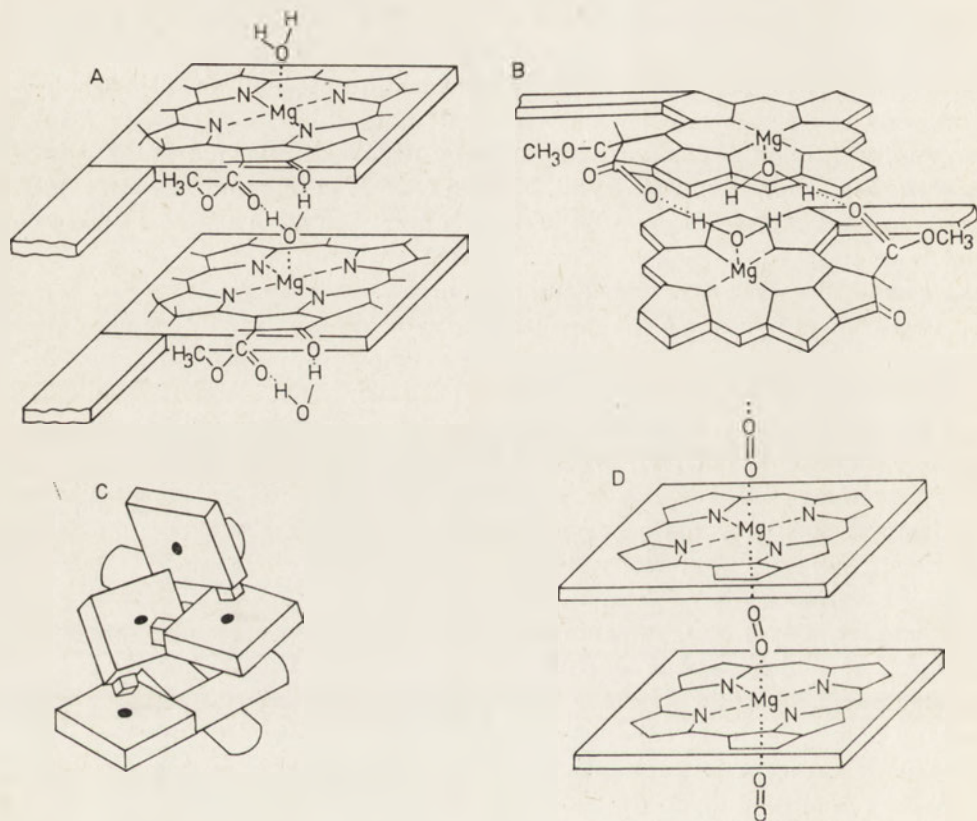
W pracowni G u r i n o w i c h a (20) zastosowano metody fotoselekcji do badania dichroizmu przejść trypletowych chlorofilu i jego pochodnych umieszczonych w niskotemperaturowym szkliwie. Stwierdzono w ten sposób, że momenty przejść trypletowych badanych barwników leżą w płaszczyźnie pierścienia porfiryнового.

Szczególnie bliski związek z ustaleniem roli przejść trypletowych w działaniu centrów mają (21) badania przekazywania elektronu dzięki uczuleniu poprzez wzbudzony do stanów trypletowych chlorofil. Badano również widmo wyższych stanów trypletowych chlorofilu (przejścia tryplet—tryplet, T—T) (22). Badania stanów trypletowych pozwalają ponadto wnikać w oddziaływania porfiryновых grup chromoforowych makrocząsteczek z ich częścią białkową (23) lub innymi cząsteczkami (24). Jak wykazano badając hemoglobiny, kinetyka zanikania absorpcji trypletowej po błysku laserowym w próbkach zawierających tlen molekularny oraz w próbkach odtlenionych dostarcza informacji o penetracji tlenu do „kieszki” makrocząsteczki (24). Nie badano dotąd w ten sposób kompleksów pigmentowo—białkowych organizmów fotosyntezujących (np. biliproteidów), chociaż badania takie mogłyby zapewne dostarczyć nowych informacji.

III. Agregacja chlorofilu

Wzajemne oddziaływania barwników można, przynajmniej w pewnym zakresie siły oddziaływania, traktować jako ich agregację. W agregacji chlorofilu i jego pochodnych bardzo istotną rolę odgrywa woda. Wielu ba-

daczy zwraca uwagę na zmianę własności spektralnych barwników profirynowych przy przejściu do bezwodnych rozpuszczalników (18, 25, 26). Usunięcie resztek wody poniżej stężeń porównywalnych ze stężeniami barwnika, wymaga bardzo starannej preparatyki (26—29). W laboratorium kierowanym przez K a t z a badano zmiany widm absorpcji w podczerwieni przy dodawaniu równomolarnych ilości wody do starannie osuszonego niepolarnego roztworu chlorofilu (28). Na tej podstawie zaproponowano następujący model agregatu: $(\text{Chl} + \text{H}_2\text{O})_n$, którego budowę, przy naj-



Ryc. 1. Modele agregatów chlorofilu

- A) $\text{Chl} + \text{H}_2\text{O}$, występujące w centrach reaktywnych (27),
 B) to samo lecz o innej symetrii (30),
 C) oligomer chlorofilowy — zespół „anten” (32),
 D) agregaty chlorofilu połączone w centrum (33).

proszym założeniu $n = 2$ przedstawia rycina 1A. Autorzy (27) sugerują występowanie w centrach tego typu agregatów, składających się z dwóch drobin chlorofilu połączonych koordynacyjnym wiązaniem poprzez dwie molekuly wody. Jednakże F o n g (30) zauważył fakt, że powyższy model nie jest zgodny z wynikami pomiarów widm ESR, przeprowadzanymi

w szkole K a t z a (31). Z widm tych wynika, że powstający w organizmach pierwotny produkt fotoutlenienia, zawiera parę cząsteczek chlorofilu o równomiernie rozłożonych spinach. Biorąc pod uwagę tę równoważność spinów w obu cząsteczkach zaproponowano (30), że w centrum reaktywnym występuje agregat przedstawiony na rycinie 1B. Agregat ten ma symetrię C_2^* . Drobiny H_2O odgrywają w modelu Fonga rolę nie tylko strukturalną, lecz biorą też udział w procesie przekazania ładunku, zachodzącym w centrum reaktywnym. Z obliczeń Fonga wynika, że oddziaływania występujące wewnątrz takiego kompleksu prowadzą do wytworzenia antysymetrycznego stanu trypletowego, z którego przejścia do stanu podstawowego chlorofilu są silnie wzbronione. Tego typu agregat może więc grać rolę bardzo dobrej pułapki energii czyli centrum reaktywnego. Autor proponuje inny model agregatów cząsteczek chlorofilu odgrywających rolę „anten”. W modelu tym część donorowa jednej cząsteczki, (Ryc. 1B) łączy się z akceptorową częścią drugiej cząsteczki (z Mg) przez co tworzy się polimer chlorofilów, odpowiedzialnych za przekazywanie energii wzbudzenia do centrum. W jednej z ostatnich prac ze szkoły K a t z a (29) proponowano na podstawie widm ESR i ENDOR chlorofilu w roztworze i *in vivo*, następujący model centrum reaktywnego: $(Chl - H_2O - Chl)$ przy czym „anteny” tworzą oligomer typu $(Chl_2)_n$.

W nowszej pracy K a t z a i współpracowników (32) przyjęto bardziej szczegółowy model ułożenia chlorofili — „anten” w oligomerze chlorofilowym, złożonym z szeregu dimerów (Ryc. 1C). Posłużono się wówczas analizą pasm absorpcji chlorofilu w roztworach i *in vivo* (32), biorąc również pod uwagę wyniki badań struktury powstających w różnych ośrodkach agregatów chlorofilu.

Zaproponowano też (33), jako model centrum reaktywnego kompleks benzochinonowo-chlorofilowy (Ryc. 10), oparty na wynikach badania kompleksów chlorofilowo-dioksanowych.

Na podstawie badań modelowych proponuje się więc różne typy agregatów występujących w jednostkach fotosyntetycznych zarówno w centrach reaktywnych, jak i w układach absorbujących. Jak widać istnieje jeszcze duża rozbieżność zdań nawet w przypadku centrum reaktywnego. Trudno rozstrzygnąć który z poprzednio (12) i obecnie proponowanych modeli jest słuszny.

IV. Spektroskopia o czasowej zdolności rozdzielczej

Bardzo przydatne do ustalenie typu reakcji zachodzących w centrach oraz pośrednio ich budowy, są rozwinięte w ostatnich latach badania przebiegu reakcji fotochemicznych w czasie. Już od kilkunastu lat w szkole

* Symetrię zob. np. P.W. Atkins (1974), Molekularna mechanika kwantowa, s. 154. PWN, Warszawa.

Witt a (34) mierzono przebieg niektórych reakcji fotochemicznych procesu fotosyntezy, zachodzących w czasach rzędu 10 nsek. Jednakże należy obecnie prowadzić badania procesów relaksacji cieplnej drobin, przebiegające w czasach pikosekund (10^{-12} sek). W tym celu rozwinięte zostały specjalne techniki pomiarowe, przy użyciu których R e n z e p i s (35) zmierzył energie i czasy życia stanów wzbudzonych w centrach, w warunkach, w których mogą w nich zachodzić reakcje fotochemiczne i stwierdził, że utlenienie centrów przebiega w czasie około 120psek. Nie wyjaśnia to jednak, które stany wzbudzone biorą udział w tej reakcji. Warto zauważyć, że wewnątrzcząsteczkowe przejścia interkombinacyjne w chlorofilu nie są konieczne na to, by wędrująca w postaci singletowego wzbudzenia energia, mogła zostać przekazana do wyższych stanów trypletowych w centrum, gdyż jak wykazali na gruncie teorii Förstera R a h m a n i K n o x (36) oraz K n o x i G o s h (37), istnieje duże prawdopodobieństwo dwucząsteczkowego wygaszania wzbudzeń singletowych chlorofilu poprzez cząsteczki wzbudzone do poziomów trypletowych zgodnie z procesem:



Badania kinetyki zaników wzbudzenia rozstrzygnąć mogą w jakim stopniu jedno-, a w jakim dwucząsteczkowy proces przyczynia się do dezaktywacji wzbudzenia i jakie poziomy energetyczne są w tym zaangażowane. W przypadku organizmów występują dodatkowe trudności, gdyż należy rozpatrywać nie stany energetyczne chlorofilu, lecz kompleksów chlorofilowo-białkowych, które posiadają zwykle inne stany metatrwałe odpowiedzialne za reakcje fotochemiczne, niż chlorofil lub jego agregaty (38). Przy tym nie jest znana ani dokładna struktura, ani nawet skład chemiczny centrum reaktywnego (39). Np. na gruncie pomiarów widm kołowego dichroizmu, proponowano (40) centrum reaktywne w bakteriach składające się z czterech cząsteczek bakteriochlorofilu i dwóch bakteriofeofityny. Wydaje się, że proponowane na podstawie modelowych badań, struktury centrów, powinny być ściślej dopasowane do wyników dotyczących składu i struktury centrów reaktywnych badanych *in vivo* (41, 42).

V. Opisy procesu przekazywania energii wzbudzenia

Wewnątrz jednostek fotosyntetycznych zachodzi zarówno homogeniczne (pomiędzy jednakowymi cząsteczkami) jak i heterogeniczne przekazywanie energii, gdyż jednostka fotosyntetyczna składa się z całego szeregu różnych barwników oraz ich spektralnych odmian, tworzonych w oddziaływaniach z otoczeniem.

Przekazywanie energii dotyczy jej „przeskoku” pomiędzy cząsteczka-

mi — migracja energii natomiast, to wynik całego szeregu kolejnych aktów przekazania energii.

Zjawiska przekazywania energii w jednostkach fotosyntetycznych można opisywać dwojako. Można przybliżyć warstwę cząsteczek barwników w układzie lamellarnym przez dwuwymiarowy kryształ i stosując formalizm pasmowej teorii ciała stałego rozpatrywać wędrówkę ekcytonu wewnątrz tego kryształu. Drugi sposób polega na traktowaniu jednostki fotosyntetycznej jako roztworu cząsteczek barwników, pomiędzy którymi energia wzbudzenia zostaje przekazywana poprzez proces rezonansowy (1, 12, 43).

Od lat zestawiano te podejścia oraz porównywano kryteria ich stosowalności, przy czym najpopularniejsze opracowanie zbiorcze podaje monografia Claytona (1).

Zwracano też uwagę, że dane doświadczalne można wyjaśnić przy założeniu słabszych międzycząsteczkowych oddziaływań i większej wydajności pułapkowania, lub odwrotnie silniejszych oddziaływań i słabego pułapkowania (4). A więc niełatwo, na gruncie pomiarów *in vivo* rozstrzygnąć jakie oddziaływania występują. Kryteria podziału oddziaływań podane zostały przez Simpsona i Petersona (44), a następnie nieco zmodyfikowane (45). Kryteria te wykorzystano w podstawowych pracach Förstera (46) i są one podane we wszystkich pracach przeglądowych, na przykład (1, 4).

I tak podział Förstera opiera się na następującym porównaniu energii oddziaływania E pomiędzy D i A z energetyczną odległością ΔE pomiędzy kolejnymi poziomami oscylacyjnymi związanymi z danym przejściem elektronowym, oraz z energetyczną szerokością $\Delta E'$ poziomu oscylacyjnego:

$E > \Delta E$	oddziaływanie silne,
$\Delta E > E > \Delta E'$	oddziaływanie słabe,
$\Delta E' > E$	oddziaływanie bardzo słabe.

Decydującą wielkością jest iloczyn czasu życia τ i szybkość przekazywania K . Gdy $\tau K < 1$ to oddziaływanie jest bardzo słabe; jest ono silne gdy $\tau K \gg 1$.

Wg kryterium Simpsona i Petersona oddziaływania są silne, gdy stosuje się przybliżenie Borna-Oppenheimera tj. gdy można rozseparować funkcje falowe oscylacyjne i elektronowe. Inaczej mówiąc efekt silnych oddziaływań występuje gdy pasmo przesuwają się znacznie w wyniku oddziaływań, lecz bez zmiany swego kształtu zależnego od wzajemnego położenia i charakteru krzywych potencjalnych Francka-Condon.

Nawet bez rozstrzygnięcia mechanizmu odpowiedzialnego za przekazywanie energii, można omówić dwa zagadnienia: wpływ uporządkowania na przekazywanie energii oraz proces błędzenia energii wzbudzenia wewnątrz jednostki fotosyntetycznej, prowadzący do osiągnięcia przez nią centrum reaktywnego.

VI. Uporządkowania cząsteczek

Prowadzono doświadczalne badania uporządkowania barwników w centrach reaktywnych i układach „anten”. I tak znaleziono z liniowego dichroizmu fotoindukowanych zmian absorpcji związanych z utlenieniem centrum, że pierścienie chlorofilu w centrach są zorientowane prawie równolegle do płaszczyzny membran (47, 48). Badano również podobną metodą uporządkowanie innych barwników (49, 50).

Oprócz badań organizmów fotosyntetyzujących prowadzono badania modelowe i tak na przykład badano orientację grup chromoforowych bili-proteidów przez sztuczny ośrodek anizotropowy (51). Z wielu względów użyteczna przy próbach porównania wyników doświadczenia z teorią jest praca Eisingera i Dalea (52). Autorzy ci wyliczyli w konkretnych uproszczonych przypadkach orientacyjny czynnik występujący we wzorze na wydajność przekazywania energii (wzór 12). Czynnik ten można przedstawić:

$$(1) \quad \kappa = (\vec{D} \times \vec{A}) - 3(\vec{D} \times \vec{R})(\vec{A} \times \vec{R})$$

gdzie: \vec{D} i \vec{A} — momenty przejść donora i akceptora,

\vec{R} ← — wektor łączący środki wektorów momentów przejść.

Zwrócono uwagę, że należy odróżnić dynamiczne i statyczne wydajności przekazywania energii (52). Przypadek dynamiczny występuje wtedy, gdy czas potrzebny na przekazanie energii jest długi w porównaniu z czasem obrotu cząsteczek. W tym przypadku, każdej parze donora i akceptora odpowiadają różne konfiguracje, należy je przeto uśrednić. Średnie prawdopodobieństwo przekazywania ujmuje wzór 2.

$$(2) \quad \langle T \rangle_d = \frac{\langle K_{Ti} \rangle}{\tau_D^{-1} + \langle K_{Ti} \rangle}$$

gdzie: $\langle K_{Ti} \rangle$ — prawdopodobieństwo przekazywania przy i-tej konfiguracji, przy czym:

$$(3) \quad \langle K_{Ti} \rangle = \frac{\sum_i n_i K_{Ti}}{\sum_i n_i}$$

n_i — częstość, z którą występuje konfiguracja i,

τ_D — średni czas życia donora.

W przypadku statycznym występują w zespole par D i A różne wzajemne orientacje, lecz nie zmieniają się one w czasie przebywania wzbudzenia w cząsteczce donora. W wyniku średnie prawdopodobieństwo przekazywania energii wyraża wzór 4:

$$(4) \quad \langle T \rangle_s = \left(\frac{K_T}{\tau_D^{-1} + K_T} \right)$$

Z porównania wzoru 2 i 4 widać, że zawsze:

$$(5) \quad \langle T \rangle_d \geq \langle T \rangle_s$$

Różnica między prawdopodobieństwami statycznym i dynamicznym znika, gdy wszystkie momenty przejść są jednakowo uporządkowane. Ze wzoru 1 widać, że w przypadku izotropowego rozkładu momentów przejść donora i akceptora w przestrzeni, średni kwadrat czynnika orientacyjnego wynosi $\langle \kappa^2 \rangle = 2/3$.

Eksperymentalnie czynnik κ można wyznaczyć z pomiarów depolaryzacji emisji gdy znany jest cały szereg parametrów opisujących sytuację D i A w makrocząsteczce (53, 54):

$$(6) \quad \langle r \rangle = r_F \prod_i \langle d_i \rangle = r_F \prod_i \left(\frac{3}{2} \langle \cos^2 \theta \rangle - \frac{1}{2} \right)$$

gdzie: d_i — czynnik depolaryzacyjny,

r_F — anizotropia podstawowa (fundamentalna) emisji tj. otrzymana w przypadku gdy nie występują żadne czynniki depolaryzujące,

θ — zmiany kąta orientacji D wzgl. A przez dany czynnik depolaryzujący np. przez obroty grup chromoforowych.

Anizotropię emisji definiujemy jak zawsze jako:

$$(7) \quad r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

gdzie: I_{\parallel} i I_{\perp} — spolaryzowane składowe światła fluorescencji.

Jeżeli D i A są przymocowane do cząsteczki i posiadają po jednym przejściu elektronowym, przy czym momenty przejścia D są izotropowo rozłożone w roztworze, lecz wzbudzone światłem liniowo spolaryzowanym, to natychmiast po wzbudzeniu $r_F = 0,4$. Jeżeli D ma swobodę ruchu w stosunku do makrocząsteczki, to r maleje o czynniki

$$(8) \quad \langle d'_D \rangle = \frac{3}{2} \langle \cos^2 \theta'_T \rangle - \frac{1}{2}$$

gdzie uśrednienie przebiega po wszystkich wzbudzonych donorach, których momenty przejścia zmieniają się o kąt θ_D .

Jeśli zachodzi przekazywanie energii, to dodatkowo należy uwzględnić depolaryzację emisji akceptorów wzbudzonych przez przekazywanie energii:

$$(9) \quad r_{A(D)} = r_{FD} \left(\frac{3}{2} \langle \cos^2 \theta_T \rangle - \frac{1}{2} \right) = r_{FD} \langle d_T \rangle$$

gdzie: r_{FD} — podstawowa anizotropia donora,

θ_T — kąt między momentami przejść D i A.

Tę wartość $r_{A(D)}$ porównuje się z polaryzacją bezpośrednio wzbudzonych D i A

$$(10a) \quad r_D = r_{FD} \langle d'_D \rangle$$

oraz

$$(10b) \quad r_A = r_{FA} \left(\frac{3}{2} \langle \cos^2 \theta'_A \rangle - \frac{1}{2} \right) = r_{FA} \langle d'_A \rangle$$

gdzie: r_D, r_A — anizotropia D i A,

θ'_D, θ'_A — zmiany kątów orientacji wektorów momentów przejść D i A.

Anizotropię r_A i $r_{A(D)}$, można wyznaczyć bezpośrednio z pomiaru, jeśli widma D i A nie pokrywają się, lub z reguły sumacyjnej Webera, przy użyciu widm wzbudzenia, w przypadku pokrywania się widm. Reguła ta daje r_{obs} :

$$(11) \quad r_{obs} = \frac{r_A I_A + r_{A(D)} I_{A(D)}}{I_A + I_{A(D)}}$$

gdzie: I_A — natężenie emisji bezpośrednio wzbudzonego A,

$I_{A(D)}$ — natężenie emisji akceptora wzbudzonego w paśmie absorpcji D.

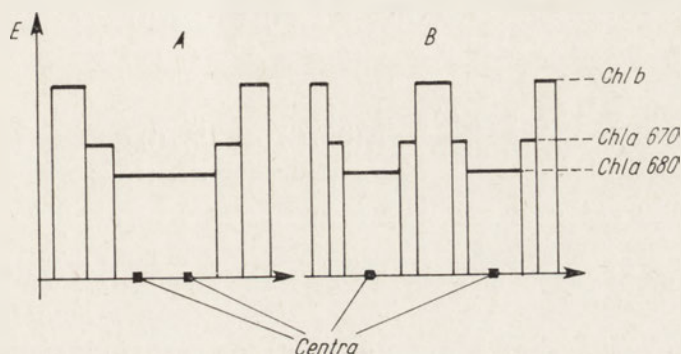
Aby skorzystać, z przytoczonych wzorów i wyliczeń (55), trzeba oszacować stopień swobody orientacyjnej D i A względem makrocząsteczki jako całości. Można zmierzyć r_D i r_A bądź przy wzbudzeniach bezpośrednich, bądź też otrzymać z wzoru 11, jednakże trzeba wyeliminować wpływ ruchu cząsteczki jako całości. W tym celu można stosować bądź techniki o czasowej zdolności rozdzielczej, bądź też badać układy w stanie równowagi. W pierwszym przypadku korzysta się z wzorów, które podają zmianę anizotropii jako funkcję czasu (55), w drugim ze wzorów na ekstrapolację polaryzacji ze zmianą temperatury, lepkości itp. (56). Tego typu pomiary należy najpierw wykonać stosując kompleksy barwniki-białko, a dopiero następnie badać lamellę jako całość. Można też badać najpierw warstwy monomolekularne na granicy dwóch faz (57, 58).

VII. Migracja energii wzbudzenia

Migracja energii wzbudzenia jest drugim zagadnieniem, które w pewnym zakresie można omówić nawet bez rozstrzygnięcia cząsteczkowego mechanizmu odpowiedzialnego za przekazywanie energii. Możemy opisywać przemieszczenie się wzbudzenia w jednostkach fotosyntetycznych bądź przy założeniu, że energia wzbudzenia jest zlokalizowana kolejno w poszczególnych cząsteczkach, bądź też przy założeniu, że przemieszcza się zde-lokalizowany ekscyton, a rozproszenie fali de Broglie'a z nim związanej następuje w odległościach porównywalnych ze stałymi sieci krystalicznej

(59). Ostatnie założenie jest spełnione w jednostkach fotosyntetycznych (59). Ekscyton rozważamy zresztą z reguły jako pseudocząstkę, gdyż formalizm falowy jest mniej dogodny do opisu (10).

A więc zawsze można modelowo mówić o przeskoku wzbudzenia między kolejnymi punktami, w których znajdują się cząsteczki, przy czym można przyjąć bądź przypadkową wędrówkę (*random walk*) energii wzbudzenia, bądź też założyć uprzywilejowany w jakiś sposób kierunek przekazywania energii. Przy rozważaniu układu cząsteczek zorientowanych (3)



Ryc. 2. Domeny fotosyntetyczne [60]:

E — energia wzbudzenia barwników

C — centra reaktywne

Bliżej centrów ułożone są barwniki o niższych energiach wzbudzenia.

A) przypadek domeny o dwóch centrach,

B) izolowane jednostki fotosyntetyczne domeny jednocentrowe.

występują zawsze uprzywilejowane kierunki migracji energii. Paillo-tin (60), poprzez założenie, że cząsteczki barwników o niższych energiach wzbudzenia ułożone są bliżej centrów reaktywnych, uzyskuje uprzywilejowanie przekazywania energii w kierunku centrum. Przy odpowiednim ułożeniu barwników, powstaje na granicach jednostek fotosyntetycznych bariera potencjału, mająca w różnych organizmach różne wysokości, co może wyjaśnić zarówno obserwowane w glonach i roślinach wyższych, energetycznie izolowane jednostki, jak również nie izolowane od siebie jednostki bakterii. Wprowadzono (60, 61) pojęcie domeny fotosyntetycznej: jest to część aparatu fotosyntetycznego, w którym może migrować wzbudzenie. Domena może zawierać więcej niż jedno centrum reaktywne (Ryc. 2). Autorzy rozważający migrację energii wzbudzenia w jednostkach fotosyntetycznych powołują się na jeden z dwu prostszych układów fizycznych, a mianowicie na migrację energii w kryształach molekularnych lub w roztworach molekuł fluoryzujących. Odpowiednikiem jednostki fotosyntetycznej w pierwszym przypadku, może być kryształ, w którym następuje tzw. „uczulenie przez gospodarza” (*Host-Guest Effect*). Wtedy energia migruje od bardzo dużej liczby cząsteczek „gospodarza” do cząste-

czki akceptora, która gra rolę pułapki wzbudzenia. Badano tak porfiryny, które w kryształach organicznych grały rolę „gościa” (62). Jest w takim układzie wiele cząsteczek uczulacza, tak jak wiele jest cząsteczek — „anten” w jednostkach fotosyntetycznych. Przy tym ekscytonów jest zwykle dużo mniej niż pułapek, a więc nie trzeba rozważać ani zagadnienia zderzeń ekscytonowo-ekscytonowych ani problemu nasycenia pułapek. Można też, w tym przybliżeniu, zaniedbać bezpośrednie wzbudzenie pułapek (63, 64).

Takie założenia prowadzą do prostego równania kinetycznego:

$$(12a) \quad \frac{dn_U(t)}{dt} = G(t) - \beta_U n_U(t) - K(t)n_U(t)$$

oraz

$$(12b) \quad \frac{dn_{AK}(t)}{dt} = K(t)n_U(t) - \beta_{AK} n_{AK}(t)$$

gdzie: $n_U(t)$ i $n_{AK}(t)$ — liczba wzbudzonych cząsteczek uczulacza i aktywatora.

Tego typu równania mogą służyć do sprawdzenia słuszności przyjętych przybliżeń, jeżeli zmierzymy β_U i β_{AK} tj. szybkości zaniku fluorescencji uczulacza U i aktywatora AK oraz gdy $G(t)$ jest znanym kształtem impulsu wzbudzającego. Tego typu pomiary wykonuje się badając kryształy molekularne (63). W równaniach tych nie zastosowano żadnych założeń dotyczących mechanizmu przekazywania energii. Jednakże analiza eksperymentalnych stałych równań 12 a i b może doprowadzić do informacji o tych mechanizmach. Niestety w przypadku złożonych układów *in vivo* analiza taka może nie być jednoznaczna.

Drugi rozważany układ fizyczny składa się zwykle z dwóch rodzajów cząsteczek: donora (D) i akceptora (A), rozłożonych przypadkowo w ośrodku nie uczestniczącym w procesie przekazywania energii wzbudzenia. Zakłada się przy tym, że liczba wzbudzonych cząsteczek D jest mała, wobec całkowitej liczby cząsteczek donora w roztworze. Oznacza to, że prawdopodobieństwo spotkania niewzbudzonego D w sąsiedztwie donora wzbudzonego jest bliskie jedności. Jeżeli założyć, że rzecz dzieje się w roztworze lepkiem, to proces dezaktywacji wzbudzonej cząsteczki donora zależy w istotny sposób od konfiguracji cząsteczek donorów i akceptorów w otoczeniu wzbudzonego donora. Rolę akceptora w roztworze luminezującym grać może na przykład dimer rozpuszczonego barwnika. W tym przypadku, jeśli założymy możliwość występowania szeregu przekazania pomiędzy cząsteczkami donorów przed osiągnięciem przez wzbudzenie akceptora, mamy model bardzo zbliżony do sytuacji w jednostkach fotosyntetycznych (65). Wpływ konfiguracji cząsteczek na migrację energii wzbudzenia D — A ujęto zarówno w klasycznej już pracy Förstera (66), jak i w grupie prac Jabłońskiego (67, 68). W pierwszym przypadku rozważano prawdopodobieństwo przekazania energii między parą jednakowych cząsteczek.

Oblicza się zanik prawdopodobieństwa wzbudzenia pierwszej cząsteczki $\rho_k(t)$ i wzrost w tym samym czasie prawdopodobieństwa wzbudzenia akceptora $\rho_l(t)$. Następnie autor zakłada, że procesy takie zachodzą pomiędzy wszystkimi parami donorów i akceptorów i otrzymuje wzór:

$$(13) \quad \frac{d\rho_k}{dt} = \sum_l K_{kl}[\rho_l(t) - \rho_k(t)] - \frac{1}{\tau} \rho_k(t); \quad K_{kl} = K_{lk}$$

gdzie: K_{kl} — liczba przekazania z k-tej do l-tej drobiny obliczonych na jednostkę czasu, która byłaby otrzymana przy $\rho_k = \text{const}$.

τ — średni czas życia wykładniczo zanikającego stanu wzbudzonego.

Równanie to opisuje przekazywanie energii, a nie reabsorpcję, gdyż w ostatnim przypadku promieniowanie i absorpcja byłyby procesami sukcesywnymi, a nie jak w tym równaniu procesami równoczesnymi. Z równania 13 wynika, że czas zaniku wzbudzenia w układzie nie zależy od liczby przekazywań, czyli suma prawdopodobieństw wzbudzenia k cząsteczek w chwili t, $\rho_k(t)$, jest równa sumie prawdopodobieństw wzbudzenia w czasie t = 0 pomnożonej przez czynnik wykładniczy zdający sprawę z zaniku wzbudzenia

$$(14) \quad \sum_k \rho_k(t) = \sum_k \rho_k(0) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

F ö r s t e r (66) rozpatruje sytuację taką, gdy jedna niewzbudzona drobina znajduje się w sąsiedztwie drobin pierwotnie wzbudzonej. Przy takim założeniu otrzymuje wzory na całkowite prawdopodobieństwo promieniowania każdej z tych dwu drobin (66, 65):

$$(15a) \quad F_D = \eta \frac{1 + \mu\eta\tau_0}{1 + 2\mu\eta\tau_0}$$

oraz

$$(15b) \quad F_A = \eta \frac{\mu\eta\tau_0}{1 + 2\mu\eta\tau_0}$$

gdzie: η — wydajność fluorescencji,

$\tau_0 = \frac{1}{\gamma}$ — naturalny czas życia fluorescencji; γ prawdopodobieństwo emisji fluorescencji na jednostkę czasu,

μ — prawdopodobieństwo przekazania energii pomiędzy D i A dla określonej konfiguracji tj. odległości i orientacji momentów przejść \vec{D} i \vec{A} .

Takie same wzory uzyskuje Jabłoński (55) jako szczególny przypadek swej teorii centrów luminezujących. Centrum luminezujące składa się z cząsteczki donora D umieszczonej w środku tzw. sfery aktywnej, w której może znajdować się kilka cząsteczek akceptora A. Luminezujące cząsteczki mogą zostać wzbudzone bezpośrednio przez światło lub poprzez

przekazanie energii, jeżeli nie były wzbudzone w momencie wzbudzenia D. Promień sfery czynnej można wybrać w pewnym stopniu dowolnie, lecz musi on być tak duży, aby można było zaniedbać przekazywanie energii od D do tych A, które znajdują się poza zasięgiem sfery czynnej. Z drugiej strony zbyt duży promień sfery czynnej utrudniałby rachunki. Przy niskich natężeniach światła można zaniedbać wzbudzenie więcej niż jednej cząsteczki D wewnątrz centrum luminezującego. Centra zawierające różne liczby A mają różne własności i występują one z różnymi prawdopodobieństwami.

W przypadku, gdy można zaniedbać wpływ sił międzymolekularnych na rozkład donora i akceptora Jabłoński, na podstawie teorii fluktuacji Smoluchowskiego otrzymuje prawdopodobieństwa występowania centrów zawierających określone liczby akceptorów. W najprostszym przypadku, przy założeniu występowania jednego akceptora w każdej sferze czynnej, wzory Jabłońskiego sprowadzają się do wzorów identycznych z otrzymanymi przez Förstera (wzory 15 a, b).

Oba przybliżenia molekularnego kryształu i roztworu prowadzą w wyniku do nieuporządkowanego błędzenia energii wzbudzenia między cząsteczkami luminezującymi lub też węzłami sieci pomimo, że w drugim przypadku wychodzi się przeważnie od rozważania pary D—A i dopiero następnie uwzględnia się w ten lub inny sposób, wpływ dalszych cząsteczek na migrację energii (66, 67), podczas gdy w pierwszym przypadku rozważa się migrację ekscytonu w całym kryształku molekularnym o znanej strukturze.

Ekscyton, czyli obojętny elementarny stan wzbudzenia składający się z elektronu i dziury, został wprowadzony w 1931 roku przez Frenkela do opisu delokalizacji wzbudzenia w ciałach stałych. Od tego czasu pojęcie ekscytonu było stosowane do wielu różnych układów, przy czym różni autorzy proponowali różne „systematyki” ekscytonów. Z dwóch podstawowych typów ekscytonów — Davidova i Wanniera — tylko pierwsze można stosować w rozważaniach fotosyntetycznych (11). Ekscytony Wanniera — tak zwane atomowe stosować można jedynie do kryształów jonowych, o silnych oddziaływaniach elektrycznych pomiędzy składnikami sieci. Są to ekscytony słabo związane, o odległościach między elektronem a dziurą większych niż odległości międzywęzłowe. W kryształach molekularnych cząsteczki zachowują w dużym stopniu swą indywidualność, gdyż oddziaływania wewnątrzmolekularne są dużo większe niż międzymolekularne. Te ostatnie traktować można jako zaburzenie w wyniku którego powstaje „davidovowskie” rozszczepienie poziomów energetycznych. Polaryzacja przejść związanych ze składowymi powstałymi w wyniku rozszczepienia zależy od symetrii sieci krystalicznej. W ekscytonie Davidova separacja ładunku jest tak mała, że cały ekscyton można przypisać jednemu z węzłów sieci. Stąd obrazowo mówi się o „przeskokach” ekscytonu między cząsteczkami kryształu. Jeśli w kryształku molekularnym ekscyton jest

wielokrotnie przekazywany między uczulaczami, to jego wędrówkę można opisać jako dyfuzję wzbudzenia (64). Postać współczynnika dyfuzji, opisującego ruch ekscytonu zależy od jego średniej drogi swobodnej, oraz od sieci kryształu. W przypadku, gdy średnia droga swobodna ekscytonu jest rzędu stałej sieci, a więc odległości między uczulaczami, to ekscyton „skacze” pomiędzy węzłami sieci i jest rozpraszany praktycznie na każdym węzle. W tym przypadku współczynnik dyfuzji zależy od odległości i czasu przeskoku. Gdy droga swobodna jest dłuższa, to ekscyton porusza się w sposób koherentny i jego współczynnik dyfuzji zależy od niej oraz od pędu ekscytonu.

Do opisu migracji singletowego ekscytonu w molekularnych kryształach stosuje się na ogół model niekoherentny: jest to więc model, który należy stosować również do jednostek fotosyntetycznych gdyż jedynie w bardzo niskich temperaturach i w bardzo czystych kryształach obserwuje się koherentny ruch ekscytonu. A więc w jednostkach fotosyntetycznych można zawsze mówić o lokalizacji wzbudzenia bądź też o zlokalizowanym ekscytonie.

VIII. Parametry charakteryzujące przekazywanie energii

Zbierzmy parametry, które służą do scharakteryzowania mechanizmu przekazywania energii:

1. Szybkość przekazywania energii (*energy transfer rate*), lub też liczba przekazania na jednostkę czasu $K[\text{sek}^{-1}]$; używany również bywa termin czas

przeskoku (*hopping time*) $\frac{1}{K}$.

2. Energia oddziaływania między partnerami, mierzona rozszczepieniem ekscytonowym poziomów w wyniku oddziaływania $D - A$.

3. Stała dyfuzji wzbudzenia — cm^2/sek ,

4. Odległość między partnerami $D - A$.

5. Krytyczna odległość R_0 między D i A , taka przy której prawdopodobieństwo przekazywania jest równe prawdopodobieństwu dezaktywacji wzbudzenia na innej drodze.

W poszczególnych teoriach występują inne wielkości związane przede wszystkim z wprowadzonym modelem, jak na przykład promień sfery czynnej w teorii J a b ł o Ń s k i e g o (68).

Bardzo dobry sposób na określenie mechanizmów przekazywania energii stanowi porównanie pomiarów depolaryzacji fluorescencji spowodowanej przekazywaniem energii z przewidywaniami teoretycznymi (54, 68). Wymaga to jednak przeprowadzenia specjalnych pomiarów na przykład pomiarów czasów życia oddzielnie dla dwu spolaryzowanych składowych światła fluorescencji.

IX. Mechanizmy przekazywania energii wzbudzenia w jednostkach fotosyntetycznych

Analogia pomiędzy kryształami molekularnymi, w których mierzony jest efekt „gościa” i „gospodarza”, a jednostkami fotosyntetycznymi nie jest zbyt ścisła. W kryształach molekularnych odległości między uczulaczem i aktywatorem są zwykle rzędu 20—30Å. Nie ma więc konieczności rozpatrywania dyfuzji wzbudzenia pomiędzy uczulaczami, aż do osiągnięcia aktywatora, a raczej trzeba mówić o dalekozasięgowym przekazywaniu rezonansowym (*long range resonance transfer, LRRT*) od dowolnego uczulacza do aktywatora. Przekazywanie to nazywane jest również mechanizmem rezonansowym, indukcją rezonansową, przekazywaniem Förstera-Dextera (64). W organizmach fotosyntetyzujących odległości między centrami reaktywnymi są dużo większe i wiadomo, że wzbudzenie jest przekazywane wielokrotnie (1) pomiędzy „antenami” zanim osiągnie centrum. Bliższe sytuacji panującej w jednostkach fotosyntetycznych są teorie, w których uwzględnia się dyfuzję jako zaburzenie LRRT (na przykład 64, 69). W teoriach tych wzbudzenie singletowe porusza się w sposób dyfuzyjny przez sieć „gospodarza”, ze skończonym prawdopodobieństwem przekazania go przez LRRT po każdym kroku wędrówki w sieci do jednego z aktywatorów. Dostajemy wtedy różne wyrażenia na fluorescencję uczulacza i aktywatora (64). Tego typu teorie dają dobre wyniki w przypadku, gdy R_{OUU} dla przekazywania między molekułami uczulacza i R_{OUAK} dla przekazywania od uczulacza do akceptora, są znacznie różne. W jednostce fotosyntetycznej warunek ten może być spełniony jeśli na przykład założymy, że energia singletowego wzbudzenia musi poprzez przejście interkombinacyjne zostać przekazana do stanu trypletowego cząsteczki w centrum reaktywnym.

Bardzo interesujące z punktu widzenia zastosowania w rozważaniach fotosyntetycznych są koncepcje Soosa i Powella (70), którzy proponują wprowadzenie rozszerzonych obszarów pułapkowania. Zamiast pojedynczej cząsteczki będącej pułapką, istnieje wtedy pewien obszar otaczający aktyuator, w którym prawdopodobieństwo pułapkowania jest większe niż w pozostałym obszarze kryształu „gospodarza”. Taki obszar przerywa przypadkowe błądzenie na czas wystarczająco długi, aby z pewnością zaszło pułapkowanie. Z całego rzędu danych dotyczących migracji singletowego wzbudzenia w kryształach organicznych (64), wynika, że nawet w tym stosunku prostym przypadku układów o znanej strukturze i składzie chemicznym, istnieje duża rozbieżność danych doświadczalnych. Rozbieżności te występują w przypadku danych dotyczących np. wygaszania fluorescencji uczulacza przez molekuły aktywatora. Należy to przypuszczalnie przypisać nieuwzględnieniu takich efektów jak na przykład oddziaływanie między uczulaczem a aktywatorem (70). Ilość efektów wtórnych w bardziej złożonych układach fotosyntetycznych, zmusza do dużej ostrożności w interpretacji danych dotyczących tych układów. Mimo to wzory, uzyskane na gruncie

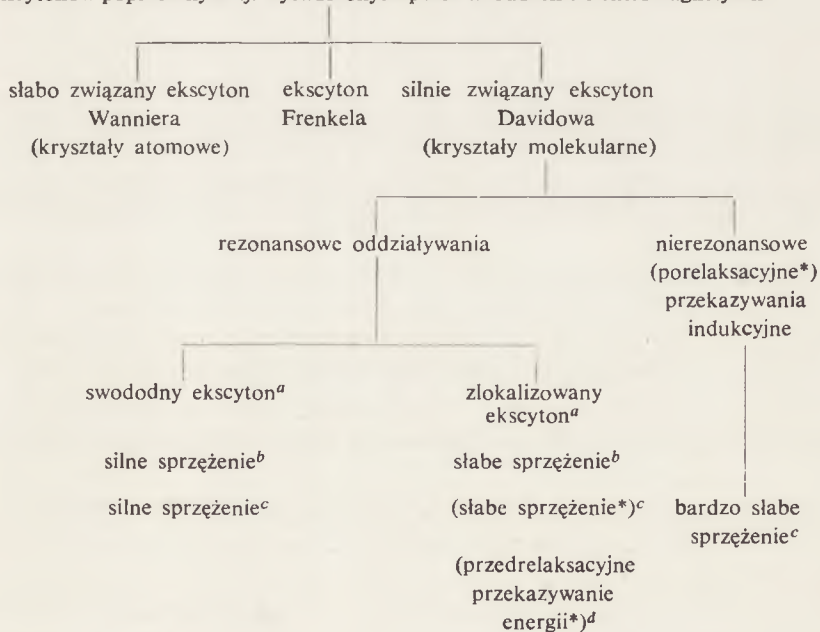
badania i obliczeń dotyczących kryształów molekularnych mogą i powinny być przymierzane do wyników uzyskiwanych dla układów modelowych z barwnikami fotosyntetycznymi.

Zbyt ściśle trzymanie się analogii pomiędzy kryształami molekularnymi i jednostkami fotosyntetycznymi prowadzi do odrzucenia wszystkich wyników, które mogą sugerować inne niż długozasięgowe rezonansowe porelaksacyjne przekazywania energii, czyli przekazywania typu Förstera-Dextera (71). Jak już wspomniano, wędrówkę wzbudzenia opisuje się przeważnie w formalizmie cząstkowym, a nie falowym. Mówi się bądź o przeskokach wzbudzenia, bądź o przekazywaniu pseudocząstki — ekscytonu. W tej sytuacji można i należy znaleźć analogię pomiędzy tymi dwoma opisami: opisem Förstera i opisem ekscytonowym. Takie próby wielokrotnie ponawiano. Förster rozszerzył swą teorię na zakres silniejszych oddziaływań, choć już wcześniej rozważał możliwość zastosowania mechanizmu przekazywania energii przy bardzo słabych oddziaływaniach do wyjaśnienia pierwotnych procesów fotosyntezy (66). Najczęściej cytuje się i używa w konkretnych procesach doświadczalnych analogii pomiędzy opisem ekscytonowym i rezonansowym, podanej przez Cl a y t o n a (1). Ostatnio nieco inne przyporządkowanie zaproponował K a s h a (11). Zestawienie tych propozycji zebrano w tabeli 1.

Tabela 1

Klasyfikacja ekscytonów (zmodyfikowana) (11)

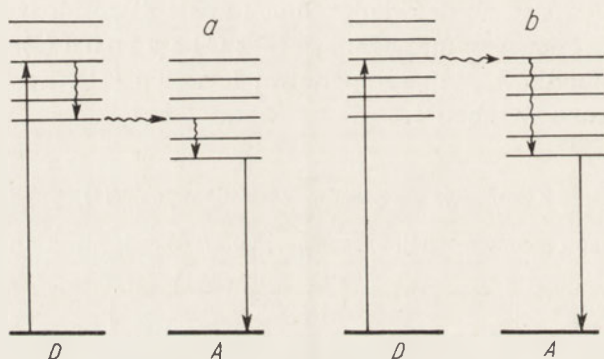
Modele ekscytonów poprzecznych tj. wytworzonych przez wzbudzenie elektromagnetyczne



a — według Dawidowa (11); b — według Simpsona i Petersona (44); c — według Förstera (53); d — według Eisingera (72); * — uzupełnienie dokonane przez autora artykułu.

X. Dyskusja schematu M. Kasha'y

Porównując różne teorie (tabela I) Kasha nie podaje zależności szybkości przekazywania energii odległości R pomiędzy D i A . Zależność ta może stanowić sprawdzian mechanizmu przekazywania energii. Jeśli energia jest przekazywana rezonansowo dzięki dipolowo-dipolowym bardzo słabym oddziaływaniom jest to szybkość $K \sim R^{-6}$. Tak jak wynika z doświadczenia w kryształach molekularnych przekazywana jest energia swobodnych singletowych ekscytonów. Ten sam typ zależności został wielokrotnie potwierdzony dla roztworów barwników, w przypadku migracji wzbudzeń singletowych (9, 72), a ostatnio również dla wzbudzeń trypletowych (73). W kryształach molekularnych występuje „prawdziwy” rezonans, podczas gdy w roztworach barwników, w przypadku heterogenicznych przekazywań (np. Chl $b \rightarrow$ Chl a) rezonans może zajść dopiero po oscylacyjnej relak-



Ryc. 3. Schemat porelaksacyjnego a) i przedrelaksacyjnego b) przekazywania energii. D — donor energii wzbudzenia, A — akceptor.

sacji cząsteczki donora, gdy któryś poziom oscylacyjny D znajdzie się w rezonansie z którymś z poziomów A (Ryc. 3a). Relaksacja cieplna zachodzi w czasie $\sim 10^{-12}$ s. Eisinger (74) przewiduje możliwość występowania w niektórych przypadkach przedrelaksacyjnych przekazywań energii (Ryc. 3b). Wprawdzie przy dipolowo—dipolowych oddziaływaniach w dalszym ciągu $K \sim R^{-6}$, ale obliczone z wzoru Förstera prawdopodobieństwo przekazywania będzie fałszywe, gdyż pokrywanie się widm emisji donora z widmem absorpcji akceptora przed relaksacją i po relaksacji jest różne (75). Nie uwzględniając „przedrelaksacyjności” przekazywania można dostać błędne R_0 (75).

Przy försterowskich silnych i słabych oddziaływaniach (tabela I) większość autorów przewiduje $K \sim R^{-3}$ (1, 46, 76, 77). Silne oddziaływania dotyczą przypadków, w których obowiązuje przybliżenie Borna-Oppenheime-

ra, a więc nie można do nich zaliczyć „opóźnionego heterogenicznego rezonansu” na przykład od Chl *b* → Chl *a*, bezsprzecznie występującego w organizmach fotosyntetyzujących.

Również w przypadku chlorofilu w podwójnych warstwach lipidowych (7) stwierdzono zależności $K \sim R^{-6}$ przy charakterystycznym dla LRRT $R_0 = 65\text{\AA}$. Na podstawie tych danych M. Kasha, jak wynika z dyskusji z jednym z autorów sądzi, że nie ma podstaw do rozpatrywania innej niż $K \sim R^{-6}$ zależności w przypadku układów fotosyntetyzujących, gdyż wystarczy ograniczyć się do bardzo słabych försterowskich oddziaływań, aby otrzymać zgodność z doświadczeniem. Istnieją jednak poszlaki, które omówione zostaną w następnym paragrafie, że przy przekazywaniu energii pomiędzy pigmentami chloroplastów $K \sim R^{-x}$ dla $x < 6$. Zastanówmy się jakie mogą być przyczyny występowania nietypowych zależności $K(R)$. We wzorach Förstera $K \sim R^{-6}$ pochodzi z energii elektrostatycznego oddziaływania. Energia oddziaływania dwóch stacjonarnych dipoli jest $\sim R^{-3}$. W przypadku dwu dipoli indukowanych jest to efekt II rzędu, więc energia jest $\sim R^{-6}$. Gdyby w grę wchodziły multipole innych rzędów można otrzymać odchylenia od $K \sim R^{-6}$, na przykład przy oddziaływaniu monopola z dipolem energia $\sim R^{-4}$ itp. Oddziaływania dwóch momentów przejść możemy rozpatrywać jako oddziaływania dwóch dipoli pod warunkiem, że odległość między ich środkami jest większa niż wymiary cząsteczek (3, 66). Warunek ten nie jest prawdopodobnie spełniony w przypadku chlorofilu — „anten” tworzących oligomer.

Nie wykluczony jest więc w tym przypadku udział innych multipoli w energii oddziaływania. Poza tym przy małych odległościach i silnych oddziaływaniach cząsteczek mogą oprócz sił rezonansowych grać rolę siły wymienne odpowiedzialne za agregację cząsteczek (78). Poza tym, jak już wspomniano, występowanie przedrelaksacyjnych migracji płytkich pułpek energii, lub też nieznanymi uporządkowań cząsteczek może prowadzić do pozornej niezgodności wyników doświadczenia z teorią.

XI. Wyznaczanie szybkości przekazywania energii

W poprzednim paragrafie omówiono już pewne prace popierające mechanizm LRRT. Wspomnijmy wobec tego obecnie o wynikach, które sugerują $K \sim R^{-x}$; $x < 6$. Pierwszą tego typu sugestią zaproponowano na podstawie badań przekazywania energii elektronowego wzbudzenia od chlorofilu *b* do chlorofilu *a* (79). Wyniki tych doświadczeń można wyjaśnić bądź przez założenie superpozycji przed i po relaksacyjnych przekazywań przy zachowaniu w obu mechanizmach $K \sim R^{-6}$, bądź też przez założenie jedynie „szybkiego” przekazywania przy $K \sim R^{-3}$. Biorąc pod uwagę małe zmiany stężeniowe widm badanych barwników, świadczące o bardzo słabych wzajemnych oddziaływaniach cząsteczek, autorzy (79) przychylają

się do pierwszego przypuszczenia i rozpatrują możliwość wpływu „powrotnych” przekazywań, które w badanym układzie mogą zachodzić przede wszystkim przedrelaksacyjnie, bo ze względu na przesunięcie stokesowskie między pasmem absorpcji i emisji, po relaksacji są mało prawdopodobne.

Za typową (R^{-6}) zależnością prawdopodobieństw przekazywania pomiędzy molekułami chlorofilów w roztworach, przemawiają również wyniki uzyskane w naszym laboratorium. Eksperymentalnie wyznaczone wydajności przekazywania pomiędzy chlorofilem c i chlorofilem a w roztworach dosięgają obserwowanych *in vivo* i zgodne są z teoretycznymi przewidywaniami (80, 81) teorii Förstera.

Odchylenia od rozpatrywanej zależności obserwuje się przede wszystkim w układach zawierających karotenoidy i porfiryny. Własności niektórych układów zawierających te barwniki można wyjaśnić kombinacją przed i po relaksacyjnego przekazywania energii (82).

Jeszcze bardziej przekonujące wyniki dotyczące szybkości przekazywania energii $K \sim R^{-3}$ otrzymano w przypadku luteiny i chlorofilu w układach detergentowych (83). W układach tych agregacja chlorofilu jest częściowo hamowana przez obecność luteiny, przy czym oba barwniki są wbudowane w układy micelarne. Wydajność przekazywania energii jest porównywalna z wydajnością *in vivo* (15%/0); R_0 , przy założeniu równomiernego układu barwników, wynosi 25Å. W dawniejszych pracach (84) przy badaniu podobnego układu (β -karoten z chlorofilem) otrzymano tak małe $R_0 = 8,5\text{Å}$, że trudno było mówić o dipolowo—dipolowym rezonansowym oddziaływaniu barwników (3). Otrzymane obecnie w układzie micelarnym wyniki (83) wydają się tym bardziej wiarygodne, że w podobnym ośrodku, ale zawierającym jedynie chlorofil a, otrzymano $R_0 = 56\text{Å}$ (86); chlorofil b — $R = 43\text{Å}$ (85). Obie te wielkości są zbliżone do R_0 roztworów tych chlorofili w typowych rozpuszczalnikach, co świadczy o tym, że wyniki w przypadku mieszaniny luteiny i chlorofilu nie są związane z tworzeniem miceli (85, 86). Wiadomo jednak, że w układach micelarnych powstaje wiele typów agregatów barwników (87) i agregatów barwnikowo-detergentowych (88), co utrudnia oszacowanie wzajemnych odległości D i A.

Również badania biliproteidów sinic (89) sugerują, że przy przekazywaniu energii wzbudzenia od tych kompleksów pigmentowo-białkowych do chlorofilu występuje zależność $K \sim R^{-x}$ gdzie $3 < x < 5$. Sugestie te opierają się jednak na grubych oszacowaniach odległości pomiędzy grupami chromoforowymi badanymi układów. Dokładniejsze badania i rachunki są obecnie w toku. Pewne jest już jednak, że zmiany w konformacji białek wpływają znacznie na wydajność przekazywania energii pomiędzy grupami chromoforowymi biliproteidów (90) oraz, że występują chromofory o różnej wydajności fluorescencji (51).

XII. Szybkie i powolne przekazywanie energii

Zastanówmy się jaka jest istotna różnica pomiędzy przekazywaniem energii przy silnym sprzężeniu (tablica I), zwanym też szybkim przekazywaniem ($K \sim R^{-3}$), a przekazywaniem przy bardzo słabym sprzężeniu — przekazywaniu powolnym ($K \sim R^{-6}$).

Podstawowa praca Förstera (66) dotyczy przekazywań powolnych — pomiędzy poszczególnymi aktami przekazywania energii zachodzi cały szereg oscylacji jąder. Przekazywanie następuje dzięki oddziaływaniom pomiędzy stanami elektronowymi D i A. Funkcje własne obu cząsteczek zależą jedynie od współrzędnych elektronowych. Przy przejściu wzbudzenia od k-tej do l-tej cząsteczki zmienia się również energia oscylacyjna tych cząsteczek. Jeśli w_0 jest przekazywaną energią elektronowego wzbudzenia oddaną przez k-tą cząsteczkę, to całkowita oddana energia jest:

$$w_0 + w'_k - w_k$$

gdzie:

w'_k i w_k — energie oscylacyjne tej cząsteczki w stanie wzbudzonym i podstawowym.

Energia zyskana przez l-tą cząsteczkę jest odpowiednio:

$$w_0 + w'_l - w_l$$

przy czym całkowita energia jest zachowana przy przekazywaniu energii, tak, że

$$\Delta w = w_k + w'_l - w'_k - w_l = 0$$

Z teorii promieniowania Diraca wiadomo, że liczba przejść na jednostkę czasu dla każdej, początkowo wzbudzonej cząsteczki jest

$$\simeq \int |U_{kl}(w'_k, w_l; w_k, w'_l)|^2 dw$$

przy czym element macierzy czysto elektronowego oddziaływania można zapisać

$$(17) \quad U_{kl}(\vec{r}_k, \vec{r}_l) = \int \rho'_k(w_k, \vec{r}_k)^* \rho_l(w_l, \vec{r}_l)^* U(\vec{r}_k, \vec{r}_l) \cdot \rho_k(w_k, \vec{r}_k) \rho'_l(w'_l, r_l) d\vec{r}_k \cdot d\vec{r}_l,$$

gdzie: \vec{r}_k, \vec{r}_l — są kolektywnymi współrzędnymi przestrzennymi elektronów dla odpowiednich cząsteczek.

Należy następnie uwzględnić fakt, że w stanie początkowym energia oscylacyjna ulega wielokrotnie zmianom, zanim nastąpi przeskok tej energii. Częstości występowania poszczególnych wartości energii oscylacyjnych dane są w stanie równowagi cieplnej przez odpowiednie unormowane funkcje rozkładu $g(w_l); g'(w'_k)$;

a więc stąd prawdopodobieństwo przeskoku otrzymuje się

$$(18) \quad K_{kl} = \frac{4\pi^2}{h} \int_{w=0}^{\infty} \int_{w_1=0}^{\infty} \int_{w'_k=0}^{\infty} g'(w'_k)g(w_1) \times \\ \times U_{kl}(w'_k w'_1, w_0 - w + w'_k; w - w_0 + w_1)^2 dw'_k dw_1 dw$$

gdzie:

w — średnia arytmetyczna energii oddanej i pobranej.

$U(\vec{r}_k, \vec{r}_l)$ jest dane przez oddziaływanie kulombowskie poruszających się elektronów. Przy przyjętych założeniach, że odległości międzymolekularne są duże w porównaniu z wewnątrz-molekularnymi, są to oddziaływania dipoli. Element macierzy momentu przejścia jest więc

$$(19) \quad \vec{M}_k(w_k, w'_k) = -e \int \rho_k(w_k, \vec{r}_k)^* \vec{r}_k \rho'_k(w'_k, \vec{r}_k) d\vec{r}_k$$

gdzie:

\vec{r}_k — środek ciężkości cząsteczki początkowo wzbudzonej,

w_k, w'_k — energia oscylacyjna jąder w stanie podstawowym i wzbudzonym.

Po uśrednieniu różnych orientacji momentów przejść, odpowiedniej normalizacji i uwzględnieniu, że dzięki oddziaływaniu z rozpuszczalnikiem przejścia zachodzą od stanu o określonej energii oscylacyjnej w'_k do stanu o energii zawartej w przedziale $w_k; w_k + w_k$ i podobnie dla cząsteczki 1 otrzymuje się wzór, który ma bezpośredni związek z widmami absorpcji i emisji:

$$(20) \quad K_{kl} = \frac{4\pi}{3h^2 n^2 R_{kl}^6} \int_{w=0}^{\infty} \left[\int_{w'_k=0}^{\infty} g'(w'_k) M(w_0 - w + w'_k, w'_k)^2 \cdot \right. \\ \left. \cdot \int_{w_1=0}^{\infty} g(w_1) M(w_1, w - w_0 + w_1)^2 dw_1 \right] dw,$$

n — współczynnik załamania,

R_{kl} — odległości pomiędzy środkami momentów przejść k -tej i l -tej cząsteczki.

Pierwsza z całek we wzorze 20 związana jest, poprzez współczynnik Einsteina A uśrednione dla różnych oscylacji stanu wzbudzonego z liczbą kwantów emitowanych spontanicznie przez cząsteczki w jednostce czasu, w przedziale energii $w; w + dw$, a więc z widmem emisji.

Podobnie druga całka związana jest z widmem absorpcji przez współczynnik $B(w, w + dw)$ i gęstość promieniowania.

Absorpcja jest łatwiej mierzalna, niż emisja. Dogodne jest więc czasem, przy założeniu zwierciadlanej symetrii widm absorpcji i emisji oraz odpowiedniości oscylacyjnych stopni swobody obu stanów, wyrażenie K_{kl} jedynie przez molarne współczynniki absorpcji (66).

Ostateczny wynik rozważań ująć można w znanym wzorze

$$(21) \quad K_{kl} = \frac{1}{\tau_0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

gdzie: R_0 jest krytyczną odległością, która może być oszacowana z połówkowej szerokości pasma absorpcji i z pokrywania się widm absorpcji i emisji. W przypadku roztworu chlorofilu Förster (66) otrzymał $R_0 = 80 \text{ \AA}$, co dość dobrze zgadza się z późniejszymi wartościami otrzymanymi z pomiaru $\tau = 5 \times 10^{-9}$ sek skąd otrzymano $R_0 = 60 \text{ \AA}$ (91). W późniejszych pracach (46) Förster rozszerzył swe rozważania dla słabych i silnych oddziaływań (tablica I), przy których $K \sim R^{-3}$.

Gueron i Eisinger (74) zwracają uwagę, że przypadek silnych oddziaływań różni się znacznie od typowego försterowskiego przekazywania.

Silne oddziaływania opisuje się przede wszystkim podając wielkość davidovowskich rozszczepień poziomów energetycznych, proporcjonalnych do energii oddziaływania $|U|$, podczas gdy bardzo słabe oddziaływania opisywane są przede wszystkim przez podanie szybkości migracji energii K .

Bardzo ciekawą próbę przejścia od teorii powolnych ($K \sim R^{-6}$) do szybkich ($K \sim R^{-3}$) oddziaływań podali ostatnio Kenkre i Knox (10). Zwykle w obu przybliżeniach stosuje się różne definicje szybkości przekazywania energii. Wynika to stąd, że dla słabo oddziaływujących cząsteczek (powolne przekazywanie) szybkość przekazywania otrzymuje się przy po-

mocy zależnego od czasu, rachunku zaburzeń jako $K \sim |U|^2 \sim \frac{1}{\Delta E}$

gdzie: U — energia oddziaływania,

ΔE — jest szerokością pasm związanych z przejściem biorącym udział w przekazywaniu energii.

Silne oddziaływania, w których $K \sim |U| \sim \frac{1}{R^3}$ występują raczej w układach rozciągniętych, w których przekazywanie energii rozpatruje się w oparciu o macierz gęstości i równania na średni kwadrat przesunięcia wzbudzenia (92). Nie ma bezpośredniego związku pomiędzy tymi dwoma przypadkami, pierwszy dotyczy układu dwóch cząsteczek, drugi — układu rozciągniętego.

Można jednak, jak pokazali autorzy (10), uzyskać treść obu przybliżeń jako przypadki graniczne jednego wyrażenia, jeśli wprowadzi się odpowiednią definicję szybkości przekazywania. Definiuje się wtedy szybkość przekazywania energii wzbudzenia w układzie cząsteczek jako odwrotność czasu, w którym średni kwadrat przesunięcia wzbudzenia wzrasta od 0 do a^2 ; gdzie a jest odległością międzymolekularną w rozpatrywanym łańcuchu cząsteczek.

Wprowadzony opis pozwala w sposób ciągły przejść poprzez pośrednie oddziaływanie od bardzo słabych ($K \sim R^{-6}$) do silnych ($K \sim R^{-3}$) oddzia-

ływań. Cząsteczki o złożonych widmach można opisać w tym samym formalizmie (10) przez wprowadzenie odpowiednio dobranej funkcji pamięci.

Teorię swą autorzy zastosowali do kompleksów złożonych z pięciu cząsteczek bakteriochlorofilu. Widma tych kompleksów wykazują silne przesunięcia dzięki międzymolekularnym oddziaływaniom (93). Opierając się na wynikach badań spektralnych autorzy obliczyli, że $K \sim R^{-5,9}$, tak, że mimo obserwowanego rozszczepienia poziomów, nie jest to jednak jeszcze przykład „szybkiego” przekazywania energii wzbudzenia.

Paillotin (60) rozważa oddziaływania rezonansowe zmodulowane przez oscylację jąder i dochodzi do wniosku, że zależność K od R jest złożona (pośrednia pomiędzy R^{-3} i R^{-6}), przy czym można posługiwać się zawsze zależnością $K \sim R^{-6}$ przy wprowadzeniu odpowiedniego czynnika korygującego.

Paillotin (60) zauważa podobnie jak Knox (3) dramatyczny wpływ uporządkowania cząsteczek na przekazywanie energii. Szacując przekazywanie energii w jednostkach fotosyntetycznych autor dochodzi do wniosku, że przy odległościach $\sim 15\text{\AA}$ pomiędzy chlorofilami zachodzi około 10^{12} przekazania energii na sekundę. Ruch wzbudzenia nie jest więc typowym „powolnym” przekazywaniem, w którym zwykle zachodzi od 10^{11} — 10^8 przekazania sek^{-1} (1). Paillotin łączy obserwowaną wydajność przekazywania energii w jednostkach z własnościami widmowymi chlorofilu, który ma małą energię deformacji w stanie wzbudzonym.

Jak widać, poglądy poszczególnych autorów są bardzo różne. Wydaje się, że należy dalej prowadzić badania modelowe, aby zwiększyć materiał doświadczalny dotyczący ewentualnego występowania silnych oddziaływań w układach biologicznych. Badać należy nie tylko przesunięcia energetyczne pasm, szczególnie w warunkach niskotemperaturowych, ale i szybkości przekazywania energii, uwzględniając przy tym możliwość występowania przed i porelaksacyjnych efektów.

Artykuł nadszedł 5.4.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 28.5.1976.

PIŚMIENNICTWO

1. Clayton R. K., (1967) *Molecular Physics in Photosynthesis*, Blaisdell, New York.
2. Duysens L. N. M., (1970), *Photobiological principles and Methods*, w *Photobiology of Microorganisms*, J. Willey and Sons Ltd, Chichester.
3. Knox R. S., (1973), *Transfer of Excitation Energy in Primary Molecular Events in Photosynthesis*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
4. Borisov A. Yu., Godik V. I., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **301**, 227 — 248.
5. Hoffmann P., (1975), *Photosynthese*, Akademie-Verlag, Berlin.
6. Govindjee, Govindjee R., (1974), *Sci. Amer.* **231**, 68—82.
7. Colbov K., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 320—327.
8. Thomas J. B., (1973), *Light Absorption, Energy Transfer and Photosynthetic*

- Units w Primary Molecular Events in Photosynthesis, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
9. Rabinowitch E. I., (1945) T.I, (1951) T.II(1), (1956) T.II(2), Photosynthesis, Interscience Publishers Inc., New York.
 10. Kenkre V. M., Knox R. S. (1974), *Phys. Rev. Letters*, **33**, 803—806.
 11. Kasha M., (1975), Molecular Excitions in Small Aggregates, International School of Atomic and Molecular Spectroscopy, Erice.
 12. Rabinowitch E. I., Govindjee, (1969), Photosynthesis, J. Willey and Sons Ltd, New York.
 13. Song P. S., Baba H., (1974), *Photochem. Photobiol*, **20**, 527—532.
 14. Wraight C. A., Clayton R. K., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **333**, 246—260.
 15. Wraight C. A., Leight J. S., Dutton P. L., Clayton R. K., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **333**, 401—408.
 16. Wilkinson F., (1975), Triplet Quantum Yields and Singlet-Triplet Intersystem Crossing w Organic Molecular Photophysics t. II, J. Willey and Sons Ltd, New York.
 17. Krasnovskij A. A., Romanyuk V. A., Litvin F. F., (1973), *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **209**, 51—54.
 18. Becker R. S., Kasha M., (1955), *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 3669—3681.
 19. Sievert J., Bent V. D., Schaafsma T. J., (1975), *Photochem. Photobiol.*, (przedruk).
 20. Dzhararov B. M., Sagun E. I., Gurinowitch G. P., (1974), *J. Appl. Spectr.*, **15**, 1195—1198.
 21. Harbour J. R., Tollin G., (1974), *Photochem. Photobiol.*, **19**, 147—161.
 22. Labhart H., Heinzelmann W., (1973), Triplet-Triplet Absorption Spectra of Organic Molecules w Organic Molecular Photosynthesis t. I., J. Willey and Soms Ltd, New York.
 23. Hoffman B. M., (1975), *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 1688—1694.
 24. Alpert B., Lindqvist L., (1975), *Science*, **187**, 836—837.
 25. Frank J., (1958), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **44**, 527—530.
 26. Zanker V., Erhardt E., (1968), *Z. Elektrochemie*, **72**, 267—271.
 27. Katz J. J., Norris J. R., (1973) w Current Topics in Bioenergetics t. V, str. 41—75, Academic Press Inc., New York.
 28. Ballschmiter K., Katz J. J., (1969), *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**, 2661—2677.
 29. Garcia-Morin M., Uphaus R., Norris J. R., Katz J. J., (1969), *J. Phys. Chem.*, **73**, 1066—1070.
 30. Fong F. K., (1975), *Appl. Phys.*, **6**, 151—166.
 31. Norris J. R., Scheer H., Katz J. J., (1975), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **244**, 260—280.
 32. Cotton T. M., Trifunas A. D. Ballschmiter K., Katz J. J., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **368**, 181—198.
26, 37—44.
 33. Le Brech J., Lebranc R. M., Antippa A. F., (1974), *Chem. Phys. Letters*, d'Orsay.
 34. Witt H. T., (1971), *Quartaly Reviews of Biophysics*, **4**, 365—477.
 35. Renzepis P. M., (1975), 5th International Biophysics Congres, Copenhagen, str. 19.
 36. Rahman V., Knox A. S., (1975), *Physica Status Solidi*, **B58**, 715—720.
 37. Knox R. S., Gosh V. J., (1975), *Photochem. Photobiol.*, **22**, 149—150.
 38. Hagar W. G., French C. S., (1974), *Ann. Rep. Director Dept. Plant Biol.* 706—716.
 39. Ke B., (1974), *Photochem. Photobiol.*, **20**, 542—546.

40. Straley S. C., Parson W. W., Manzerall D. C., Clayton R. K., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 597—609.
41. Reed D. W., Ke B., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3041J—3045.
42. Slooten L., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 15—27.
43. Frąckowiak D., (1973), *Postępy Fizyki*, **24**, 332—344.
44. Simpson W. T., Peterson D. L., (1957), *J. Chem. Phys.*, **26**, 588—610.
45. McRae E. G., Siebrand W., (1964), *J. Chem. Phys.*, **41**, 905—913.
46. Förster Th., (1965), w *Modern Quantum Chemistry, cz. III: Action of Light and Organic Molecules*, Academic Press, N. Y., 93—137.
47. Junge W., Eckhof A., (1973), *FEBS Letters*, **36**, 207—212.
48. Faludi-Daniel A., Breton J., (1975), *Photochem. Photobiol.*, **22**, 125—127.
49. Surma S., Frąckowiak D., (1970), *Photosynthetica*, **4**, 202—213.
50. Breton J., Michel-Villaz M., Paillotin G., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 42—56.
51. Frąckowiak D., Fiksiński K., Pieńkowska H., do druku, *Photochem. Photobiol.*
52. Dale R. E., Eisinger J., (1975) *Polarized Excitation Energy Transfer w Concepts in Biochemical Fluorescence*, red. R. F. Chen, H. Edelhoch, Marcel Decker Inc., N. Y.
53. Förster Th., (1965), *Pure Appl. Chem.*, **11**, 287—295.
54. Knox R. S., (1968), *Physica*, **39**, 361—386.
55. Jabłoński A., (1974), *Acta Phys. Chem.*, **3**, 223—229.
56. Pringsheim P., (1949), *Fluorescence and Fosforescence*, New York.
57. Tweet A. G., Gaines G. L., Bellamy W. D., (1964), *J. Chem. Phys.* **41**, 1008—1010.
58. Reinach P., Brody S. S., (1972) *Biochemistry*, **11**, 92—96.
59. Paillotin G., (1972), *J. Theor. Biol.*, **36**, 223—235.
60. Paillotin G., (1974), praca doktorska, L'Universite de Paris—Sud, Centre
61. Clayton R. K., (1967), *J. Theor. Biol.*, **14**, 173—186.
62. Kim B. F., Bohandy J., Jen C. K., (1974), *Spectrochim. Acta*, **30A**, 2031—2040.
63. Powell R. C., Soos Z. G., *Singlet Exciton Energy Transfer in Organic Solids*, przedruk z *Journal of Luminescence*.
64. Powell R. C., Kepler R. G., (1969), *Phys. Rev. Letters*, **22**, 636—649.
65. Bojarski C., (1974), praca habilitacyjna, *Zeszyty Naukowe Politechniki Gdańskiej, Fizyka*, **13**.
66. Förster Th., (1948), *Ann. Phys.*, **6**, 55—75.
67. Jabłoński A., (1955), *Acta Phys. Polon.*, **14**, 295—307.
68. Jabłoński A., (1970), *Acta Phys. Polon.*, **A38**, 453—458.
69. Kurskij Y. A., Selivavenko A. S., (1960), *Opt. Spectry.*, **8**, 340—348.
70. Soos Z. G., Powell R. C., (1972), *Phys. Rev.*, **B6**, 4035—4046.
71. Kasha M., — prywatna dyskusja.
72. Eisinger J., Lamola A. A., Longworth J. W., Gratzner W. B., (1970), *Nature*, **226**, 113—118.
73. Nakashima N., Kume Y., Mataga N., (1975), *J. Phys. Chem.* **79**, 1788—1793.
74. Gueron M., Eisinger J., Schulman R. G., (1967), *J. Chem. Phys.* **47**, 4077—4081.
75. Helene C., Montenay-Garestier Th., Charlier M., (1973), *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, **45**, 59—62.
76. Förster Th., (1960), w *Comporative Effects of Radiation*, J. Willey and Sons Ltd, str. 300, New York.
77. Szalay L., (1975), *Polish-Hungarian Symposium, Uniejów*.
78. Jehle H., (1973), *International J. Quantum Chemistry Symp.*, **7**, 585—556.

79. Bauer R., Szalay L., Tombacz E., (1972), *Biophys. J.*, **12**, 731—748.
80. Frąckowiak D., Wróbel D., (1973), *Biophys. Chem.*, **1**, 125—129.
81. Wróbel D., Salamon Z., Frąckowiak D., (1976), *Acta Phys. Polon.* **A49**, 269—274.
82. Salamon Z., (1973), *Bull. Acad. Polon. Sci.*, **21**, 1055—1060.
83. Szabad J., Lehoczki E., Szalay L., Csatorday K., (1974), *Biophys. Mechanism.*, **1**, 65—74.
84. Teale F. W. J., (1958), *Nature*, **181**, 415—416.
85. Lehoczki E., Csatorday K., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **396**, 86—92.
86. Csatorday K., Lehoczki E., Szalay L., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **376**, 268—273.
87. Lehoczki E., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **408**, 223—227.
88. Bor E., Hevesi J., (1974), *Acta Phys. Chem.* **22**, 357—364.
89. Frąckowiak D., Grabowski J., (1973), *Photosynthetica*, **7**, 402—404.
90. Frąckowiak D., Grabowski J., (1973), *Photosynthetica*, **7**, 305—310.
91. Duysens L. N. M., (1964), *Prog. Biophys.*, **14**, 48—52.
92. Kenkre V. M., (1974), *Phys. Lett.*, **47A**, 119—124.
93. Philipson K. D., Sauer K., (1967), *Biochemistry*, **11**, 1880—1886.

KOMUNIKAT

XV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbędzie się w drugiej połowie września 1977 r. w Gdańsku. W związku ze Zjazdem odbędzie się również Walne Zebranie Towarzystwa połączone z wyborem nowych Władz. Bliższe informacje o dokładnym terminie Zjazdu, terminie nadsyłania zgłoszeń i doniesień oraz programie naukowym Zjazdu rozesłane zostaną do wszystkich Członków Towarzystwa.

RENATA DĄBROWSKA *

Systemy regulujące cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni

Regulatory Systems of Contraction-relaxation Cycle of Muscle

Poprzednie dwa artykuły opublikowane w *Postęпах Biochemii* (1,2) dotyczyły współczesnych poglądów na budowę mięśni i mechanizm skurczu. Obecny artykuł poświęcony jest zagadnieniom regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni zwierząt w aspekcie filogenetycznym.

Podstawowym procesem powodującym skurcz mięśni jest interakcja aktyny z miozyną w obecności adenozynotrójfosforanu, który rozkładany przez ATP-azę aktomiozynową dostarcza energii do pracy mięśni. W czasie rozkurczu aktyna nie reaguje z miozyną. Regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni sprowadza się do kontroli interakcji tych białek.

Istnieją dwa systemy regulacji, które różnią się między sobą miejscem ich działania (3). W systemie, który kontroluje mięśnie szkieletowe kręgowców następuje blokowanie miejsc aktywnych aktyny biorących udział w interakcji z miozyną (*actin-linked system*). W systemie kontrolującym cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni mięczaków zapobieganie tworzenia kompleksu aktyny z miozyną wywołują zmiany w cząsteczce miozyny (*myosin-linked system*). Jakkolwiek mechanizm działania obydwu systemów jest całkowicie odmienny, wspólną cechą jest zależność ich funkcjonowania od stężenia jonów wapnia. A mianowicie: blokowanie interakcji aktyny z miozyną ma miejsce tylko w nieobecności jonów wapnia, zniesienie zaś blokowania może nastąpić przy podniesieniu stężenia tych jonów do 10^{-6} — 10^{-5} M (3).

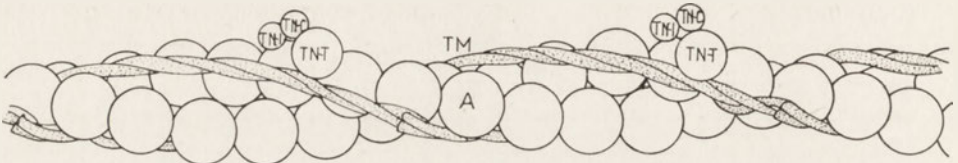
* Dr hab., Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: EDTA — sól sodowa kwasu etyleno-dwuaminoczwerooctowego; EGTA — sól sodowa kwasu etylenoglikolo-bis/eter β -aminometylo/-NN'-czteroocowego; DTNB — kwas 5,5'-dwutiobis-/2 nitrobenzoesowy/; TN—C, TN—I i TN—T — składniki troponiny; LC_{A1}, LC_{A2} i LC_{DTNB} — lekkie łańcuchy miozyny z mięśni szkieletowych kręgowców; LC_{EDTA} i LC_{SH} — lekkie łańcuchy miozyny z mięśni mięczaków.

I. Charakterystyka systemów regulacji

I-1. System regulacji związany z aktyną

Aktyna w swojej polimerycznej postaci superspirali (tzw. F-aktyny) stanowi trzon filamentów cienkich (4). W mięśniach szkieletowych kręgowców w cienkich filamentach oprócz aktyny występują białka, które z racji swojej funkcji w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego tych mięśni nazwano białkami regulującymi (5). Są to troponina i tropomiozyna. Tropomiozyna znajduje się w rowkach podwójnej spirali nici F-aktyny i tworząc liniowe polimery występuje na całej długości cienkich filamentów. Częsteczki troponiny rozmieszczone są na cienkich filamentach z okresowością 400Å (Ryc. 1). (5).

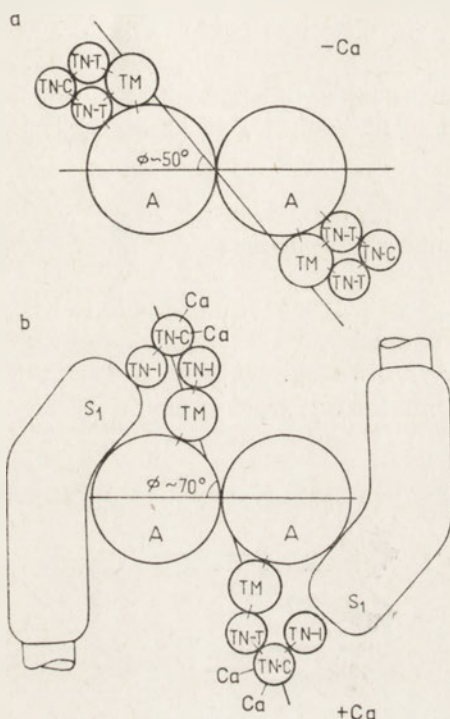


Ryc. 1. Schemat budowy cienkiego filamentu (7).

A — aktyna, TM — tropomiozyna, TN—I, TN—C, TN—T — składniki troponiny.

Badania lat siedemdziesiątych wykazały, że troponina jest białkiem heterogennym, składającym się z trzech składników: TN—I, TN—C i TN—T. Każdy z tych składników ma swoją specyficzną funkcję w systemie regulacji: TN—I, o masie cząsteczkowej 23 500, jest inhibitorem interakcji aktyny z miozyną niezależnie od stężenia jonów wapnia; TN—C, o masie cząsteczkowej 18 300, jest akceptorem jonów wapnia podczas skurczu mięśnia oraz powoduje, że współdziałanie aktyny z miozyną zależy od stężenia jonów wapnia; TN—T, o masie cząsteczkowej 39 000, wykazuje bardzo silne powinowactwo do tropomiozyny i F-aktyny (2,6). Szczegółowe badania interakcji poszczególnych składników troponiny z tropomiozyną i F-aktyną przy zastosowaniu metod fizykochemicznych, takich jak ultrawirowanie, sączenie przez Sephadex, chromatografia powinowactwa, wiskozymetria oraz metod mikroskopii elektronowej wykazały, że cząsteczka troponiny ma dwa miejsca przymocowania do cienkich filamentów: jedno poprzez TN—I, drugie poprzez TN—T. Połączenie poprzez TN—I istnieje tylko w nieobecności jonów wapnia, podczas gdy połączenie poprzez TN—T jest trwałe niezależnie od stężenia tych jonów (8—13). Składnik TN—C nie łączy się bezpośrednio ani z tropomiozyną ani z F-aktyną, natomiast łączy się zarówno z TN—I jak i TN—T (Ryc. 2). Zmiany konformacyjne zachodzące w cząsteczce TN—C podczas wiązania z nią wapnia przenoszą się na pozostałe składniki troponiny (14—16), powodując m.in. wzmocnienie wiązania TN—C — TN—I, co z kolei pociąga za sobą przer-

wanie wiązania między TN—I a tropomiozyną i aktyną (10, 13). Wydaje się, że tworzenie i przerywanie połączenia między TN—I i kompleksem tropomiozyna—aktyna zależnie od stężenia jonów wapnia powoduje zmiany pozycji nici tropomiozyny w stosunku do aktyny. Takie zmiany położenia tropomiozyny w zależności od stanu fizjologicznego mięśni szkieletowych żaby obserwowano *in vivo* stosując technikę niskokątowej dyfrakcji promieni X (17,18). Przypuszcza, że w stanie rozkurczu mięśni tropomio-



Ryc. 2. Proponowany mechanizm regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni w obecności systemu regulacji związanego z aktyną (25). a) Ułożenie białek w czasie rozkurczu, b) w czasie skurczu.

A—aktyna, TM—tropomiozyna, TN—I, TN—C, TN—T — składniki troponiny, S₁—subfragment 1 miozyny.

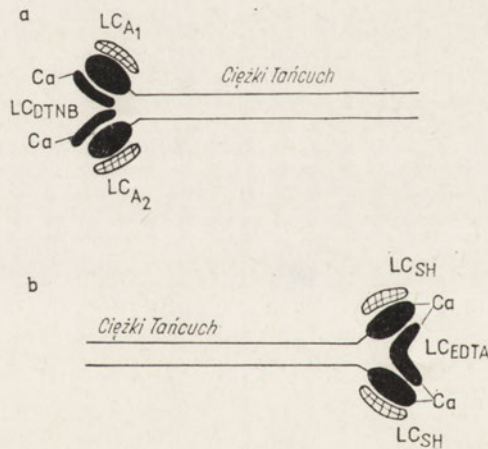
zyna zasłania te miejsca aktyny, które biorą udział w interakcji z miozyną (Ryc. 2a). W czasie skurczu tropomiozyna wsuwa się w głąb rowków podwójnej spirali nici F-aktyny umożliwiając współdziałanie aktyny i miozyny (Ryc. 2b). Tropomiozyna przenosi działanie jednej cząsteczki troponiny na siedem monomerów aktyny. Mechanizm regulacji charakteryzuje się kooperatywnością między monomerami aktyny (19).

Obecne poglądy na temat mechanizmu regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych kręgowców oparte zostały głównie na badaniach szybkich mięśni szkieletowych królika. Interesujące, że jakkol-

wiek troponina izolowana z mięśni zwierząt innych gatunków posiada te same trzy podjednostki funkcjonalne, to podjednostki te różnią się niektórymi własnościami i masami cząsteczkowymi; dotyczy to szczególnie TN—I i TN—T. I tak np. TN—I z mięśni rekinka psiego (*Squalus acanthias*) czy homara (*Homarus americanus*) posiada masę cząsteczkową około 30 000, a TN—T — 58 000 (20,21). Troponina wolnych mięśni szkieletowych królika i mięśni serca wołu posiada TN—I o masie cząsteczkowej 30 000, a TN—T o masie cząsteczkowej 42 000 (22—24). TN—C izolowany z mięśni różnych zwierząt nie różni się znacznie ani masą cząsteczkową ani właściwościami fizykochemicznymi, zmieniają się jednak parametry wiązania wapnia przez to białko. I tak np. troponina mięśni bezkręgowców wiąże tylko 1mol wapnia/mol białka (21), podczas gdy troponina kręgowców aż 4mole/mol (25).

1-2. System regulacji związany z miozyną

Mięśnie mięczaków nie posiadają troponiny. Ich cykl skurczowo-rozkurczowy podlega regulacji poprzez interakcję jonów wapnia z miozyną (26). Cząsteczka miozyny mięczaków, podobnie jak miozyna mięśni szkieletowych kręgowców, ma kształt wysoce asymetryczny. Jej część pałeczko-

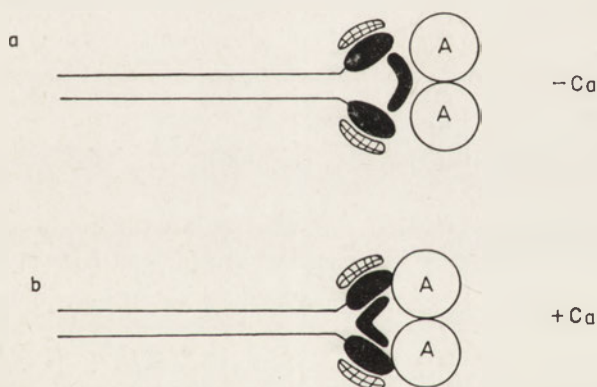


Ryc. 3. Schemat budowy cząsteczki miozyny. (Modyfikacja schematu wg 30). a) Miozyna mięśni kręgowców, LC_{A1}, LC_{A2}, LC_{DNTB} — lekkie łańcuchy miozyny kręgowców, b) Miozyna mięśni mięczaków, LC_{SH}, LC_{EDTA} lekkie łańcuchy miozyny mięczaków. Na schemacie uwidocznione są ewentualne miejsca przyłączenia wapnia do cząsteczki miozyny.

wata, która bierze udział w agregacji cząsteczek prowadzącej do wytworzenia grubych filamentów, wydaje się niczym nie różnić od miozyny kręgowców (27). W części globularnej, składającej się z dwóch głów tzw. subfragmentów 1 (S₁), w której znajduje się aktywność enzymatyczna oraz miejsce

interakcji z aktyną, występują niskocząsteczkowe fragmenty — tzw. lekkie łańcuchy (*light chains*), które oddysocjowują od reszty cząsteczki miozyny w stosunkowo łagodnych warunkach nie prowadzących do naruszenia całej cząsteczki. Te fragmenty różnią się jednak od lekkich łańcuchów miozyny mięśni szkieletowych kręgowców (27, 28). Miozyna mięśni szkieletowych królika posiada trzy rodzaje lekkich łańcuchów: dwa o masach cząsteczkowych 26 000 i 16 000 (LC_{A1} i LC_{A2}), występujące w ilości 1mol/mol miozyny, które oddysocjowują w środowisku alkalicznym oraz lekkie łańcuchy o masie cząsteczkowej 18 000 (LC_{DTNB}) występujące w ilości 2moli/mol miozyny i oddysocjowujące pod wpływem DTNB (Ryc. 3a) (29). Miozyna mięczaków posiada dwa rodzaje lekkich łańcuchów: łańcuchy LC_{SH} występujące w ilości 2moli/mol miozyny odszczepiane od miozyny przy pomocy siarczanu dodecyłu, łańcuch LC_{EDTA} w ilości 1mol/mol miozyny, usuwany przez działanie EDTA (Ryc. 3b) (27). Obydwa rodzaje lekkich łańcuchów posiadają masę cząsteczkową około 18 000.

Występowanie różnic w kompozycji lekkich łańcuchów miozyny mięśni mięczaków i mięśni szkieletowych kręgowców nie jest zaskakujące, gdyż różnice w stechiometrii i masach cząsteczkowych lekkich łańcuchów obserwowano już wcześniej w przypadku miozyny izolowanej z mięśni wolnych i szybkich królika, mięśni serca czy mięśni gładkich izolowanych z różnych narządów (31—33).



Ryc. 4. Proponowany mechanizm regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni w obecności systemu regulacji związanej z miozyną.

Schemat opracowany na podstawie 27 i 30. a) Ułożenie białek w czasie rozkurczu, b) w czasie skurczu.

A — aktyna. Porównaj objaśnienie do Ryc. 3.

Rola lekkich łańcuchów nie została jeszcze dokładnie poznana. Przypuszcza się, że zmiany w kompozycji lekkich łańcuchów miozyny izolowanej z różnych typów mięśni odpowiadają za różnice w jej aktywności enzymatycznej. Wiadomo np., że lekkie łańcuchy miozyny mięśni szkieletowych

LC_{A1} i LC_{A2} niezbędne są dla aktywności enzymatycznej miozyny, podczas gdy łańcuch LC_{DTNB} można usunąć bez utraty tej aktywności (29).

Pośród lekkich łańcuchów miozyny mięczaków poznano dotąd tylko rolę LC_{EDTA}. Posiada on kluczowe znaczenie w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni tych zwierząt; jego usunięcie pozbawia miozynę w połączeniu z aktyną wrażliwości na działanie jonów wapnia oraz zmniejsza zdolność wiązania tego kationu z 1,67 $\mu\text{mola/g}$ do 0,78 $\mu\text{mola/g}$ miozyny (27). Po rekombinacji „odczulonej” miozyny i LC_{EDTA} w obecności dwuwartościowych kationów obydwie te właściwości zostają przywrócone. LC_{EDTA}, mimo że ani sam nie posiada właściwości enzymatycznych ani nie wiąże jonów wapnia, działa jako podjednostka miozyny regulująca skurcz, hamując interakcję miozyny z aktyną tylko w nieobecności jonów wapnia, podobnie jak to czyni kompleks białek troponina—tropomiozyna regulująca skurcz mięśni szkieletowych kręgowców. Sposób, w jaki jony wapń i LC_{EDTA} regulują interakcję aktyny z miozyną mięczaków nie został jeszcze zbadany. Istnieją hipotezy, że LC_{EDTA} w nieobecności jonów wapnia łączy się z obydwoma globularnymi subfragmentami miozyny (S₁), wpływając na nie w taki sposób, że nie mogą one reagować z aktyną (27). Taka sytuacja odpowiada stanowi rozkurczu mięśni (Ryc. 4a). Pod wpływem jonów wapnia następują zmiany konformacyjne w LC_{EDTA}, powodujące odsłanianie tych miejsc miozyny, które reagują z aktyną a w konsekwencji powodują skurcz mięśni (Ryc. 4b).

Ten mechanizm regulacji nie wymaga obecności tropomiozyny, nie obserwuje się też kooperatywności między monomerami aktyny. Jeden LC_{EDTA} blokuje jedną cząsteczkę miozyny.

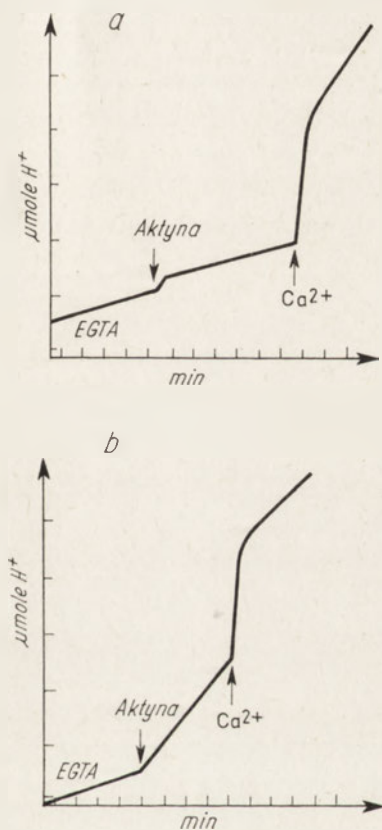
II. Sposoby klasyfikacji systemów regulacji

Aktyna stymuluje aktywność enzymatyczną miozyny zależnie od typu mięśni od kilku do kilkuset razy (1). Miarą interakcji aktyny z miozyną *in vitro* jest więc poziom aktywności ATP-azy aktomiozynowej w obecności ATP.

II-1. Kompetycyjna aktywacja aktomiozyny przez aktynę

Test ten służy do identyfikacji systemu regulacji związanego z miozyną i polega na mierzeniu wpływu nadmiaru czystej aktyny na aktywność enzymatyczną miofibryli lub aktomiozyny wyizolowanej z badanych mięśni. W przypadku występowania systemu regulacji związanego z miozyną, w nieobecności jonów wapnia, dodana aktyna nie może reagować z miozyną obecną w badanym systemie (patrz rozdz. I-2) i aktywność ATP-azy aktomiozynowej jest niska. Podwyższenie poziomu aktywności ATP-azy następuje dopiero po wprowadzeniu do środowiska jonów wapnia (Ryc. 5a).

Obecność systemu regulacji związanego z aktyną ujawnia się w takim układzie podwyższeniem aktywności ATP-azy w nieobecności jonów wapnia na skutek interakcji dodanej aktyny z miozyna obecną w układzie; własna aktyna nie reaguje z miozyna, gdyż w nieobecności jonów wapnia jest ona zablokowana przez białka regulujące znajdujące się w cienkich filamentach. Wprowadzenie wapnia nie zmienia już w tej sytuacji aktywności enzymatycznej aktomiozyny (Ryc. 5b). Obserwowany zanik wrażliwości ATP-azy



Ryc. 5. Identyfikacja systemów regulacji. Wpływ aktyny królika na własności enzymatyczne miofibryli z mięśni posiadających system regulacji związany z miozyna (a) oraz z mięśni posiadających system regulacji związany z aktyną (b).

Poziom aktywności miofibrylarniej ATP-azy określa rejestrowana na pH-stacie ilość uwalnianych protonów po dodaniu ATP w obecności 1mM MgCl₂, 25mM NaCl oraz 1mM EGTA lub 1mM CaCl₂ (28). Wybuchowe uwalnianie protonów po dodaniu jonów wapnia jest skutkiem wyperania ich z EGTA przez wapń.

aktomiozynowej na działanie jonów wapnia jest bezspornym dowodem istnienia regulacji, w której biorą udział troponina i tropomiozyna. W przypadku braku zmian aktywności ATP-azy aktomiozynowej badanych mięśni pod wpływem aktyny w nieobecności jonów wapnia wiadomo, że regulacja

skurczu związana jest z miozyną, ale nie wyklucza to istnienia również drugiego systemu regulacji związanego z aktyną. Wówczas muszą być przeprowadzone dodatkowe badania (patrz rozdz. II-3, II-4).

II-2. Kompetycyjna aktywacja aktomiozyny przez miozynę

Test ten służy do wykrywania systemu regulacji związanego z aktyną. Polega on na pomiarach aktywności ATP-azy aktomiozyny lub miofibryli badanych mięśni w obecności i nieobecności jonów wapnia po dodaniu nadmiaru miozyny z mięśni królika. Różnice w poziomie aktywności ATP-azy wskazują na tworzenie kompleksu pomiędzy dodaną miozyną i aktyną znajdującą się w badanym systemie. Wrażliwość na wapń przyrostu aktywności ATP-azy wskazuje na obecność systemu regulacji związanego z aktyną, brak czułości na działanie jonów wapnia wskazuje na brak tego systemu regulacji. Test ten może być zastosowany tylko w przypadku mięśni posiadających niską aktywność ATP-azy aktomiozynowej; w przypadku wysokiego poziomu aktywności ATP-azy wyjściowej trudno jest ocenić jej wrażliwość na działanie jonów wapnia po dodaniu miozyny z mięśni królika.

Obydwa wyżej opisane testy opracowane przez Lehmana i wsp. (3,34) pozwalające na identyfikację systemów regulacji skurczu w poszczególnych typach mięśni różnych gatunków zwierząt są bardzo wygodne ze względu na prostotę ich wykonania i możliwość użycia do doświadczeń bardzo małych próbek badanych mięśni. Inną zaletą jest to, że przeprowadza się je stosując systemy kurczliwe (miofibryle lub aktomiozyna), poddawane stosunkowo niewielu manipulacjom prowadzącym do ich izolacji, które mogą powodować zmiany struktury białek lub zmiany w ich stechiometrii.

II-3. Badanie miozyny

Obecność systemu regulacji związanego z miozyną można łatwo wykazać przy użyciu czystej miozyny. W przypadku, kiedy możliwe jest wydzielenie czystej miozyny sprawdza się czy po dodaniu do niej czystej aktyny aktywność ATP-azy otrzymanej w ten sposób syntetycznej aktomiozyny wrażliwa jest na działanie jonów wapnia, tj. czy obserwuje się hamowanie aktywności ATP-azy w nieobecności tych jonów. Uzupełniającym testem jest sprawdzenie, czy preparaty czystej miozyny są zdolne do wiązania jonów wapnia.

II-4. Badanie cienkich filamentów

Izolacja cienkich filamentów umożliwia sprawdzenie, czy w ich obrazie elektroforetycznym znajdują się białka o niskich masach cząsteczkowych odpowiadających składnikom troponiny. Zwykle obecność niskocząstecz-

kowych białek obok aktyny i tropomiozyny w preparatach cienkich filamentów jest w korelacji z testami funkcjonalnymi charakterystycznymi dla troponiny, tj. zdolnością wiązania jonów wapnia oraz hamowaniem w nieobecności tych jonów ATP-azy aktomiozyny rekonstruowanej z cienkich filamentów i miozyny królika. Brak troponinowych komponent na elektroforegramach cienkich filamentów świadczy na ogół o regulacji związanej wyłącznie z miozyną (34). Interesująca jest obecność tropomiozyny w cienkich filamentach, np. mięśni mięczaków, w których jak wiadomo, nie pełni ona funkcji w regulacji.

W obecności dwu systemów regulacji zwykle wypadkowa wrażliwość na działanie jonów wapnia aktywności ATP-azy aktomiozynowej jest wyższa niż indywidualnych składowych mierzona w obecności aktyny lub miozyny królika (35). Także wiązanie jonów wapnia w obecności obydwu systemów regulacji przebiega w sposób synergiczny, tzn. ilość wiązanego wapnia jest wyższa niż ta, którą wiążą miofibryle w przypadku występowania pojedynczych systemów regulacji (36).

III. Występowanie systemów regulacji w świecie zwierzęcym

Opierając się na wynikach testów omówionych w rozdziale II przeprowadzono klasyfikację systemów regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni około 100 gatunków zwierząt (34). Jak pokazuje rycina 6 dystrybucja systemów regulacji w świecie zwierzęcym jest względnie prosta; na ogół zwierzęta należące do tych samych typów lub gromad posiadają ten sam system regulacji. Pojedyncze systemy regulacji występują stosunkowo rzadko. Pojedynczy system regulacji związany z aktyną posiadają mięśnie szkieletowe kręgowców i wszystkich badanych strunowców (13 gatunków), włączając beczaszkiwce zajmujące wśród strunowców najniższy szczebel rozwoju filogenetycznego. Pośród bezkręgowców system kontroli przez aktynę wykazano w szybkich mięśniach stawonogów z rzędu dziesięcionogów (14 gatunków) i łasonogów (2 gatunki). Pojedynczy system regulacji związany z miozyną stwierdzono w mięśniach mięczaków (23 gatunki, włączając: obunerwce, ślimaki, małże i głowonogi), szkarłupni (2 gatunki), wstężnic (2 gatunki), szcztenic (1 gatunek) oraz ramienionogów (1 gatunek). Podwójna kontrola regulacji występuje u wszystkich badanych owadów (12 gatunków), u przedstawicieli staroraków (skrzypłocz — *Limulus polyphenus* i *Eurypelma*), wąsonogów (4 gatunki), równonogów (6 gatunków), obunogów (7 gatunków) i rawek (1 gatunek). Podwójny system regulacji posiadają także mięśnie wszystkich badanych pierścienic z wyjątkiem szcztenic (4 gatunki) oraz mięśnie reprezentującej nicienie glisty ludzkiej (*Ascaris lumbricoides*) (1 gatunek). Wolne mięśnie szczypiec i wolne mięśnie brzuszne homara posiadają także obydwa systemy regulacji, jakkolwiek szybkie mięśnie ogona homara mają już tylko jeden system, związany z aktyną. W mięśniach sikwiaków także występują różne systemy regulacji w ra-



Ryc. 6. Występowanie systemów regulacji w świecie zwierzęcym (34).

Typy bądź gromady zwierząt, w mięśniach których wykryto system regulacji związany z mięzną zaznaczono na drzewie ewolucyjnym liniami poziomymi, system regulacji związany z aktyną, liniami pionowymi, zaś obydwie systemy regulacji reprezentują linie pionowe i poziome. Skróty na rycinie oznaczają, Spor. — zarodnikowce, Flagellata — wiciowce, Ciliata — orzęski, — Rhiz. — Korzenionózki, Spongia — gąbki, Scyphoz. — krążkopławy, Hydroz. — stulbiopławy, Cten. — żebrapławy, Anthoza — koralowce, Coelent. — jamochtony, Coelomata — Coelomata, Blast. — Blastoidea, Crinoida — liliowce, Holoth. — strzykwy, Echinoid. — jeżowce, Aster. — rozgwiazdy, Ophiur. — węzowidła, Cyst. — Cystoidea, Eschionderm. — szkarłupnie,

mach tej samej gromady. Mięśnie *Dendrostromum pyroides* wykazują tylko jeden, aktywny system regulacji, ich miozyna nie wykazuje funkcji regulujących, chociaż wiąże wapń. Dwa inne gatunki tej gromady posiadają obydwie systemy regulacji (cyt. wg 34). Ostatnie badania wskazują, że mięśnie gładkie żołądków kurcząt stanowią również wyjątek pośród mięśni gładkich — kontrola ich skurczu jest związana z miozyną (37).

IV. Ewolucyjne i funkcjonalne aspekty systemów regulacji

W 1972 roku Lehman i wsp. (3) po przeprowadzeniu klasyfikacji systemów regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni około 50 gatunków zwierząt postawili hipotezę, że system regulacji związany z miozyną, jako znacznie prostszy i występujący tylko u mięczaków i bezkręgowców, jest ewolucyjnie wcześniejszy niż system regulacji związany z aktyną. Rozszerzenie jednak klasyfikacji do około 100 gatunków i znalezienie systemu regulacji związanego z aktyną m.in. u przedstawicieli nicieni (cyt. wg 34) i śluzowców (38—39) nie pozwala na podtrzymanie tej hipotezy.

In vivo regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni może ulegać zmianom kilkoma sposobami:

- a) przez obniżenie syntezy białek regulujących
- b) przez wytworzenie nieaktywnych białek regulujących
- c) przez zmianę miejsca aktywnego aktyny, lub miozyny, do którego wiążą się białka regulujące.

d. c. podpisu do Ryc. 6

Grapt. — graptolity, Pterobr. — piórskrzelne, Enteropn. — jelitodyszne, Tunicata — osłonice, Acr. — beczaszki, Agnatha — bezzuchowowce, Elsmobr. — spodoustne, Actinopt. — faldo-pietwe, Dipnoi — dwudyszne, Crossopt. — trzonopietwe, Urodela — płazy ogoniaste, Anura — płazy bezogoniaste, Stegoceph. — płazy tarczogłowe, Reptiles — gady, Chelon. — żółwie, Pterod. — pterozaurowe, Pleis. — plezozaurowe, Croc. — krokodyły, Lepidosaura — lepidozaurowe, Rh. — ryłogłowe, Dinos. — dinozaurowe, Theriod. — ssakożębne, Monot. — stekowce, Multit. — wieloguzkowce, Marsup. — torbacze, Insectiv. — owadożerne, Rodent. — gryzonie, Chir. — nietoperze, Carniv. — drapieżne, Primates — naczelnice, Homo — człowiek, Artiodactyl. — parzystokopytne, Perissodactyl. — nieparzystokopytne, Candyl. — prakopytne, Creod. — pradrapieżne, Proboscid. — słonie, Cetacea — walenie, Nemer. — wstężnice, Turbel. — wyplawki, Cest. — tasiemce, Trem. — przywry, Acanthoceph. — kolcogłowy, Gord. — włośniaki, Nematoda — nicienie, Rotif. — wrotki, Brach. — ramienionogi, Ectoproct. — mszywioly, Sipunc. — sikwiaki, Solen. — bezplytkowce, Lamellib. — małże, Cephalopod. — głowonogi, Gasteropod. — brzuchonogi, Amphin. — obunierwce, Priap. — gruboryjkowe, Echiur. — długoryjkowe, Polychaeta — wieloszczety, Hirud. — pijawki, Oligoch. — skąposzczety, Onych. — pazurnice, Tard. — niesporaczki, Arthropoda — stawonogi, Crustacea — skorupiaki, Cop. — widłonogi, Lept. — Leptostraca, Isopod. — równonogi, Amphipod. — obunogi, Decapoda — dziesięcionogi, Mysid. — lasonogi, Hoploc. — rawki, Cirrip. — wąsonogi, Phyllop. — liścionogi, Chelic. — szczękoczułkowce, Mero. — staroraki, Sca. — skorpiony, Pal. — głaszczkochody, Araneid. — pająki, Phal. — kosarze, Sal. — solpugi, Ps. Sc. — zaleszczotki, Diplo. — dwuparce, Pa. — skąponogi, Sy. — drobnonogi, Chil. — pareczniki, Insecta — owady, Collem. — skoczogonki, Prot. — pierwogonki, Diplura — widłogonki, Blatt. — karacznaki, Thysan. — przyleżnice, Odon. — ważki, Eph. — jętki, Mant. — modliszki, Fortic. — skoroki, Coleop. — chrząszcze, Term. — termyty, Locust — szarańczaki, Homop. — pluskwiaki równoskrzydłe, Heter. — pluskwiaki różnoskrzydłe, Hymenopt. — błonkówek, Dipt. — muchówki, Lepidopt. — motyle, Panorp. — wojsilki, Sial. — zabarwice, Hemer. — życiorkowate, Pedic. — wszy, Psoc. — gryzki, Perl. — widelnice, Pho — podkrzewiny

Istnieje ponadto możliwość mutacji powodująca szczególną wrażliwość systemu regulacji na wszelkie manipulacje biochemiczne i wówczas zachowanie białek *in vitro* może nie być odbiciem zachowania tych białek *in vivo*.

Brak kontroli poprzez aktyną w mięśniach mięczaków czy ramienionogów może sugerować obniżenie syntezy troponiny. Poddanie elektroforezie bardzo dużej ilości preparatu cienkich filamentów małża przegrzebka (*Aequipecten irradians*) uwidacznia obecność niewielkiej ilości białek, które mogą odpowiadać składnikom troponiny. I tak np. stosunek molowy białka o masie cząsteczkowej 25 000 (prawdopodobnie TN—I) do tropomiozyny wynosi 0,2:1, podczas gdy w mięśniach posiadających system kontroli związany z aktyną ten stosunek wynosi 1:1 (cyt. wg 34). Możliwe również, że w mięśniach mięczaków wytwarzany jest nieaktywny mutant troponiny, który stracił już zdolność interakcji z aktyną i tropomiozyną. Z frakcji rozpuszczalnej mięśni przegrzebka wyizolowano niedawno białko o masie cząsteczkowej 22 000, które pod względem zdolności wiązania wapnia przypomina składnik TN—C troponiny, ale podobnie jak parwalbuminy — białka wiążące wapń i występujące głównie u niższych kręgowców (40) nie posiada funkcji w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni (cyt. wg 34). Pomimo braku funkcjonalnych homologii między TN—C, parwalbuminami oraz lekkimi łańcuchami miozyny LC_{A1} i LC_{A2} (28), białka te wykazują duże podobieństwa w sekwencji aminokwasów oraz strukturze trzeciorzędowej, co sugeruje, że mogą one pochodzić od wspólnego prekursora (41—43). Sądzi się, że TN—C i lekkie łańcuchy LC_{A1} i LC_{A2} powstały z mniejszej cząsteczki na drodze duplikacji genów (41).

Brak kontroli poprzez miozynę w mięśniach kręgowców czy niektórych przedstawicieli stawonogów nie jest wynikiem braku „regulacyjnych” łańcuchów lekkich. Badania Kendrick-Jonesa wskazują, że LC_{DTNB} mięśni szkieletowych królika może zastępować w pełni LC_{EDTA} mięśni mięczaków (44). Zaskakujące jest jednak, że miozyna kręgowców, jak też hybrydy miozyny kręgowców pozbawionej LC_{DTNB} z LC_{EDTA} mięczaków nie są wrażliwe na działanie jonów wapnia po połączeniu z czystą aktyną (30,44). Wydaje się więc, że brak systemu regulacji związanego z miozyną w mięśniach kręgowców może być efektem albo zmian w ciężkim łańcuchu miozyny, które uniemożliwiają jego prawidłową interakcję z lekkimi łańcuchami, albo inaktywacją tego systemu regulującego podczas preparatyki aktomiozyny czy miofibrili. Tak np. wytrącanie miozyny z mięśni niektórych owadów — jak np. *Lethocerus cordofanus* (pluskwiak wodny) lub szarańczy i ponowne jej rozpuszczenie powoduje zanik jej odpowiedzi na działanie jonów wapnia po połączeniu z aktyną (35).

Obserwacje wpływu jonów wapnia na fluorescencję LC_{DTNB} (45), na lepkość i sedymentację syntetycznych i naturalnych miozynowych filamentów (45) oraz na ułożenie przestrzenne główek miozyny rozciągniętych mięśni (gdzie nie dochodzi do interakcji grubych i cienkich filamentów) (47) nie dają wprawdzie dowodów na istnienie kontroli poprzez miozynę w

mięśniach szkieletowych kręgowców, ale wskazują na zmiany zachodzące w miozynie tych mięśni pod wpływem wapnia. Ostatnie badania wskazują, że modyfikacja lub usuwanie LC_{DTNB} z miozyny zmienia wrażliwość na działanie jonów wapnia jej kompleksu z cienkimi filamentami (48,49).

Zmiany w ułożeniu przestrzennym główek miozyny pod wpływem wapnia zanim zaczną się łączyć z aktyną, obserwowane *in vivo* w mięśniach owadów przy użyciu techniki dyfrakcji promieni X, mogą być łatwo wytłumaczone istnieniem systemu regulacji związanego z miozyną (50). Trudno natomiast wytłumaczyć zależne od wapnia zmiany w położeniu tropomiozyny w mięśniu zwieracza małża omułka (*Mytilus edulis*), o którym wiadomo, że nie zawiera troponiny a regulacja związana jest tam wyłącznie z miozyną (51). Nie wyjaśniono także dotąd dlaczego w przypadku mięśni niektórych zwierząt obecność tropomiozyny jest konieczna dla pełnej interakcji aktyny z miozyną (52,53).

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy aktywnością miofibrylarnej ATP-azy, strukturą mięśni i rodzajem regulacji. Obydwa systemy regulacji występują zarówno w mięśniach poprzecznie prążkowanych jak i gładkich, posiadających różny poziom aktywności enzymatycznej (34). Np. mięśnie poprzecznie prążkowane i gładkie małży posiadają ten sam związek z miozyną system regulacji.

Przewaga podwójnego systemu regulacji skurczu mięśni nad systemem pojedynczym polega na większej precyzji i dokładności jego działania. Dotychczasowe badania sugerują, że genom wszystkich zwierząt posiada informację dla obydwu systemów regulacji. Informacja ta może być w pełni zrealizowana i wówczas wszystkie składniki białkowe potrzebne dla działania obydwu systemów regulacji są wytwarzane w wystarczających ilościach, jak to ma miejsce w mięśniach większości zwierząt z wyjątkiem mięczaków, ramienionogów, szkarłupni i wstęznic, które nie mają troponiny. Może też następować utrata jednego systemu regulacji w wyniku zmian w cząsteczce miozyny bez utraty składników regulujących.

Artykuł przyjęto 17.4.1976.

W czasie składania artykułu ukazała się nowa publikacja Kendrick-Jonesa, Szentkiralyi, Szent-Györgyi, (1976), *J. Mol. Biol.*, **104**, 745—775, w której autorzy opisują metody izolacji oraz własności „regulujących” lekkich łańcuchów miozyny z różnych typów mięśni. Autorzy stwierdzają ponadto, że cząsteczka miozyny mięczaków posiada 2 mole łańcuchów „regulujących”, usunięcie jednego z nich (LC_{EDTA}) pozbawia miozynę połączoną z aktyną wrażliwości na wapń.

PISMIENICTWO

1. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 405—420.
2. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 343—359.
3. Lehman W., Kendrick-Jones, Szent-Györgyi A. G., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 319—330.
4. Próchniewicz E., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 77—89.
5. Ebashi S., Endo M., Ohtsuki I., (1969), *Quart. Rev. Biophys.*, **2**, 351—384.
6. Weber A., Murray J. M., (1973), *Physiol. Rev.*, **53**, 612—673.
7. Cohen C., (1975), *Sci. Amer.*, **233**, 36—45.
8. Hitchcock S., Huxley H. E., Szent-Györgyi A. G., (1973), *J. Mol. Biol.*, **80**, 825—836.
9. Margossian S. S., Cohen C., (1973), *J. Mol. Biol.*, **81**, 409—413.
10. Drabikowski W., Dąbrowska R., (1974), Proceedings of the IX FEBS Meeting „Proteins of contractile systems”, red. Biro E. N. A., t. **31**, str. 85—104, Akadémiai Kiado, Budapest.
11. Potter J. D., Gergely J., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2697—2703.
12. Dąbrowska R., Nowak E., Podlubnaya Z., Drabikowski W., (1975), *Biochem. Biophys. Acta*, **400**, 54—61.
13. Hitchcock S. E., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **52**, 255—263.
14. Van Eerd J. P., Kawasaki Y., (1973), *Biochemistry* **12**, 4972—4980.
15. Mani R. S., McCubbin W. D., Kay C. M., (1973), *Biochemistry* **13**, 5003—5007.
16. Ebashi S., Onishi S., Abe S., Maruyama K., (1974), *J. Biochem. (Tokyo)* **75**, 211—213.
17. Huxley H. E., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 361—376.
18. Parry D. A. D., Squire J. M., (1973), *J. Mol. Biol.*, **75**, 33—55.
19. Bremel R. D., Murray J. M., Weber A., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 267—275.
20. Malencik D. A., Heizman C. W., Fischer E. H., (1975), *Biochemistry*, **14**, 715—721.
21. Regenstein J. M., Szent-Györgyi A. G., (1975), *Biochemistry*, **14**, 917—925.
22. Dąbrowska R., Dydyńska M., Szpacenko A., Drabikowski W. (1973), *Int. J. Biochem.*, **4**, 189—194.
23. Head J. F., Perry S. V., (1974), *Biochem. J.*, **137**, 145—154.
24. Greaser M. L., Yamaguchi M., Brekke C., Potter J., Gergely J., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 235—244.
25. Potter J., Gergely J., (1975), *Biochemistry*, **250**, 4628—4633.
26. Kendrick-Jones J., Lehman W., Szent-Györgyi A. G., (1970), *J. Mol. Biol.*, **54**, 313—326.
27. Szent-Györgyi A. G., Szentkiralyi E. M., Kendrick-Jones J., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 179—203.
28. Kendrick-Jones J., Szentkiralyi E. M., Szent-Györgyi A. G., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 47—53.
29. Weeds A. G., Lowey S., (1972), *J. Mol. Biol.*, **61**, 701—726.
30. Hitchcock S. E., Kendrick-Jones J., (1975), Calcium Transport in Contraction and Secretion, red. Carafoli E., Clementi W., Drabikowski W., Margreth A., str. 447—458, North-Holland and American Elsevier Publ. Co., Amsterdam i New York.
31. Lowey S., Risby D., (1971), *Nature*, **234**, 81—85.

32. Sarkar S., Sreter F. A., Gergely J., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 946—950.
33. Legèr J. J., Focant B., (1973), *Biochem. Biophys. Acta*, **328**, 166—172.
34. Lehman W., Szent-Györgyi A. G., (1975), *J. Gen. Physiol.*, **66**, 1—30.
35. Lehman W., Bullard B., Hammond K., (1974), *J. Gen. Physiol.*, **63**, 553—563.
36. Marston S., Tregear R. T., (1974), *Biochem. Biophys. Acta*, **347**, 311—318.
37. Bremel R. D., (1974), *Nature*, **252**, 405—407.
38. Nachmias V., Asch A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 656—665.
39. Kato T., Tonomura Y., (1975), *J. Biochem. (Tokyo)* **78**, 583—588.
40. Baryko B., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 361—376.
41. Weeds A. G., McLachlan A. D., (1974), *Nature*, **252**, 646—649.
42. Collins J. H., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 301—308.
43. Tufty R. M., Kretsinger R. H., (1975), *Science*, **187**, 167—169.
44. Kendrick-Jones J., (1974), *Nature*, **249**, 631—634.
45. Werber M. M., Gaffin S. L., Oplatka A., (1973), *J. Mechanochem. Cell Motility*, **1**, 823—830.
46. Morimoto K., Harrington W. F., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 693—709.
47. Haselgrove J. C., (1975), *J. Mol. Biol.*, **92**, 113—143.
48. Danker P., (1975), *Z. Naturforsch.* **30**, 586—592.
49. Margossian S. S., Lowey S., Barshop B., (1975), *Nature*, **258**, 163—166.
50. Miller A., Tregear R. T., (1970), *Nature*, **226**, 1060—1061.
51. Lowy J., Vibert P. J., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 353—359.
52. Lehman W., Szent-Györgyi A. G., (1972), *J. Gen. Physiol.*, **59**, 375—387.
53. Bullard B., Dąbrowska R., Winkelman L., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 277—286.

KOMUNIKAT

Sekcja Mikroskopii Elektronowej Polskiego Towarzystwa Patologów i Instytut Reumatologiczny w Warszawie organizują **w dniu 16 maja 1977 r. (poniedziałek)**

Symposium na temat:

„KOLAGEN — JEGO STRUKTURA I FUNKCJA”.

Symposium odbędzie się w Instytucie Reumatologicznym. Referaty i udział w Symposium oraz rezerwację hotelu należy zgłaszać do dnia 28 lutego 1977 r. na adres:

Komitet Organizacyjny Symposium:
Kolagen — jego struktura i funkcja
ul. Spartańska 1
Instytut Reumatologiczny
02-637 Warszawa
(telefon: 44-42-41 wewn. 170, 173)

Referaty zostaną zamieszczone w kwartalniku „Reumatologia”.

MARIA PILARSKA *

Biosynteza eterowych odpowiedników lecytyn i fosfatydyloetanolamin

Biosynthesis of Ether Bonds Containing Analogues of Phosphatidylcholines and Phosphatidylethanolamines

Oprócz fosfolipidów dwuacylowych w przyrodzie występują również ich eterowe odpowiedniki — fosfolipidy O-alkilowe i O-alkenyłowe. Strukturę tych fosfolipidów ustalono ostatecznie pod koniec lat pięćdziesiątych (1). O-alkenyłowe pochodne nazwano plazmalogenami, gdyż uwalniane z nich w określonych warunkach aldehydy są odpowiedzialne za histochemiczną reakcję aldehydową obserwowaną w plazmie komórkowej (reakcja plazmalowa). Plazmalogeny cholinowe i etanolaminowe (1-alk-1'-enylo-2-acylo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny i 1-alk-1'-enylo-2-acylo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminy) zawierają grupę alkenyłową (najczęściej C₁₄, C₁₆, C₁₈) w pozycji pierwszej reszty glicerolowej. W O-alkilowych fosfatydylocholinach i fosfatydyloetanolaminach (1-alkilo-2-acylo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny i 1-alkilo-2-acylo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminy) w pierwszej pozycji reszty glicerolowej znajduje się grupa alkilowa.

Eterowe fosfolipidy zostały stosunkowo późno zbadane, ponieważ nie można ich było oddzielić od dwuacylowych pochodnych przy pomocy standardowych metod rozdzielania chromatograficznego fosfolipidów. O-alkilowe fosfatydyloetanolaminy wyizolowane dopiero w 1958 roku z żółtka jaja (2), a plazmalogeny cholinowe otrzymano po raz pierwszy w 1962 roku z serca wołu (3). W analizie eterowych fosfolipidów bardzo pomocna okazała się opracowana przez Dawsona i wsp. (4) metoda stopniowej hydrolizy, która pozwala na rozdzielenie produktów powstałych po zhydrolizowaniu wszystkich trzech typów (alkiloacylowych, alkenyloacylowych i dwuacylowych) fosfolipidów.

Stwierdzono, że fosfolipidy eterowe obecne są w tkankach zwierząt prawie wszystkich gatunków; najczęściej występują one jedynie w śladowych ilościach. Znaczniejsze ilości tych fosfolipidów wykryto w tkankach zwierząt wyższych i to głównie w mięśniu sercowym i szkieletowym, tkan-

* Dr. Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: CDP-cholina — cytydino-5'-dwufosfocholina; CDP-etanolamina — cytydino-5'-dwufosfoetanolamina; EGTA — etylenoglikolo-bis(2-aminoetylo)N,N'czteroctan.

ce nerwowej (5), szpiku kostnym i erytrocytach (6, 7, 8). Stosunkowo dużą zawartością eterowych fosfolipidów charakteryzują się również tkanki nowotworowe (1) i tkanki zwierząt morskich, głównie krabów oraz tkanki ślimaków (1).

Interesujący jest fakt, że eterowe fosfolipidy występują w tych błonach, których główna rola fizjologiczna związana jest z transportem jonów i depolaryzacją błon, jak np. błony komórek nerwowych czy błony sarkoplazmatycznego retikulum (5, 9).

O-alkilowe fosfatydylocholinoizolowane z tkanek zwierząt wyższych zawierają nienasycone kwasy tłuszczowe na węglu C—2 glicerolu, jedynie w tkance ślimaków występują eterowe fosfolipidy cholinowe, których na C—2 glicerolu znajduje się nasycony kwas tłuszczowy (1).

W tkankach ssaków większość O-alkilowych i O-alkenyłowych fosfolipidów znajduje się we frakcji fosfatydyloetanoloamin, jedynie w szpiku kostnym znajduje się dużo eterowych pochodnych fosfatydylocholin (7).

Dopiero niedawno poznano dokładniej mechanizm syntezy fosfolipidów O-alkilowych i to głównie w takich tkankach jak mózg i tkanki nowotworowe, gdyż w wątrobie, gdzie najintensywniej badano syntezę fosfolipidów w tkankach zwierząt wyższych, eterowe fosfolipidy występują jedynie w śladowych ilościach (10, 11). Do tej pory nie wyjaśniono dostatecznie wszystkich etapów syntezy fosfolipidów O-alkenyłowych.

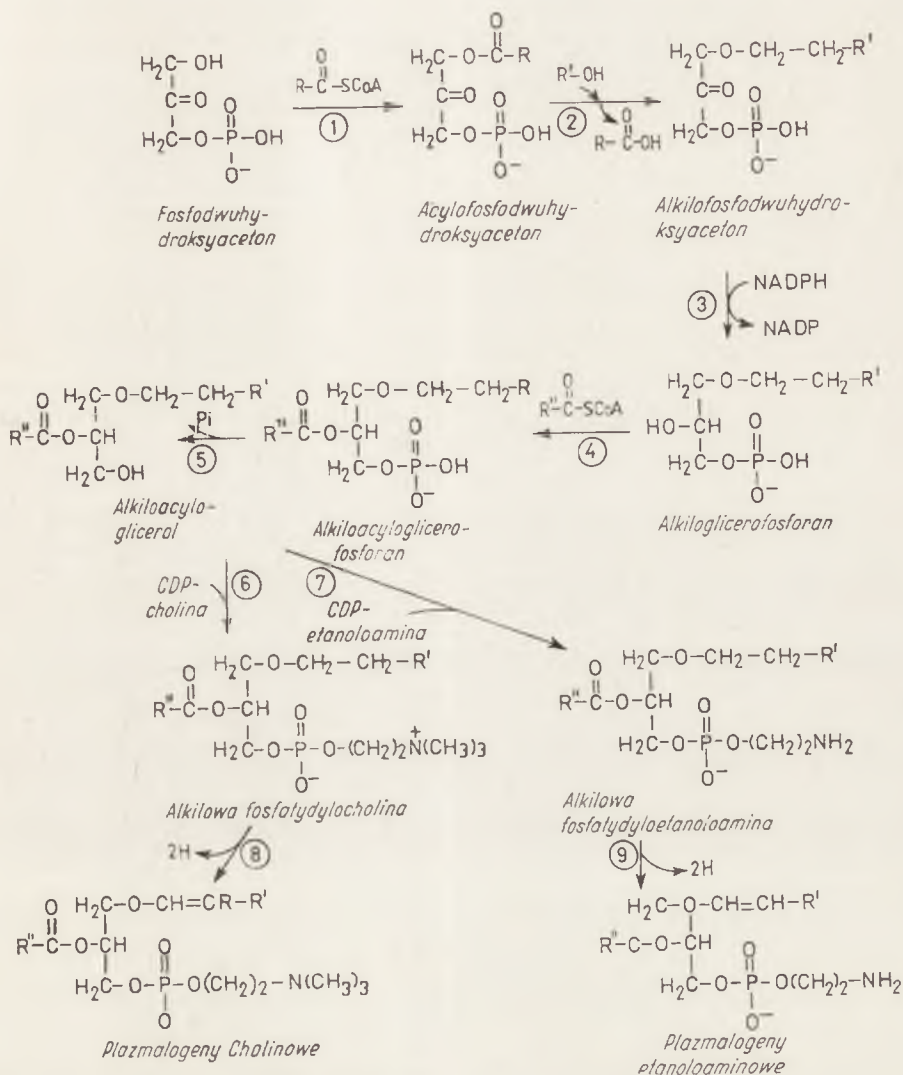
I. Synteza O-alkilowych fosfatydylocholin i fosfatydyloetanoloamin

Syntezę eterowych fosfolipidów w obecności długołańcuchowych alkoholi obserwowano po raz pierwszy w sercu psa z nadciśnieniem płucnym (12) oraz w mózgu szczura (cyt. według 13). W początkach 1969 r. Snyder i wsp. (14) stwierdzili, że homogenat komórek nowotworowych myszy lub wyizolowana z homogenatu frakcja mikrosomalna razem z postmikrosomalnym supernatantem katalizują inkorporację długołańcuchowych alkoholi do eterowych pochodnych lipidów. Następne badania (15, 16, 17) wykazały, że alkilowa pochodna kwasu fosfatydowego 1-alkilo-2-acylo-*sn*-glicero-3-fosforan jest syntetyzowany z długołańcuchowego alkoholu (heksadekanolu) i fosfodwuhydroksyacetonu w obecności mikrosomów izolowanych z tkanek nowotworowych (Ryc. 1). Synteza ta wymagała obecności ATP, CoA i jonów magnezu i zachodziła poprzez alkilofosfodwuhydroksyaceton.

Początkowo sądzono, że prekursorem O-alkilowych fosfolipidów jest aldehyd 3-fosfoglicerynowy (18). Późniejsze badania (15, 16) z użyciem specyficznych inhibitorów udowodniły, że wprowadzenie eterowego wiązania do lipidów zachodzi przy udziale formy ketonowej fosfotriozy — a więc fosfodwuhydroksyacetonu.

Reakcja fosfodwuhydroksyacetonu z długołańcuchowym alkoholem, prowadząca do powstania alkilofosfodwuhydroksyacetonu jest pierwszym

etapem syntezy fosfolipidów O-alkilowych (Ryc. 1, reakcja 1 i 2). Zachodzi ona dwustopniowo — najpierw następuje estryfikacja fosfodwuhydroksyacetonu kwasem tłuszczowym z powstaniem acylofosfodwuhydroksyacetonu (1-acylo-dwuhydroksy-3-fosforanu) (Ryc. 1, reakcja 1), a następnie.



Ryc. 1. Schemat syntezy fosfolipidów eterowych

w obecności jonów magnezu, wymiana reszty acylowej na alkohol (Ryc. 1, reakcja 2) (19). Ten cykl reakcji zaobserwowano po raz pierwszy w obecności mikrosomów mózgu szczura i mitochondrii wątroby świnki morskiej (20, 21). Wymiana taka zachodzi również w mikrosomach raka wąsiego Ehrlicha (22).

Tlen w wiązaniu eterowym fosfolipidów pochodzi z alkoholu długołańcuchowego, co wykazały badania z użyciem substratów znakowanych tlenem ^{18}O (23). W badaniach zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, jako alkohol tłuszczowy stosowany jest zwykle heksadekanol.

Alkilofosfodwuhydroksyaceton, który zidentyfikowano (17, 24) jako związek pośredni w syntezie eterowych lipidów, ulega następnie redukcji do alkiloglicerofosforanu (1-alkilo-*sn*-glicero-3-fosforanu) przy udziale NADPH (Ryc. 1, reakcja 3) (17).

Po wprowadzeniu grupy acylowej w drugą pozycję reszty glicerolowej powstaje alkiloacyloglicerofosforan (1-alkilo-2-acylo-*sn*-glicero-3-fosforan (Ryc. 1, reakcja 4), będący alkilową pochodną kwasu fosfatydowego. Dwie ostatnie reakcje obserwowano w mitochondriach wątroby świnki morskiej i mikrocomach mózgu szczura (20) oraz w tkankach nowotworowych (17).

Przy udziale odpowiedniej fosfatazy powstają alkilowe pochodne dwuglicerydów (1-alkilo-2-acylo-*sn*-glicerole) (Ryc. 1, reakcja 5) (17), które analogicznie jak dwuacylowe dwuglicerydy reagują z CDP-choliną lub CDP-etanoloaminą z utworzeniem O-alkilowych fosfolipidów (1-alkilo-2-acylo-*sn*-glicero-3-fosfocholin i 1-alkilo-2-acylo-*sn*-glicero-3-fosfoetanoloamin) (Ryc. 1, reakcja 6 i 7) (25). Tę ostatnią reakcję obserwowano w tkankach nowotworowych (25) i w mikrosomach wątroby i mózgu szczura (13, 26).

Etanoloaminofosfotransferazę (CDP-etanoloamina: 1,2-dwugliceryd etanoloaminofosfotransferazę (E.C. 2.7.8.1)) katalizującą syntezę eterowych fosfolipidów z CDP-etanoloaminy (CMP- ^{32}P -etanoloaminy) i naturalnych alkiloacylogliceroli oraz dwuacylowych gliceroli scharakteryzowano w mikrosomach mózgu szczura (13). W zależności od typu dodanych dwuglicerydów następowała synteza dwuacylowych lub eterowych fosfolipidów. Egzogenne alkiloacylowe dwuglicerydy hamowały inkorporację endogennych dwuacylowych dwuglicerydów do frakcji fosfatydyloetanoloamin, co wskazuje że fosfotransferaza nie jest specyficzna w stosunku do rodzaju dwuglicerydów. Istnieją także sugestie, że te same fosfotransferazy są odpowiedzialne za syntezę O-alkenylowych fosfolipidów etanoloaminowych i cholinowych (27).

Sądzi się powszechnie, że w tkankach zwierząt wyższych jednym wspólnym etapem syntezy zarówno dwuacylowych fosfolipidów, jak i ich eterowych pochodnych jest acylacja fosfodwuhydroksyacetonu. Jednakże synteza dwuacylowych fosfolipidów poprzez acylofosfodwuhydroksyaceton ma małe znaczenie (28). Wykazano (21), że jeżeli acylofosfodwuhydroksyaceton ulegnie redukcji do acyloglicerofosforanu, to nie może on już służyć jako prekursor eterów alkilowych. Dlatego też w literaturze mówi się o braku bezpośredniego połączenia metabolicznego między fosfolipidami dwuacylowymi i eterowymi.

Fosfolipidy eterowe mogą być prawdopodobnie syntetyzowane innymi drogami niż poprzez fosfodwuhydroksyaceton. Uzyskano dane (29) wskazujące na to, że inkorporacja 2- ^3H -glicerolu do alkilowych fosfolipidów

w mikrosomach mięśni szkieletowych zachodzi bez odszczepienia trytu z drugiej pozycji reszty glicerolowej. Glicerol nie jest więc przemieniany w fosfodwuhydroksyacetan.

II. Synteza plazmalogenów

Pierwszych dowodów na to, że O-alkilowe fosfolipidy są prekursorami plazmalogenowych pochodnych dostarczyły badania nad inkorporacją *in vivo* 1-O-1-¹⁴C-heksadecylo-2-³H-glicerolu do fosfolipidów w tkankach ślimaka ziemnego *Arion ater* (30) i psa morskiego (31). Oba izotopy obecne były zarówno w alkilowych jak i alkenylowych pochodnych, a stosunek ³H do ¹⁴C był taki sam w plazmalogenach jak i w podanym prekursorze. Świadczyło to o bezpośrednim przekształceniu związków O-alkilowych w O-alkenyłowe bez rozpadu wiązania eterowego (Ryc. 1, reakcja 8 i 9).

Wyniki analizy strukturalnej reszt acylowych, alkilowych i alkenylowych w fosfolipidach i lipidach obojętnych raka wysiękowego Ehrlicha wskazywały na bliskie metaboliczne pokrewieństwo między dwoma grupami fosfolipidów eterowych (32), co potwierdziły badania (33) nad inkorporacją *in vivo* znakowanego heksadekanolu. Początkowo radioaktywność lokowała się w O-alkilowych fosfolipidach etanoloaminowych i cholinowych. W miarę upływu czasu jednak poziom radioaktywności w tych fosfolipidach malał, a wzrastała radioaktywność w plazmalogenach. Wyniki te wyraźnie wskazywały na bezpośrednie przejście grup alkilowych w alkenyłowe.

Syntezę plazmalogenów etanoloaminowych z heksadekanolu i fosfodwuhydroksyacetanu obserwowano w obecności mikrosomów i frakcji rozpuszczalnej komórek tkanek nowotworowych (22). Mieszanina inkubacyjna była identyczna z tą, w jakiej zachodziła synteza O-alkilowych fosfolipidów, z tym że zawierała dodatkowo NADP lub NAD, konieczne do odwodorowania łańcucha alkilowego. Stosując różnie znakowane substraty wykazano, że rozkład radioaktywności w alkilowych i alkenylowych fosfolipidach jest identyczny, co wskazuje na bezpośrednie utlenienie fosfolipidów alkilowych do plazmalogenów (22).

Istnieją kontrowersje co do tego na jakim etapie zachodzi odwodorowanie, czy na poziomie 1-alkilo-2-acylo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminy (16, 26, 34—37), czy też 1-alkilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminy (38, 39). Aby wyjaśnić różnice w wynikach uzyskiwanych w różnych pracowniach wysunięto sugestię, że egzogenne lizopochodne ulegają najpierw acylacji, a dopiero potem odwodorowaniu (34—36). Odwodorowanie zachodzi prawdopodobnie przy udziale mikrosomalnego transportu elektronów zawierającego cytochrom b₅ (36). Przemawiają za tym wyniki badań immunologicznych, w których obserwowano hamowanie odwodorowania O-alkilowych fosfolipidów w obecności mikrosomów śledziony przez przeciwciała przeciwko cytochromowi b₅ (40).

Proces bezpośredniego odwodorowania O-alkilowych fosfolipidów do O-alkenylowych pochodnych zbadano również *in vitro* (25, 35, 36, 41, 42). Reakcja utlenienia O-alkilowych fosfatydyloetanolamin, która katalizowana jest przez mikrosomy mózgu szczura, wymaga obecności tlenu i NADPH lub NADH a hamowana jest przez cyjanki. Obecność ATP nie ma wpływu na proces odwodorowania. Podobne właściwości ma również dehydrogenaza utleniająca O-alkilowe fosfatydyloetanolaminy znajdująca się we frakcji mikrosomalnej komórek tkanki nowotworowej (35). Dehydrogenaza ta ma własności zbliżone do własności dehydrogenaz utleniających kwasy tłuszczowe (35, 36). Ponadto wykazano, że w obecności mikrosomów mózgu szczura zachodzi reakcja odwodorowania O-alkilowych fosfatydyloetanolamin do plazmalogenów, która wymaga obecności ATP oraz jest hamowana przez NADPH i NADP (41). Wyniki te wskazują na to, że w tkance nerwowej występuje także specyficzna dehydrogenaza, charakterystyczna dla tej tkanki. Syntezę plazmalogenów z O-alkilowych fosfolipidów obserwowano również w obecności komórek glejowych i neuronów mózgu szczura (42). Dodatkowo otrzymano dane wskazujące na to, że istnieją prawdopodobnie dehydrogenazy działające na poziomie O-alkilowego dwuglicerydu (Radomińska-Pyrek, prywatna informacja).

Lokalizację enzymów związanych z syntezą plazmalogenów zbadano w komórkach tkanek nowotworowych (22, 43). Stwierdzono, że homogenat komórek jest równie aktywny jak frakcja mikrosomalna razem z postmikrosomalnym supernatantem (43). Synteza plazmalogenów nie zachodzi w obecności samych mikrosomów (22), konieczny jest dodatek postmikrosomalnego supernatantu. Jednakże ostatnio (36) obserwowano syntezę plazmalogenów *in vitro* z 1-O-1-¹⁴C-heksadecylo-sn-glicero-3-fosfoetanolaminy w obecności jedynie frakcji mikrosomalnej mózgu szczura.

Odwodorowanie O-alkilowych fosfolipidów nie jest prawdopodobnie jedyną drogą syntezy plazmalogenów. Wskazują na to wyniki badań nad inkorporacją podwójnie znakowanego glicerolu (2-³H i ¹⁴C-glicerolu) do dwuacylowych i alkenyloacylowych fosfolipidów w *Clostridium butyricum* (44). Porównanie poziomu syntezy radioaktywnych fosfolipidów eterowych i dwuacylowych w mikrosomach mięśni szkieletowych po podaniu radioaktywnych prekursorów wskazywało na to, że brak jest metabolicznego pokrewieństwa między fosfolipidami O-alkilowymi i O-alkenylowymi (29). Jednakże na podstawie analizy składu kwasów tłuszczowych i ich pochodnych znajdujących się w fosfolipidach mikrosomów mięśni wykluczono istnienie wspólnego prekursora dla acylowych i eterowych fosfolipidów etanolaminowych (37). Uzyskane wyniki świadczą także o bezpośrednim powiązaniu metabolicznym między O-alkilowymi i O-alkenylowymi fosfatydyloetanolaminami.

Acylację O-alkenylowych fosfolipidów zaobserwowano po raz pierwszy (45, 46) w błonie erytrocytów i w błonach sarkoplazmatycznego retikulum mięśni szkieletowych królika. Już wtedy wysunięto sugestię, że reak-

cja ta pełni ważną rolę w wymianie kwasów tłuszczowych w cząsteczkach plazmalogenów.

Potwierdziły to badania nad specyficznością acylotransferaz (46, 47, 48). Acylotransferazy acylujące O-alkenylowe pochodne lizofosfatydylocholiny w mikrosomach mięśni są specyficzne w stosunku do kwasu arachidonowego i linolowego (46, 47). Również i w tkance jąder kwas arachidonowy jest wbudowywany do drugiej pozycji reszty glicerolowej O-alkenylowych fosfatydyloetanoloamin i alkilowych lecytyn w cyklu reakcji acylacji i deacylacji (48). Aktywność acylotransferaz w stosunku do eterowych lizofosfolipidów obserwowano jedynie w erytrocytach, mięśniach szkieletowych i w tkance jąder, nie stwierdzono jej natomiast w innych tkankach i narządach zwierząt wyższych (46).

Mimo intensywnej pracy prowadzonej nad syntezą fosfolipidów eterowych nie wyjaśniono wielu problemów związanych z tym zagadnieniem. Szczególnie dużo pracy wymaga zbadanie szlaków reakcji prowadzących do powstania plazmalogenów.

Artykuł nadszedł 2.1.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 15.6.1976.

PIŚMIENNICTWO

1. Strickland K. P., (1973), w *Form and Function of Phospholipids*, red. Ansell G. B., Hawthorne I. N., Dawson R. M. C., str. 9—42. Elsevier Co, Amsterdam, London, New York.
2. Carter H. E., Smith D. B., Jones D. N., (1958), *J. Biol. Chem.*, **232**, 681—694.
3. Gottfried E. L., Rapport M., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 329—333.
4. Dawson R. M. C., Hemington N., Dawenport J. B., (1962), *Biochem. J.*, **84**, 497—501.
5. Klenk E., Debuch H., (1963), w *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*, red. Holman R. T., Lundberg W. O., Malkin T., tom 6, str. 3—29, Oxford, Pergamon Press.
6. Bishop H. H., Strickland K. P., (1970), *Can. J. Biochem.*, **48**, 269—277.
7. Hanahan D. J., Watts R., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, PC 59—PC 60.
8. Pietruszko R., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **64**, 562—564.
9. Waku K., Uda Y., Nakazawa Y., (1971), *J. Biochem.*, **69**, 483—491.
10. Rapport M. M., Lerner B., (1959), *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 319—325.
11. Wittenberg J. B., Korney S. R., Svenson F. H., (1956), *J. Biol. Chem.*, **219**, 39—47.
12. Keenan R. W., Brown J. B., Marks B. H., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 226—229.
13. Radomińska-Pyrek A., Horrocks L. A., (1972), *J. Lipid. Res.*, **13**, 580—587.
14. Snyder F., Malone B., Wykle R. L., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 40—47.
15. Snyder F., Malone B., Blank L. M., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1790—1799.
16. Wykle R. L., Snyder F., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 658—662.
17. Wykle R. L., Snyder F., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3047—3058.

18. Snyder F., Wykle R. L., Malone B., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 315—321.
19. McMurray W. C., Magee W. L., (1972), *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 129—160.
20. Hajra A. K., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 486—492.
21. Hajra A. K., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 1037—1044.
22. Snyder F., Blank L. M., Wykle R. L., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3639—3645.
23. Friedberg S. J., Heifetz A., Greene R. C., (1972), *Biochemistry*, **11**, 297—301.
24. Snyder F., Blank M. L., Malone B., Wykle R. L., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1800—1805.
25. Snyder F., Blank M. L., Malone B., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4016—4018.
26. Radomińska-Pyrek A., Strosznajder J., Dąbrowiecki Z., Chojnacki T., (1974), 9th FEBS Meeting, Budapest, str. 361.
27. Kiyasu J. Y., Kennedy E. P., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 2590—2594.
28. Van den Bosch H., van Golde L. M. G., Slotboom A. J., van Deenen L. L. M., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 694—703.
29. Waku K., Nakazawa Y., (1973), *J. Biochem.*, **73**, 497—504.
30. Thompson G. A. Jr., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 409—411.
31. Malins D. C., (1968), *J. Lipid. Res.*, **9**, 687—692.
32. Wood R., Harlow R. D., (1969), *Arch. Biochem.*, **131**, 495—501.
33. Wood R., Healy K., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2640—2648.
34. Blank M. L., Wykle R. L., Snyder F., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 1203—1208.
35. Wykle R. L., Blank M. L., Malone B., Snyder F., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5442—5447.
36. Wykle R. L., Schremmer-Lookmiller J. M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 291—298.
37. Waku K., Ito H., Bito T., Nakazawa Y., (1974), *J. Biochem.*, **75**, 1307—1312.
38. Debuch H., Müller J., Fürniss H., (1971), *Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem.*, **352**, 984—990.
39. Fürniss H., Debuch H., (1971), *Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem.*, **353**, 1377—1384.
40. Paltauf F., Prough R. A., Masters B. S. S., Johnston J. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2661—2662.
41. Horrocks L. A., Radomińska-Pyrek A., (1972), *FEBS Letters*, **22**, 190—192.
42. Roberti R., Binaglia L., Francescangeli E., Goracci G., Porcellati G., (1975), *Lipids*, **10**, 121—127.
43. Wykle R. L., Blank M. L., Snyder F., (1970), *FEBS Letters*, **12**, 57—60.
44. Hill E. E., Lands W. E. M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 209—211.
45. Waku K., (1966), *Fed. Proc.*, **25**, 405.
46. Waku K., Lands W. E. M., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 2654—2659.
47. Waku K., Nakazawa Y., (1972), *J. Biochem.*, **72**, 495—497.
48. Wykle R. L., Blank M. L., Snyder F., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **326**, 26—33.

KRYSTYNA KONOPKA *

Wewnątrzkomórkowy transport żelaza

Intracellular Transport of Iron

Około 90% żelaza znajdującego się w warunkach prawidłowych w osoczu pochodzi z rozpadu hemoglobiny, który odbywa się w układzie siateczkowo-śródbłonkowym, głównie wątroby i śledziony. Ilość żelaza pochodząca z wchłaniania jelitowego jest niewielka a wymiana żelaza między hemoglobiną i białkami magazynującymi żelazo — ferrytyną i hemosyderyną bardzo powolna.

Prawie całe żelazo zawarte w osoczu jest zużywane w procesie syntezy hemoproteidów. Synteza Hb wymaga dziennie 30—40mg żelaza, co stanowi ilość 6—10 razy większą od całkowitej zawartości żelaza w osoczu. Podczas ciąży duże ilości żelaza pobiera z osocza łożysko.

Osoczymym przekaźnikiem żelaza, który odgrywa rolę w regulacji metabolizmu żelaza, jest transferryna (Tf) (1,2,3,4,5,6,7). Mechanizm uwalniania żelaza z transferryny do tkanek nie został do tej pory całkowicie wyjaśniony. Komórki, które mają zdolność wbudowywania żelaza (wątroba, jelito cienkie, tkanki erytropoetyczne) posiadają na powierzchni błony komórkowej swoiste receptory wiążące transferrynę (8,9,10,11,12). Ilość receptorów warunkuje intensywność włączania żelaza i zależy od potrzeb danej tkanki. Komórki erytroidalne w procesie dojrzewania tracą receptory i dojrzałe krwinki czerwone nie mają zdolności pobierania żelaza. Nieliczne prace postulują udział innych białek osocza w transporcie żelaza. We frakcji γ -globulin ludzkiej surowicy opisano białka wiążące żelazo, odmienne pod względem immunologicznym od transferryny (13). Sugerowano, że ferrytyna obecna w osoczu szczurów odgrywa rolę w przenoszeniu żelaza z komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego do parenchymalnych komórek wątroby (14).

Pomimo dużej ilości danych o funkcji transferryny i syntezie hemu, niewiele wiadomo o mechanizmach transportu żelaza w obrębie komórki. Część badaczy postuluje udział specyficznych białkowych przekaźników

* Dr, Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90—131 Łódź.

Wykaz stosowanych skrótów: Tf — transferryna, Tf—Fe—A — kompleks transferryna—Fe—anion; Hb — hemoglobina

cytoplazmatycznych (15,16,17,18). Przyłączenie żelaza do pierścienia porfirynowego zachodzi prawdopodobnie w mitochondriach, co pociąga za sobą transport żelaza do wnętrza mitochondrionu. Większość nowopowstałego hemu przechodzi do cytoplazmy, gdzie łączy się z odpowiednim apoproteidem np. z globiną. Podczas syntezy hemoproteidów mitochondrialnych przyłączenie hemu do białka odbywa się przypuszczalnie w mitochondriach (19,20,21). Biosynteza hemoproteidów wymaga skoordynowanej kontroli transportu żelaza, produkcji hemu i białka oraz łączenia się hemu z apoproteidem. Regulacja tych procesów wiąże się z wzajemną korelacją genomu jądrowego i mitochondrialnego.

Badania włączania żelaza do komórek prowadzono najczęściej przy użyciu komórek erytroidalnych i retikulocytów. Badano również komórki wątroby (22,23,24,25,26,27,28), jelita cienkiego (18) i erythrocyty ptasie (29). Wydaje się, że mechanizm wbudowywania żelaza przez te komórki jest bardzo zbliżony, a najważniejszym układem, który przekazuje żelazo komórkom w sposób umożliwiający jego wykorzystanie jest kompleks transferryny z żelazem. Proces ten przebiega bez rozpadu cząsteczki białkowej. Nie można jednak wykluczyć innych mechanizmów pobierania i transportu żelaza. Badania heteroploidalnych komórek L 132 wyhodowanych z nabłonka płuc zarodka ludzkiego wykazały, że inkorporacja ^{59}Fe przebiegała w nich z równoczesnym rozpadem transferryny (30).

Niniejszy przegląd stanowi próbę omówienia wyników badań nad wewnątrzkomórkowym transportem żelaza w organizmach wyższych.

I. Transport żelaza przez błonę komórkową

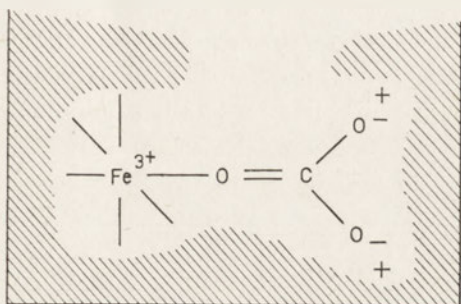
Badania nad mechanizmem pobierania żelaza przez retikulocyty ssaków doprowadziły do powstania dwóch zasadniczych hipotez:

1. Kompleks Tf—Fe przyłącza się do błony komórkowej a następnie przechodzi na drodze endocytozy do wnętrza komórki. Przy takim założeniu transferryna pełni rolę wewnątrzkomórkowego nośnika i przekazuje żelazo do miejsc syntezy hemu bezpośrednio (1,31) albo za pośrednictwem innych nośników (7).
2. Dysocjacja kompleksu Tf—Fe zachodzi w błonie komórkowej i żelazo przechodzi do wnętrza komórki. Hipoteza ta zakłada istnienie cytoplazmatycznych akceptorów pośredniczących w transporcie żelaza (32,33,34,35,36).

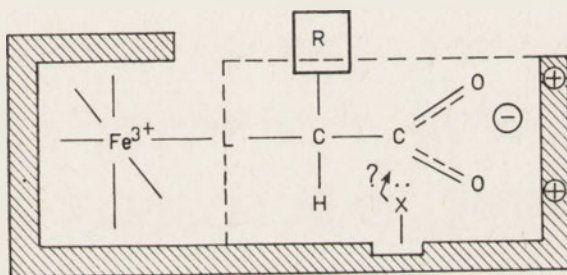
I-1. Łączenie się kompleksu Tf-Fe z błoną komórkową

Cząsteczka transferryny o masie około 80 000 wiąże dwa atomy Fe^{+3} . Przy prawidłowej ilości żelaza w osoczu (60—150 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) cząsteczki transferryny są wysyczone żelazem w około 30—35%. Rozmieszczenie żelaza w krążącym białku ma odgrywać istotną rolę w regulacji metabolizmu tego pierwiastka (37).

W ostatnich latach wykazano, że przy fizjologicznym pH powstawanie stabilnego kompleksu transferryny z żelazem uwarunkowane jest obecnością anionów w środowisku inkubacyjnym. Wiązanie każdego atomu żelaza przebiega z jednoczesnym przyłączeniem anionu, tak że stosunek żelazo/anion wynosi 1 (mol/mol). Przyłączenie anionu do transferryny odbywa się tylko w obecności żelaza, a uwolnienie żelaza z kompleksu przebiega z odłączeniem cząsteczki anionu. Brak anionów w środowisku inkubacyjnym powoduje nieswoiste łączenie się transferryny z żelazem (38). Przez



Ryc. 1. Model kompleksu TF—Fe—CO₃⁻² (48).



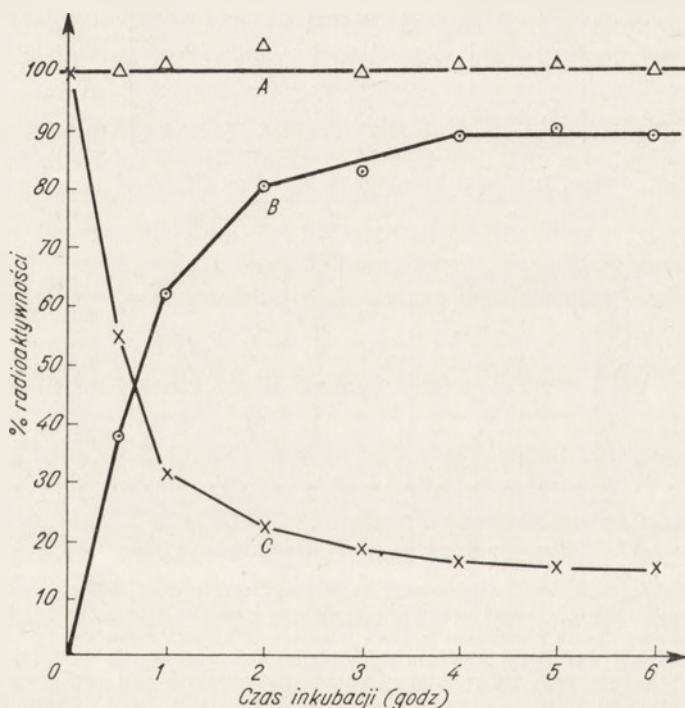
Ryc. 2. Model kompleksu Tf—Fe—A (49).

Powierzchnia zakreskowana oznacza obszar cząsteczki transferryny wiążącej żelazo. Proksymalna grupa funkcyjna (L) anionu organicznego tworzy wiązanie koordynacyjne z Fe³⁺. Grupa karboksylowa oddziałuje z białkiem poprzez wiązanie elektrostatyczne. Na rycinie zaznaczono dodatkowo możliwość tworzenia wiązania wodorowego (X). Podstawnik R, który posiada zbyt duże wymiary, aby ułożyć się w miejscu wiążącym wystaje ponad powierzchnię cząsteczki białka. W nieobecności anionu następuje oddziaływanie pomiędzy Fe³⁺ i dodatnimi ładunkami cząsteczki białka, co uniemożliwia wytwarzanie stabilnych kompleksów transferryny z żelazem.

długi okres czasu przypuszczano, że *in vivo* w wiązaniu transferryny z żelazem bierze udział HCO₃⁻ (5,39,40—45). *In vitro* proces ten zachodził także w obecności np. szczawianu, malonianu, EDTA i nitrylotrójoctanu (46,47). Ostatnio Bates i Schlabach (48) wysunęli sugestię, że w tworzeniu kompleksu bierze udział CO₃⁻² i na podstawie przeprowadzonych badań potencjometrycznych zaproponowali model stabilnego kompleksu Tf—Fe—CO₃⁻² (ryc. 1).

Autorzy ci wykazali (49), że trwałe kompleksy z żelazem i transferryną mogą tworzyć związki, które posiadają grupę karboksylową oraz w jej sąsiedztwie, w odległości nie większej niż 6,3—7Å tzw. proksymalną grupę funkcyjną, tworzącą wiązanie koordynacyjne z Fe^{+3} (Ryc. 2).

Konfiguracja cząsteczki takiego związku musi być podobna do jonu CO_3^{-2} , a jej wymiary muszą umożliwić ulokowanie jej w miejscu wiążącym o głębokości 3Å, szerokości 6Å i długości 4—6Å. Najbardziej stabilne były kompleksy: Tf-Fe-CO_3^{-2} i $\text{Tf-Fe-kwas dwukarboksylowy}$. Jon węglanowy nazwano „kluczem”, który umożliwia ulokowanie żelaza w cząsteczce transferryny. Przyjmuje się, że w kompleksie Tf-Fe-CO_3^{-2} żelazo jest „zabezpieczone” przed wpływem czynników chelatujących obecnych w osoczu i dopiero połączenie kompleksu z receptorami powierzchniowymi osłabia interakcję Fe i CO_3^{-2} i pozwala na uwolnienie żelaza.

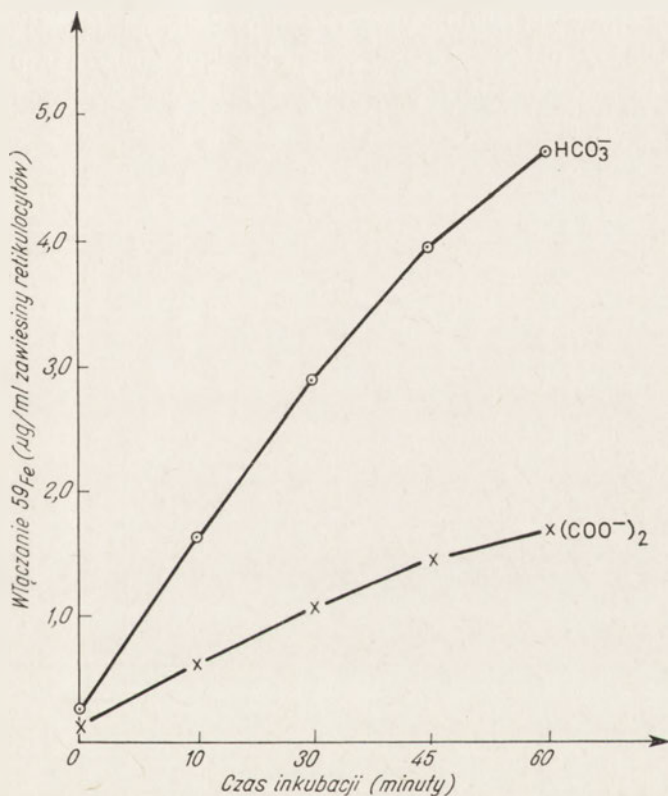


Ryc. 3. Włączanie ^{59}Fe i uwalnianie $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ z kompleksu Tf-Fe-HCO_3^- (44). 25% zawiesinę retikulocytów królika inkubowano w 37° w środowisku zawierającym 0,51 mg/ml $\text{Tf-(}^{59}\text{Fe)-HCO}_3^-$ albo $\text{Tf-Fe-(H}^{14}\text{CO}_3^-)$. A: $\Delta-\Delta$, stabilność $\text{Tf-(H}^{14}\text{CO}_3^-)$ w 0°C, B: $\circ-\circ$, włączanie ^{59}Fe , C: $x-x$, uwalnianie $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$.

Niewiele wiadomo o wiązaniu kompleksu Tf-Fe-A z receptorami błony komórkowej. Proces ten ulega zahamowaniu pod wpływem związków blokujących grupy $-\text{SH}$ (50, 51). We frakcji błon uzyskanej z retikulocytów inkubowanych z (^{59}Fe , ^{125}J) transferryną wykazano obecność 3 składników zawierających żelazo. W jednym z nich o masie cząsteczkowej około

230 000, stwierdzono prawie całą aktywność ^{125}J i zidentyfikowano go jako kompleks Tf—Fe—receptor . Masa cząsteczkowa receptora wynosi około 150 000, a stosunek Tf—Fe/receptor 1 (mol/mol) (36, 52).

Cząsteczki apotransferyny, tzn. transferyny nie zawierającej żelaza, nie wiążą się z receptorami. Sugerowano, że przyłączenie żelaza powoduje zmiany konformacyjne, które umożliwiają połączenie białka z powierzchnią błony. Przy użyciu rozdzału na DEAE celulozie wykazano, że przyłączenie Cu^{+2} , Mn^{+2} i Zn^{+2} do apotransferyny nie wpływa na konformację cząsteczki białkowej, ponieważ wytworzone kompleksy wymywały się z kolumny w ten sam sposób co apotransferyna (53).



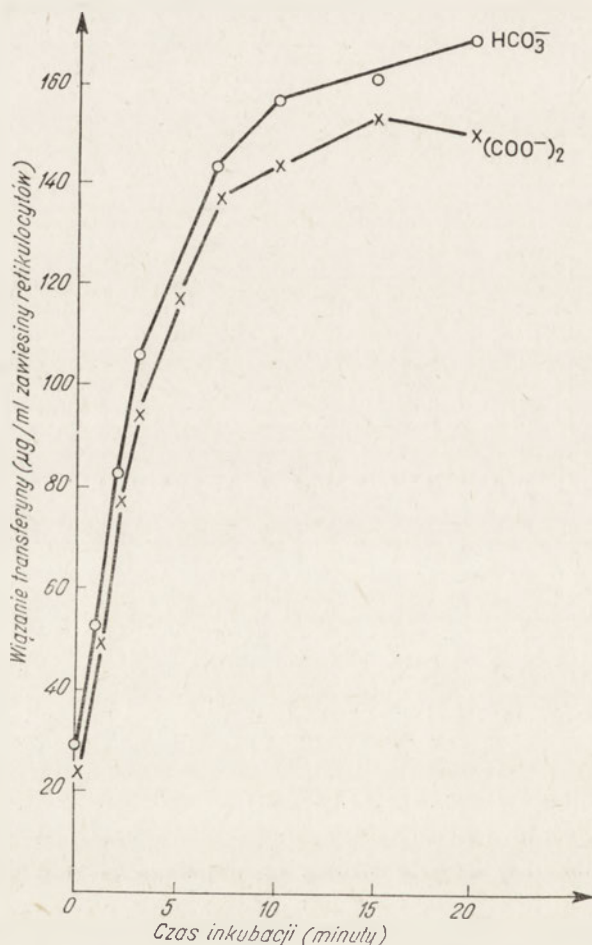
Ryc. 4. Włączanie ^{59}Fe przez retikulocyty królika: \odot — \odot z kompleksu $\text{Tf—}^{59}\text{Fe—HCO}_3^-$, \times — \times z kompleksu $\text{Tf—}^{59}\text{Fe—}(\text{COO}^-)_2$ (42).

Jeżeli uwalnianie żelaza z kompleksu Tf—Fe—A zachodzi w obrębie błony komórkowej, to w procesie tym możemy wyróżnić następujące etapy: wiązanie kompleksu z receptorami, uwalnianie żelaza i jego transport do wnętrza komórki oraz odłączenie apotransferyny lub $\text{Tf}(\text{Fe})_1$. Jeżeli natomiast Tf—Fe—A , w myśl poglądów niektórych badaczy przechodzi do cytoplazmy, uwalnianie żelaza z kompleksu zachodzi prawdopodobnie w pobliżu mitochondrionu.

I-2. Uwalnianie żelaza z kompleksu Tf—Fe—A

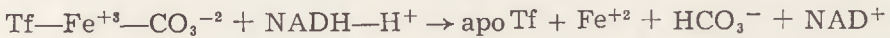
Obecny w kompleksie Tf—Fe—A anion nie bierze przypuszczalnie udziału w wiązaniu transferryny z receptorami powierzchniowymi, natomiast odgrywa rolę w uwalnianiu żelaza. Postulowano, że odłączenie anionu pociąga za sobą uwolnienie żelaza (5, 42, 43, 44) (Ryc. 3).

Jak wynika z ryciny 4, odłączenie jonów HCO_3^- następuje znacznie szybciej niż $(\text{COO}^-)_2$. Zamiana HCO_3^- na $(\text{COO}^-)_2$ powoduje obniżenie wiązania żelaza o 35%, natomiast nie wpływa na wiązanie się kompleksu z błoną (42) (Ryc. 5). Obserwowana specyficzność substratowa przemawia za enzymatycznym charakterem omawianej reakcji i sugeruje istnienie w błonie komórkowej retikulocytów enzymu odszczepiającego anion z kompleksu Tf—Fe—A (5, 51). Azotyn i błękit metylenowy hamują w sposób odwracalny pobieranie żelaza z kompleksu Tf—Fe— CO_3^{-2} . Z ryciny 6 wy-



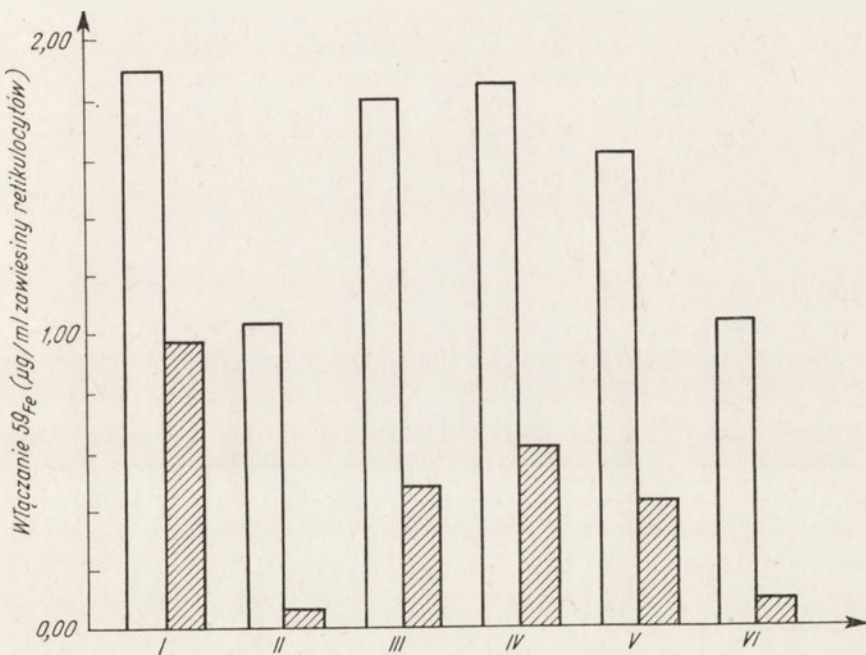
Ryc. 5. Wiązanie kompleksów: O—O $(^{125}\text{J})\text{Tf—Fe—HCO}_3^-$ i x—x $(^{125}\text{J})\text{Tf—Fe—}(\text{COO}^-)_2$ przez retikulocyty królika (42).

nika, że redukcja NAD powoduje reaktywację układu, co pozwala wnioskować o udziale NADH—H⁺ w uwalnianiu anionu i żelaza.



Zredukowane żelazo nie jest wiązane przez transferrynę i przyłącza się najprawdopodobniej do wewnątrzkomórkowego akceptora (54).

Dyskusyjna jest rola łańcucha oddechowego we włączaniu żelaza do komórek. Wielu autorów (1, 2, 7, 51, 55) uważa, że proces ten zachodzi jedynie w obecności czynnego łańcucha transportu elektronów i ulega zahamowaniu pod wpływem NaCN, NaN₃, rotenonu, oligomycyny i 2,4—dwunitrofenolu. Związki te w znacznie większym stopniu hamują pobieranie żelaza niż wiązanie kompleksu Tf—Fe—A z błoną komórkową (51) lub mitochondrialną (1, 55). Samo połączenie kompleksu z receptorami nie jest więc czynnikiem uwalnającym żelazo i anion.



Ryc. 6. Wpływ różnych substratów na pobieranie żelaza z Tf—(⁵⁹Fe)—HCO₃⁻ przez retikulocyty królika (54).

Preinkubacja: 0,15M NaCl, 1mM Na₃PO₄ (pH 7,4) 10mM NaNO₂ 0,05ml zawiesiny retikulocytów, 30 minut w 37°C. Białe kolumny oznaczają całkowite pobieranie żelaza, zakreskowane — włączenie żelaza w hem. I: próba kontrolna, II: NaNO₂, III: NaNO₂ — 10 mM mlecyan; IV: NaNO₂ — 10 mM inozyna, V: NaNO₂ — 10 mM glukoza, VI: NaNO₂ — 10 mM pirogronian.

II. Niehemowe związki pośredniczące w transporcie żelaza

II-1. Transferyna

Wyniki wielu prac nasuwają przypuszczenie, że po przyłączeniu się do receptorów powierzchniowych błony komórkowej kompleks $Tf-Fe-CO_3^{2-}$ przechodzi na drodze endocytozy do wnętrza komórki (1, 31, 56, 57). W procesie tym biorą udział strukturalne składniki błon komórkowych: mikrokanaliki i białka tubulino—podobne. Zmiana struktury mikrokanalikowej komórek erytroidalnych królika pod wpływem winblastyny powoduje zahamowanie pobierania transferyny i żelaza (58).

Stosując metodę autoradiografii, wykazano, że około 40% transferyny związanej z retikulocytami znajduje się wewnątrz krwinek (57). *Martinez-Medellin i Schulman* (31) ilość związanej transferyny ocenili na 50—60%. Autorzy ci uważają, że cytoplazma i stroma retikulocytów nie zawiera innych specyficznych niehemowych związków żelaza, pełniących funkcję transportującą.

Przebadano wpływ związków chelatujących na pobieranie żelaza przez retikulocyty (2). Stwierdzono, że 2,2'-dwupirydyna i 1,10-fenantrolina blokują całkowicie ten proces, natomiast EDTA i cytrynian nie wywierały wpływu nawet w stężeniu 5mM. Wynika z tego, że współzawodniczyć z transferyną mogą chelatory o dużej zdolności wiązania żelaza, głównie dwuwartościowego.

II-2. Ferrytyna

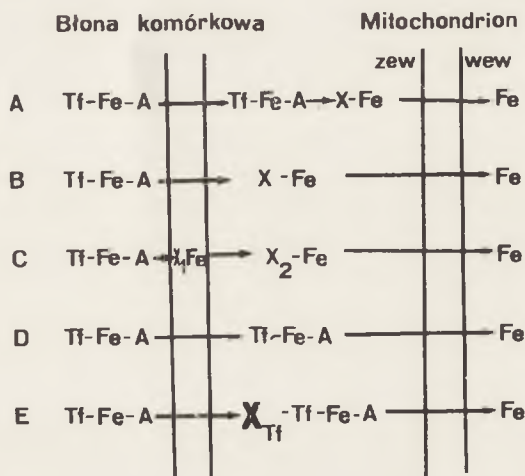
Badania wielu autorów (33, 34, 35, 59, 60) wskazywały na obecność ferrytyny w komórkach erytroidalnych. Cząsteczki ferrytyny mogą być syntetyzowane na rybosomach cytoplazmatycznych w pobliżu błony komórkowej erytroblastów. Jest to tzw. ferrytyna stroma, której powstawanie pobudzane jest nadmiernym nagromadzeniem się żelaza w komórce (60a). Ponadto ferrytyna może być pobierana na drodze pinocytozy z makrofagów układu siateczkowo-śródbłonkowego. Nie udało się potwierdzić wysuwanych początkowo sugestii o roli ferrytyny w wewnątrzkomórkowym transporcie żelaza (17, 34, 35).

II-3. Wewnątrzkomórkowe swoiste akceptory żelaza

Akceptorom żelaza przypisuje się rolę przenośników żelaza w obrębie komórki a w zależności od postulowanej roli transferyny mają one być różnie umiejscowione w schemacie transportu (Ryc. 7). Poza cytoplazmatycznymi akceptorami żelaza (A i B, Ryc. 7) sugerowano także obecność w stromie retikulocytów makrocząsteczki pośredniczącej w transporcie że-

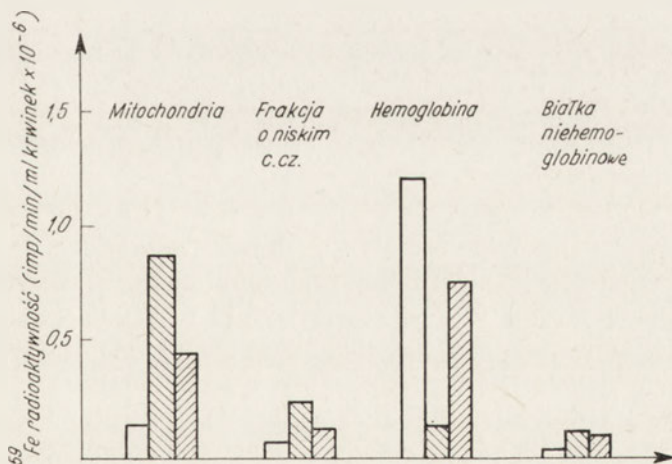
żelaza pomiędzy transferryną a nośnikami cytoplazmatycznymi (C, Ryc. 7) (16, 61). Część badaczy uważa, że jedynym wewnątrzkomórkowym przenośnikiem żelaza jest transferryna (D, Ryc. 7) (31, 57), według innych transport kompleksu Tf—Fe w cytosolu odbywa się za pośrednictwem specyficznego nośnika o masie cząsteczkowej 20 000 (E, Ryc. 7) (62).

Poszukując wewnątrzkomórkowych akceptorów żelaza Borova i wsp. (17) inkubowali retikulocyty królika z ^{59}Fe —Tf i inhibitorem syntezy hemu,



Ryc. 7. Schematy wewnątrzkomórkowego transportu żelaza.

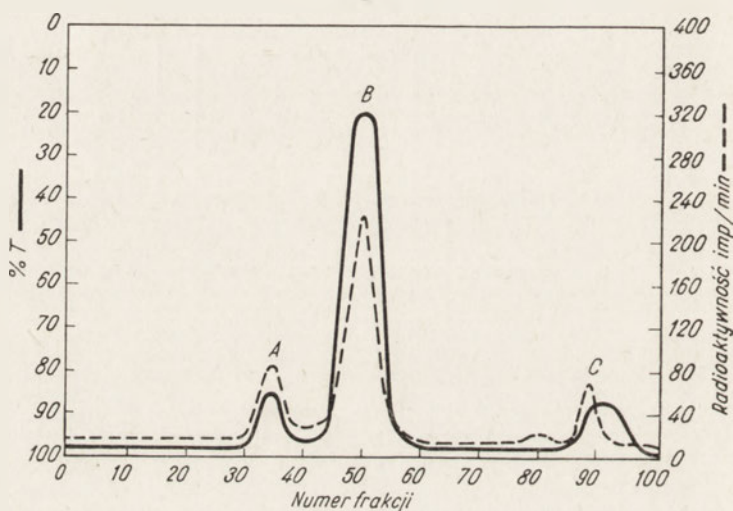
X i X_2 , cytoplazmatyczne akceptory żelaza, X_1 — stromowy nośnik żelaza, X_{Tf} — cytoplazmatyczny akceptor kompleksu Tf—Fe. Szczegółowe omówienie w tekście.



Ryc. 8. Rozmieszczenie żelaza w retikulocytach królika po 1 godz. inkubacji z ^{59}Fe —Tf (17).

□ — próba kontrolna, ▨ — retikulocyty inkubowane z hydrazidem kwasu izonikotynowego, ▩ — retikulocyty reinkubowane po usunięciu hydrazynu kwasu izonikotynowego.

hydrazidem kwasu izonikotynowego. Stwierdzili nagromadzenie się ^{59}Fe w mitochondriach, we frakcji cytoplazmatycznej o niskim ciężarze cząsteczkowym i w ferrytynie. Nie zaobserwowano zwiększonego wiązania ^{131}J —Tf przez stromę (Ryc. 8). Frakcję o niskiej masie cząsteczkowej zawierającą ^{59}Fe oddzielono na kolumnie z Sephadex G-50 od białek wiążących ^{59}Fe . Podczas reinkubacji krwinek po usunięciu hydrazidu kwasu izonikotynowego, żelazo akumulowane w mitochondriach i frakcji cytoplazmatycznej było szybko zużywane w syntezie Hb. Nie zmieniała się natomiast aktywność właściwa ^{59}Fe —ferrytyny izolowanej metodą immunoprecypitacji. Potwierdza to sugestię o niewykorzystywaniu żelaza ferrytynowego w syntezie Hb, przemawiając za obecnością w cytoplazmie akceptorów żelaza.



Ryc. 9. Krzywa wymywania z kolumny Sephadex G-100 nadsączu uzyskanego po inkubacji radioaktywnych (^{59}Fe) błon retikulocytów z nieradioaktywnym hemolizatem retikulocytów (63).

A — ferrytyna, B — Hb, C — frakcja o niskim ciężarze cząsteczkowym.

Wyniki uzyskane przez Workmana i Batesa (63) przemawiają również za istnieniem cytoplazmatycznych nośników żelaza. Radioaktywne preparaty błon retikulocytów inkubowano z nieradioaktywnym hemolizatem i wirowano. Rycina 9 przedstawia wyniki rozdziału uzyskanego nadsączu na kolumnie Sephadex G-100. ^{59}Fe stwierdzono w Hb, ferrytynie i frakcji o niskim ciężarze cząsteczkowym. Bliższa identyfikacja tej frakcji wykazała, że jest to jednorodne pod względem elektroforetycznym białko wiążące żelazo, o masie cząsteczkowej około 50 000 daltonów.

Z przedstawionych danych wynika, że cytoplazma retikulocytów zawiera prawdopodobnie specyficzne akceptory żelaza. Nie wiadomo natomiast czy i jaką rolę odgrywają w procesach transportu żelaza obecne w komórce chelatory np. aminokwasy i nukleotydy.

Zgromadzone dotychczas dane na temat mechanizmu pobierania żelaza przez retikulocyty nie pozwalają na ostateczne wyjaśnienie, która z obu przedstawionych hipotez jest słuszna. Nasuwa się przypuszczenie, że jeżeli nawet kompleks transferryny z żelazem przechodzi do wnętrza komórki, to prawdopodobnie przekazuje on żelazo do mitochondriów za pośrednictwem innych nośników cytoplazmatycznych. Nie wiadomo dotychczas czy mitochondria mogą pobierać żelazo z kompleksu Tf—Fe—A. Jeżeli tak, to enzym odszczepiający anion powinien być zlokalizowany nie w błonie komórkowej, jak opisywano, a w błonie mitochondrialnej. Kompleksy żelaza zastosowane w badaniach transportu tego pierwiastka do wnętrza mitochondrionu są układami sztucznymi (sacharoza, nukleotydy). Stwierdzenie jakie kompleksy biorą udział *in vivo* w pobieraniu żelaza przez mitochondria może w dużym stopniu wyjaśnić całe zagadnienie.

III. Transport żelaza przez błony mitochondrialne

Obserwacje przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazały, że w stanach patologicznych przebiegających z zaburzeniami syntezy globiny (β -talassemia) i hemu (anemia syderoblastyczna, niedobór witaminy B₆, zatrucie ołowiem) ma miejsce nadmierne odkładanie żelaza w mitochondriach erytroblastów (64). Podobne zjawisko zaobserwowano w przebiegu łagodnej anemii występującej podczas leczenia chloramfenikolem (65). Syntetaza kwasu σ -aminolewulinowego kluczowy enzym syntezy tetrapiroli — występuje w matriks (66—67) i przypuszcza się, że jest luźno związany z wewnętrzną błoną mitochondrialną (68, 69). Synteza tego enzymu przebiega na rybosomach cytoplazmatycznych. Cytosolowa postać o masie cząsteczkowej 178 000 jest prekursorem enzymu mitochondrialnego o masie cząsteczkowej 77 000. Chloramfenikol — inhibitor translacji mitochondrialnej — hamuje indukowany wzrost aktywności syntetazy kwasu σ -aminolewulinowego w mitochondriach, nie wpływa zaś na poziom enzymu w cytosolu (67). Sugerowano, że wbudowywanie białek mitochondrialnych lub ich niezbędnych podjednostek syntetyzowanych na rybosomach cytoplazmatycznych (i kodowanych przez genom jądrowy) do struktury całych mitochondriów wymaga syntezy na rybosomach mitochondrialnych niezbędnego białka typu „assembly protein” (70). Mitochondrialna biosynteza białek odgrywa prawdopodobnie rolę w transporcie i wbudowaniu syntetazy kwasu σ -aminolewulinowego do wnętrza mitochondrionu. Zahamowanie tych procesów może doprowadzić do zablokowania syntezy hemu i nagromadzenia się żelaza w mitochondriach (71).

Przedstawione wyniki pozostają w zgodzie z sugestią, że ostatni etap biosyntezy hemu, wbudowanie żelaza do protoporfiryny pod wpływem ferrochelatazy (E. C. 4.99.7.1), zachodzi w obrębie mitochondrionu (72, 73) w błonie wewnętrznej (74). Aby osiągnąć wewnętrzny przedział, żelazo mu-

si przejść przez obie błony mitochondrialne, różniące się znacznie przepuszczalnością. Błona zewnętrzna jest rodzajem sita molekularnego. Transport cząsteczek zjonizowanych przez błonę wewnętrzną, która posiada określony potencjał elektrochemiczny, odbywa się za pośrednictwem nośników. Porfiryna przyłącza jedynie Fe^{+2} niestabilne w warunkach tlenowych, tak że tkanki erytropoetyczne posiadają prawdopodobnie system enzymatyczny, umożliwiający utrzymanie żelaza w stanie zredukowanym. Obecność takiego systemu związanego przypuszczalnie z NADH i bursztynianem wykazano w retikulocytach szczura i w erytrocytach ptaków (29). Porfiryny mogą przyłączać żelazo także bez udziału enzymu, a wydajność i szybkość reakcji jest taka sama jak w obecności enzymu mitochondrialnego (75).

Badania z użyciem izolowanych mitochondriów dostarczyły pewnej ilości danych na temat transportu żelaza do wnętrza mitochondrionu. Mitochondria wątroby szczura inkubowano z $^{59}\text{Fe}/\text{III}/\text{ADP}$ i $^{59}\text{Fe}/\text{III}/\text{ATP}$ (22). Po wirowaniu w gradiencie sacharozy około 65% radioaktywności odnajdywano we frakcji mitochondrialnej. Ilość żelaza wynosiła 100nmoli $^{59}\text{Fe}/\text{mg}$ białka. Kontrolne mitochondria zawierały 16nmoli żelaza/mg białka. W doświadczeniach przeprowadzonych przy użyciu mitochondriów serca wołu (76) stwierdzono wiązanie znacznie większych ilości żelaza. Żelazo dodawano do zawiesiny mitochondriów w postaci pochodnych 8-hydroksychinoliny lub cytrynianu, oznaczano zaś metodą spektroskopową. Ilość związanych jonów Fe^{+2} i Fe^{+3} wynosiła 1,5—2,5 μmoli żelaza/mg białka. W obecności P_i w medium inkubacyjnym ilość związanego żelaza zwiększała się do 4,0—6,0 $\mu\text{moli}/\text{mg}$ białka. Wykazano brak współzawodnictwa pomiędzy jonami żelaza i miedzi i sugerowano, że metale te przyłączają się do różnych miejsc wiążących.

Najwięcej danych na temat transportu żelaza przez błony mitochondrialne dostarczyły badania przeprowadzone przez R o m s l o i wsp. (23, 24, 25, 26) przy użyciu kompleksów $\text{Fe}(\text{III})$ —sacharoza. Kompleksy te są trwałe, rozpuszczają się w pH obojętnym i nie przechodzą przez błony mitochondrialne. Mitochondria wątroby szczura inkubowano z kompleksem $^{59}\text{Fe}(\text{III})$ —sacharoza, a następnie wirowano w gradiencie sacharozy. Już po 10 minutach inkubacji frakcja mitochondrialna zawierała 62—70% całkowitej radioaktywności ^{59}Fe . Maksymalna ilość nagromadzonego żelaza wynosiła 180—240 nmoli/mg białka. Kontrolne mitochondria zawierały 4,3—9,1 nmoli żelaza/mg białka. Inhibitory łańcucha oddechowego hamowały częściowo pobieranie żelaza. Z wyników tych wywnioskowano, że we włączaniu żelaza biorą udział dwa procesy: niezależny od dopływu energii i taki, który wymaga wysokiego potencjału energetycznego błony wewnętrznej. Obydwa procesy różnią się optimum pH i wrażliwością na temperaturę. Zarówno zależna jak i niezależna od dopływu energii akumulacja żelaza przebiega jedynie w obecności Mg^{+2} i ulega zahamowaniu pod wpływem P_i i czynników chelatujących np. EDTA. Opisano dwa rodzaje miejsc

wiążących żelazo. Jedne, bardzo liczne, o stosunkowo niskim ($K_m \approx 400\mu\text{M}$) powinowactwie, wiążą około 60nmoli żelaza/mg białka, bez udziału związków wysokoenergetycznych. Żelazo to występuje głównie we frakcji błon zewnętrznych. Drugie miejsca wiążące, o dużym powinowactwie ($K_m \approx 30\mu\text{M}$) przyłączają około 10nmoli żelaza/mg białka w obecności czynnego łańcucha oddechowego. Ten „aktywny” transport hamowany jest przez związki blokujące grupy —SH oraz kompetycyjnie przez Ca^{+2} . Pobierane żelazo gromadzi się w matriks, przestrzeni międzybłonowej i błonie wewnętrznej.

Zależne i niezależne od dopływu energii pobieranie żelaza wykazano także w mitochondriach izolowanych z innych tkanek. Jak widać z danych przedstawionych w tabeli 1 występują znaczne różnice w ilości transportowanych „aktywnie” jonów Fe^{+3} i Ca^{+2} , spowodowane specjalizacją metaboliczną poszczególnych tkanek. Wysoki stosunek Fe/Ca charakteryzuje tkanki, w których odbywa się intensywne synteza hemu.

Tabela 1

„Aktywne” pobieranie jonów Fe^{+3} i Ca^{+2} przez izolowane mitochondria królika (26).

źródło mitochondriów	współczynnik kontroli oddechowej	nmole/mg białka		stosunek Fe: Ca
		Fe^{+3}	Ca^{+2}	
Retikulocyty	1,6	18,3	20,1	0,910
Nerka	3,9	10,5	105,9	0,099
Wątroba	2,7	8,0	50,5	0,158
Serce	2,9	3,6	174,9	0,021
Śledziona	1,6	2,2	34,6	0,042

W ostatnich pracach scharakteryzowano dokładniej transport żelaza wymagający energii, jego zależność od stanu funkcjonalnego mitochondriów oraz wpływ na procesy związane z oddychaniem (27, 28). Inkubację przeprowadzano bez inhibitorów łańcucha oddechowego oraz w obecności $17\mu\text{M}$ m-chlorofenylohydrazonu cyjanku karbonylu. Z różnicy obliczano „aktywny” transport żelaza. Do określenia funkcjonalnej integracji mitochondriów stosowano współczynnik kontroli oddechowej przy użyciu ADP (*respiratory control*_{ADP}). Maksymalny transport żelaza zaobserwowano przy wartości współczynnika 3,5—4,0. Walinomycyna stymulowała „aktywny” transport żelaza zwiększając energizację wewnętrznej błony mitochondrialnej. Po dodaniu do mieszaniny inkubacyjnej bursztynianu, pirogronianu, jabłczanu, β -hydroksymaślanu, α -ketoglutaranu oraz ADP i ATP w stężeniu powyżej $50\mu\text{M}$ następowało zahamowanie włączania żelaza (związki te mają własności chelatujące i tworzą stabilne kompleksy z żelazem). Niższe stężenia ATP zwiększały pobieranie żelaza. Stymulacja ta nie występowała po zahamowaniu translokazy przez atraktylozyd. Natomiast sam atraktylozyd nie

wywierał wpływu na transport żelaza, co sugerowało, że żelazo nie jest transportowane do wnętrza mitochondrionu jako kompleksy z nukleotydami.

Inkubacja mitochondriów z kompleksem Fe(III)—sacharoza powoduje zahamowanie lub stymulację oddychania, zależnie od stanu funkcjonalnego mitochondriów. Jeżeli mitochondria znajdują się w I stanie energetycznym według Chanc'e'a (76 a), następuje spadek pobierania O_2 , co może przemawiać za tym, że podczas „aktywnego” transportu zachodzi redukcja żelaza za pośrednictwem łańcucha oddechowego. Natomiast w III i IV stanie energetycznym zaobserwowano pobudzenie oddychania. IV stan energetyczny charakteryzuje wysoka energizacja błony wewnętrznej. Dodanie kompleksu Fe(III)—sacharoza do mitochondriów w tym stanie zwiększało pobieranie C_2 w obecności Mg^{+2} i P_i . Maksymalne pobudzenie obserwowano w obecności 80—100 μM żelaza. Zwiększenie pobierania O_2 było czterokrotnie wyższe przy użyciu jako substratu bursztynianu niż pirogronianu i jabłczanu. Ponieważ transport bursztynianu do wnętrza mitochondriów nie ulegał zmianie w obecności kompleksu Fe(III)—sacharoza w środowisku inkubacyjnym, sugerowano że w tych warunkach następuje podwyższenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej. Trzykrotnie wyższą stymulację oddychania obserwowano w III stanie energetycznym. Stan ten charakteryzuje się niższym poziomem energetycznym błony, dzięki temu, że część energii zużywa się na syntezę ATP po dodaniu ADP. Stymulacja oddychania w tym stanie przez kompleks Fe(III)—sacharoza powoduje według autorów przyspieszenie transportu nukleotydów przez błonę mitochondrialną.

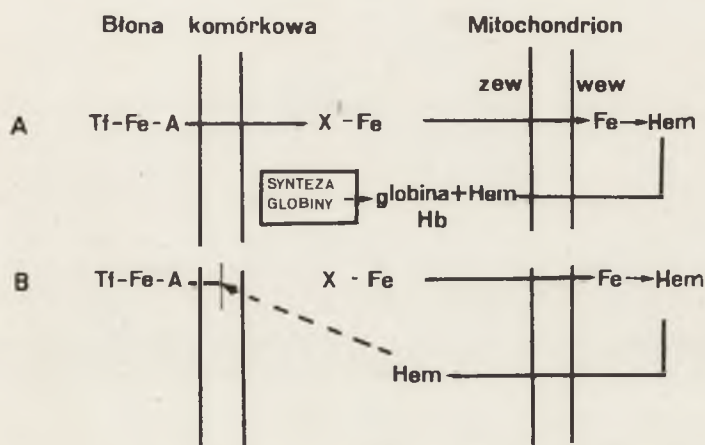
Brak jest danych na temat transportu żelaza *in vivo* do wnętrza mitochondrionu, a wyniki uzyskiwane *in vitro* są niejednokrotnie sprzeczne. Dyskusyjna jest rola nukleotydów adeninowych w tym procesie. Już w r. 1964 (77) stwierdzono, że kompleksy żelaza z nukleotydami adeninowymi pobudzają oddychanie mitochondrialne. Sugerowano wówczas transport tych kompleksów przez błony mitochondrialne. Obecnie przypuszcza się, że translokacji podlegają tylko wolne (nieskompleksowane) nukleotydy (78). Kompleksy żelaza z nukleotydami są bardzo trwałe, na przykład stała $K_{Fe(III)ADP}$ w pH 7,0 wynosi $10^{29} M^{-1}$. Według Romslo i wsp. (23) mitochondria nie mogą uwalniać żelaza z tych kompleksów, natomiast Strickland i Davis (22) zastosowali je w badaniach transportu żelaza. W obu pracach mitochondria izolowano z wątroby szczura.

Mitochondria posiadają zdolność akumulowania jonów dwuwartościowych: Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} i Sr^{+2} . Proces ten przebiega w obecności P_i i wymaga dopływu energii (79). Wydaje się jednak, że transport żelaza przez błony mitochondrialne odbywa się w sposób wysoce specyficzny, przy udziale swoistego systemu transportowego, który uniemożliwia kompleksowanie żelaza z innymi chelatorami. Z drugiej strony nie można wykluczyć istnienia kompleksów żelaza o określonej roli metabolicznej, które nie biorą udziału w procesach transportu (80).

IV. Regulacja wewnątrzkomórkowego transportu żelaza

Zagadnienia związane ze wzajemną regulacją syntezy hemu i globiny są przedmiotem prac czeskiej grupy badaczy, postulujących istnienie swoistego mechanizmu kontrolującego szybkość pobierania żelaza w komórkach erytroidalnych (81). Badano włączanie ^{59}Fe do retikulocytów królika inkubowanych z inhibitorami syntezy hemu i globiny. Szczególną uwagę zwrócono na hem, który *in vitro* pobudza syntezę globiny, wywierając działanie supresyjne na inhibitor inicjacji łańcuchów globiny (82), oraz hamuje swoją własną syntezę zmniejszając ilość pobieranego żelaza (83). Już w stężeniu 10^{-5}M hem obniża inkorporację ^{59}Fe z transferyny (84), nie wpływa natomiast na aktywność syntetazy kwasu δ -aminolewulinowego i innych enzymów biorących udział w syntezie tetrapiroli (85).

Wykrycie wewnątrzkomórkowej puli wolnego hemu w niedojrzałych komórkach erytroidalnych potwierdziło hipotezę o roli tego związku w regulacji transportu żelaza (86). Po inkubacji z inhibitorami syntezy globiny wzrasta ilość wolnego hemu w cytoplazmie i w mitochondriach (87). Nagromadzający się hem hamuje pobieranie żelaza, wpływając prawdopodobnie



Ryc. 10. Schemat regulacji pobierania Fe przez hem.

X — cytoplazmatyczny akceptor Fe. Górna część ryciny (A) przedstawia transport żelaza i syntezę Hb w warunkach prawidłowych. Hem syntetyzowany w mitochondriach przechodzi do cytoplazmy i łączy się z globiną. Po inkubacji z inhibitorami syntezy globiny (B) wzrasta ilość wolnego hemu w cytoplazmie i w mitochondriach. Nagromadzający się hem hamuje (linia przerywana) pobieranie żelaza z kompleksu Tf-Fe-A, natomiast nie wpływa na wykorzystanie wewnątrzkomórkowego żelaza niehemowego (X-Fe).

na proces uwalniania tego pierwiastka z kompleksu z transferyną (88). Inhibitory syntezy hemu (hydrazyd kwasu izonikotynowego i penicylamina) zmniejszają zahamowanie pobierania żelaza, spowodowane zablokowaniem syntezy globiny (83, 89). Pobudzenie syntezy hemu po dodaniu fosforanu pirydoksalu powoduje powtórnie spadek pobierania żelaza. W świetle przy-

toczonych badań nie ulega wątpliwości, że szybkość włączania ^{59}Fe zależy od wzajemnych stosunków pomiędzy syntezą globiny i hemu (90) i jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia wolnego hemu w cytoplazmie i w mitochondriach (Ryc. 10).

Hipoteza, że hem hamuje pobieranie żelaza na zasadzie sprzężenia zwrotnego jest słuszna, jeżeli założyć, że związek ten nie hamuje wykorzystania wewnątrzkomórkowego żelaza niehemowego np. żelaza połączonego z akceptorami cytoplazmatycznymi lub mitochondrialnymi. Badano wpływ heminy na włączanie żelaza przez retikulocyty, które miały sztucznie podwyższoną pulę żelaza prekursorowego. Obniżeniu ulegało pobieranie ^{59}Fe z kompleksu z transferryną, natomiast wykorzystanie żelaza wewnątrzkomórkowego nie ulegało zmianie (17,91,92). Opisany schemat regulacji pozwala na wyjaśnienie nadmiernego nagromadzenia się niehemowego żelaza w krwinkach, w przebiegu anemii syderoblastycznych spowodowanych zahamowaniem syntezy hemu (81).

Rolę regulującą może odgrywać także układ cykliczny adenylowej, ponieważ ostatnio stwierdzono, że w procesie uwalniania żelaza z kompleksu z transferryną bierze udział cykliczny AMP (93).

Uwagi końcowe

Żelazo odgrywa centralną rolę w metabolizmie energetycznym każdej żywej komórki. W utlenianiu substancji organicznych biorą udział dwa typy białek: enzymy z klasy oksydoreduktaz oraz białka przenoszące tlen. Są to metaloproteidy zawierające żelazo i miedź. Metale te posiadają dwa trwałe stany walencyjne, co umożliwia ich udział w reakcjach utleniania i redukcji oraz tworzą stabilne kompleksy m.in. z anionami, ujemnymi biegunami cząsteczek polarnych, tlenem cząsteczkowym i tlenkiem węgla. Żelazo-proteidy można podzielić na białka hemowe (Hb, mioglobina, hydroperoksydazy, cytochromy, oksydaza cytochromowa) i niehemowe (oksydoreduktazy flawoproteidowe, oksygenazy, ferrydoksyna, transferryna, ferrytyna, hemosyderyna).

Transport żelaza w obrębie komórek jest bardzo intensywny. Okres półtrwania żelaza osoczowego wynosi zaledwie 60—120 minut. Poznanie mechanizmów wewnątrzkomórkowego metabolizmu tego pierwiastka otwiera nowe perspektywy w zakresie profilaktyki i terapii wielu schorzeń układu czerwono-krwinkowego.

Artykuł nadszedł 13.2.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 20.5.1976.

PIŚMIENNICTWO

1. Morgan E. H., Baker E., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 442—454.
2. Morgan E. H., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **244**, 103—116.
3. Morgan E. H., (1972), *Med. J. Aust.*, **2**, 322—325.

4. Bates G. W., Workman E. F., Schlabach M. R., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 84—90.
5. Egyed A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 805—813.
6. Verhoef N. J., Kremers J. H. W., Leijnse B., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 114—122.
7. Hemmaplardh D., Morgan E. H., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **373**, 84—99.
8. Baker E., Morgan E. H., (1969), *Biochemistry*, **8**, 2954—2958.
9. Fletcher J., (1970), *Proc. Roy. Soc. Med.*, **63**, 1216—1218.
10. Evans G. H. W., Hrace C. J., (1974), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **147**, 687—689.
11. Morgan E. H., Baker E., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **363**, 240—248.
12. Hahn D., Ganzoni A. M., (1975), *Acta Haemat.*, **53**, 321—328.
13. Sarkar B., (1970), *Can. J. Biochem.*, **48**, 1339—1350.
14. Siimes M. A., Dallman P. R., (1974), *Brit. J. Haemat.*, **28**, 7—18.
15. Hrinda M. E., Goldwasser E., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **195**, 165—175.
16. Garret N. E., Garret R. J. B., Archdeacon J. W., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 466—474.
17. Borova J., Poňka P., Neuwirt J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 143—156.
18. Boulard M., Delin M., Najean Y., (1972), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **139**, 1379—1384.
19. Kadenbach B., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **12**, 392—398.
20. Drayan R., Jakovcic S., Rabinowitz M., (1973), *Biochem. J.*, **134**, 377—385.
21. Weiss H., Ziganke B., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 63—71.
22. Strickland E. H., Davis B. C., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **104**, 596—599.
23. Romslo I., Flatmark T., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 29—40.
24. Romslo I., Flatmark T., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **325**, 38—46.
25. Romslo I., Flatmark T., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **347**, 160—167.
26. Romslo I., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **357**, 34—42.
27. Romslo I., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 69—79.
28. Romslo I., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 80—94.
29. Barnes R., Jones O. T. G., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 304—308.
30. Hemmaplardh D., Morgan E. H., (1974), *Exp. Cell Res.*, **87**, 207—212.
31. Martinez-Meddellin J., Schulman H. M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **264**, 272—284.
32. Greenough W. B., Peters T., Thomas D., (1962), *J. Clin. Invest.*, **41**, 1116—1124.
33. Mazur A., Carleton A., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 1817—1824.
34. Zail S. S., Charleton R. W., Torrance J. D., Bothwell T. H., (1964), *J. Clin. Invest.*, **43**, 670—680.
35. Primosigh J. V., Donnall E., (1968), *J. Clin. Invest.*, **47**, 1473—1482.
36. Speyer B. E., Fielding J., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **332**, 192—200.
37. Konopka K., (1970), *Post. Bioch.*, **16**, 205—220.
38. Bates G. W., Schlabach M. R., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2177—2181.
39. Aisen P., Aasa R., Malmström B. G., Vännagard T., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 2484—2490.
40. Bates G. W., Wernicke J., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3679—3685.
41. Price E. M., Gibson J. F., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 646—651.
42. Aisen P., Leibman A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 797—804.

43. Aisen P., Leibman A., Pinkowitz R. A., Pollack S., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3679—3684.
44. Martinez-Medellin J., Schulman H. M., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 32—38.
45. Van Snick J. L., Masson P. L., Heremans J. F., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 231—233.
46. Bates G. W., Billups C., Saltman P., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 2810—2815.
47. Bates G. W., Billups C., Saltman P., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 2816—2821.
48. Bates G. W., Schlabach M. R., (1973), *FEBS Letters*, **33**, 289—292.
49. Schlabach M. R., Bates G. W., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2182—2188.
50. Fielding J., Ryall R., Edwards S. A., (1969), *J. Clin. Path.*, **22**, 677—679.
51. Schulman H. M., Martinez-Medellin J., Sidloi R., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **343**, 529—534.
52. Fielding J., Speyer B. E., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **363**, 387—396.
53. Lane R. S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 133—142.
54. Egyed A., (1974), *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **9**, 43—52.
55. Kailis S. G., Morgan E. H., (1974), *Brit. J. Haemat.*, **28**, 37—52.
56. Baker E., Morgan E. H., (1969), *Biochemistry*, **8**, 1133—1141.
57. Morgan E. H., Appleton T. C., (1969), *Nature*, **223**, 1371—1372.
58. Hemmaplardh D., Kailis S. G., Morgan E. H., (1974), *Brit. J. Haemat.*, **28**, 53—65.
59. Bessis M. C., Breton-Gorius J., (1962), *Blood*, **19**, 635—663.
60. Gabuzda T. G., Pearson J., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **194**, 50—54.
- 60a Tanaka Y., Brecher G., (1971), *Blood*, **37**, 211—219.
61. Denton M. J., Delves H. T., Arnstein H. R. V., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 8—13.
62. Sly D. A., Grohlich D., Bezkorovainy A., (1975), **385**, 36—40.
63. Workman E. F., Bates G. W., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 787—794.
64. Cooper R. G., Webster L. T., Harris J. W., (1963), *J. Clin. Invest.*, **42**, 926—928.
65. Goodman J. R., Hall S. G., (1967), *Brit. J. Haemat.*, **13**, 335—340.
66. Zuyderhoudt F. M. J., Borst P., Huijing F., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 408—411.
67. Whiting M. J., Elliott W. H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6818—6826.
68. Ohashi A., Kikuchi G., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 34—46.
69. Patton G. M., Beattie D. S., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4467—4474.
70. Barath Z., Kuntzel H., (1972), *Nature, New Biology*, **240**, 195—197.
71. Rosenberg A., Marcus O., (1974), *Brit. J. Haemat.*, **26**, 79—83.
72. Mazanowska A., Danciewicz A. M., Malinowska T., Kowalski E., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **7**, 583—587.
73. Tokunaga R., Sano S., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **264**, 263—271.
74. Jones M. S., Jones O. T. G., (1969), *Biochem. J.*, **113**, 507—514.
75. Kassner R. J., Walchak H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 294—303.
76. Cederbaum A. I., Wainio W. W., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4593—4603.
- 76a. Chance B., Williams G. R., (1955), *Nature*, **176**, 250—255.
77. Goucher C. R., Taylor J. F., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 2251—2255.
78. Duszyński J., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 275—293.
79. Reynafarje B., Lehninger A. L., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 584—593.
80. Konopka K., Leyko W., Gondko R., Sidorczyk Z., Fabjanowska Z., Szwedowska M., (1969), *Clin. Chim. Acta*, **24**, 359—366.

81. Pońka P., Neuwirt J., (1974), *Brit. J. Haemat.*, **28**, 1—5.
82. Gross M., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **340**, 484—497.
83. Pońka P., Neuwirt J., (1969), *Blood*, **33**, 690—707.
84. Pońka P., Neuwirt J., (1972), *Experientia*, **28**, 189—190.
85. Neuwirt J., Pońka P., Borova J., (1974), *Enzyme*, **17**, 100—107.
86. Neuwirt J., Pońka P., Borova J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **264**, 235—244.
87. Pońka P., Borova J., Neuwirt J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 715—718.
88. Pońka P., Neuwirt J., Borova J., (1974), *Enzyme*, **17**, 91—99.
89. Pońka P., Neuwirt J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **230**, 381—392.
90. Fuhr J. F., Gengozian N., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 53—58.
91. Pońka P., Neuwirt J., (1970), *Brit. J. Haemat.*, **19**, 593—604.
92. Pońka P., Neuwirt J., Borova J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 123—131.
93. Pońka P., Neuwirt J., (1975), *Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine*, red. R. R. Crichton. North Holland Publishing Comp. Amsterdam, str. 147—154.

KOMUNIKAT

W pierwszej połowie września 1977 r. odbędzie się w Gdańsku Kolokwium pod nazwą „Bioenergetyka i Mitochondria”. Będzie to siódme kolejne spotkanie bioenergetyków Bułgarii, Czechosłowacji, NRD, Polski, Węgier i ZSRR (poprzednie kolokwia tego rodzaju odbywały się kolejno w Warszawie, Pradze, Tihany, Magdeburgu, Warszawie i Odessie). Program Kolokwium przewiduje referaty i doniesienia plakatowe. Obrady odbywać się będą w języku angielskim. Organizatorem Kolokwium jest Sekcja Bioenergetyki Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, wspólnie z Zakładem Biochemii Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego i Zakładem Biochemii Klinicznej Instytutu Patologii A.M. w Gdańsku.

Bliższych informacji udziela prof. Stefan Angielski, Zakład Biochemii Klinicznej, Instytut Patologii A.M. ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk.

MARIA DROBA * KAZIMIERZ STRZAŁKA **

Zastosowanie metod immunologicznych do badania struktury błon tylakoidów

Application of Immunological Methods to Investigation of Thylakoid Structure

Zasadniczy element strukturalny chloroplastów stanowi układ lamellarny, którego podstawową jednostką jest tylakoid (1,2,3).

Skład chemiczny lamelli (błon tylakoidów) oraz poglądy na ich organizację na poziomie molekularnym opisał ostatnio Więc k o w s k i w artykule przeglądowym (4).

W błonach tylakoidów zachodzi fosforylacja fotosyntetyczna dzięki obecności przenośników elektronów oraz barwników fotosyntetyzujących (Ryc. 1).

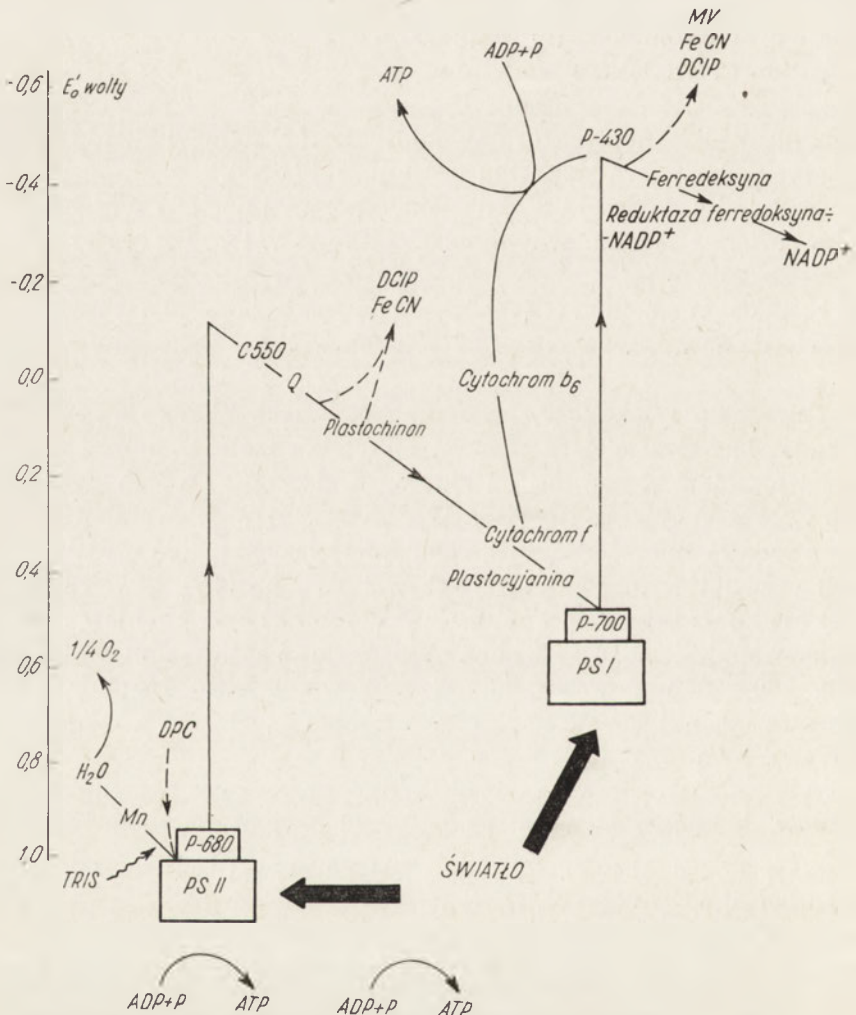
Strukturę błon tylakoidów, podobnie jak innych błon cytoplazmatycznych bada się najczęściej za pomocą mikroskopii elektronowej, pomiaru dyfrakcji promieni X pod małym kątem, dichroizmu, stopnia polaryzacji światła fluorescencyjnego itp. Badając zjawiska dichroizmu liniowego i polaryzacji światła fluorescencyjnego zdołano określić stopień orientacji niektórych barwników fotosyntetycznych w lamellach (6,7). Stwierdzono, że również białka strukturalne występują w obrębie błon tylakoidów w formie uporządkowanej. Analizując widma absorpcyjne i dichroizmu liniowego w zakresie 260—290nm, wykazano ukierunkowanie reszt tryptofanowych; α -heliksowe odcinki łańcucha polipeptydowego są ułożone równolegle do powierzchni błon (8).

Dotychczas zaproponowano wiele modeli obrazujących strukturę błon tylakoidów. Jednym z nich jest model przedstawiony na rycinie 2. Model

* Mgr, ** Dr, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, ul. Grodzka 53, 31-001 Kraków.

Wykaz stosowanych skrótów: PS I — I układ fotosyntezy; PS II — II układ fotosyntezy; P 700 i P 680 — formy chlorofilu a znajdujące się odpowiednio w centrum reakcji I i II układu fotosyntezy; C 550 i Q — akceptory elektronów PS II; P 430 — pierwszy akceptor elektronów PS I; DPC — dwufenylokarbazyd; DCIP — 2,6-dwuchlorofenyloindofenol; MV — metyloviologen (dwuchlorowodorek N—N'-dwumetylo-4,4'-dwupirydyli); TRIS — trójhydroksymetyloaminometan; SDS — siarczan dodecyłu sodu; PMS — metylosiarczan N-metylofenazyniowy; CF₁ — czynnik sprzęgający fotofosforylację; EDTA — kwas etylenodwuamino-czterooctowy.

ten został opracowany przez K i r k a (9) na podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym (10,11,12), danych dotyczących struktury i grubości podwójnej warstwy lipidowej (13), oraz dyfrakcji promieni X pod małym kątem na błonach tylakoidów (14,15). Model zakłada, że w podwójnej warstwie lipidowej znajdują się co najmniej dwa typy cząstek białkowych. Większe z nich składają się z czterech podjednostek. Inne białka (np. CF₁, ferredoksyna, karboksylaza 1,5-dwufosforybulozy) są dość luźno związane z zewnętrzną powierzchnią błon. Według tego modelu cząsteczki chlorofilu nie tworzą oddzielnej warstwy, lecz występują w kompleksach z białkami.

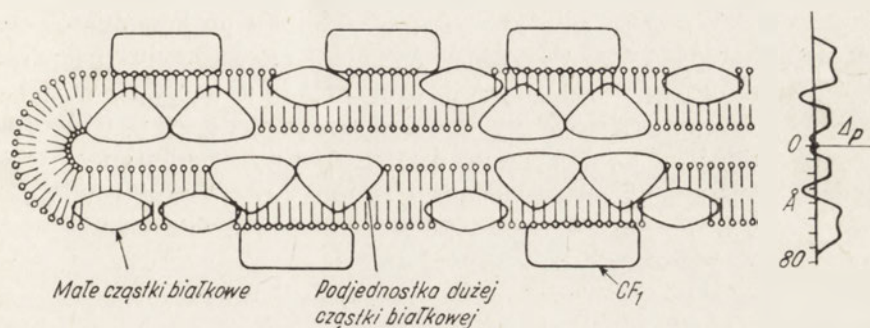


Ryc. 1. Schemat przepływu elektronów (5, zmodyfikowany).

Na schemacie zaznaczono liniami przerywanymi miejsca włączenia sztucznych donorów i akceptorów elektronów oraz liniami wężykowatymi miejsca działania inhibitorów reakcji fotosyntetycznych.

Pomimo opracowania różnych modeli przedstawiających strukturę lamelli organizacja tych struktur na poziomie molekularnym jest nadal przedmiotem licznych spekulacji, gdyż brak odpowiednich metod badawczych uniemożliwia dotąd uzyskanie jednoznacznych wyników.

Od kilku lat stosuje się z powodzeniem metody immunologiczne w celu uzyskania informacji o przestrzennym rozmieszczeniu poszczególnych składników chemicznych w obrębie błon tylakoidów i o stanie konformacyjnym tych struktur.



Ryc. 2. Model Kirka przedstawiający strukturę błony tylakoidu (9).

Po prawej stronie schematu podano wykres obrazujący rozłożenie gęstości elektronowej na podstawie pomiarów dyfrakcji promieni X pod małym kątem. Obszary błony o dużej gęstości elektronowej odpowiadają cząsteczkom białkowym, obszary o mniejszej gęstości elektronowej — warstwowkom lipidowym. Inne szczegóły podano w tekście.

Metody immunologiczne w zastosowaniu do badań struktury błon tylakoidów polegają na otrzymaniu surowic zawierających przeciwciała specyficzne w stosunku do określonych składników błon i śledzeniu aglutynacji w wyniku reakcji przeciwciało—antygen. Podstawą tych metod jest założenie, że reakcja przeciwciał z chloroplastami klasy II (pozbawionymi błony zewnętrznej) zachodzi jedynie wtedy, gdy determinanty antygenowe mogą bezpośrednio kontaktować z przeciwciałami tzn. gdy znajdują się one na powierzchni tylakoidów. Aglutynacja przebiega w warunkach gdy każda cząsteczka przeciwciała reaguje jednocześnie z dwiema determinantami znajdującymi się na powierzchni dwóch tylakoidów. Czasami cząsteczka przeciwciała może być związana tylko przez powierzchnię jednego tylakoidu. Dzieje się tak np. wtedy, gdy determinanta antygenowa znajduje się we wgłębieniu na powierzchni tylakoidu. W takim przypadku aglutynacja zachodzi dopiero po dodaniu anti- γ -globuliny lub rozpuszczalnego antygeny. Gdy wiązanie przeciwciał następuje dopiero po rozbiciu tylakoidów świadczy to, że determinanty antygenowe znajdują się po wewnętrznej stronie błony. Rozbicie błon umożliwia dotarcie przeciwciał do właściwych antygenów.

I. Rozmieszczenie składników białkowych w tylakoidach

Stosując metody immunologiczne potwierdzono obecność dwóch warstw białkowych w lamellach chloroplastów oraz wykazano, że w warstwie zewnętrznej znajduje się I układ fotosyntezy (PS I, ang. *photosynthetic system*) w wewnętrznej zaś II układ (Ps II) (16). Wyniki te uzyskano dzięki następującemu postępowaniu: frakcje błon tylakoidów, wzbogacone w PS I lub PS II, otrzymano stosując inkubację chloroplastów w roztworze Tritonu X-100 i wirowanie różnicowe. Uzyskane frakcje wstrzykiwano królikom, z których następnie izolowano antysurowice wykazujące specyficzną aglutynacyjną w stosunku do kompleksów odpowiednich układów fotosyntezy. Stwierdzono, że proces aglutynacji zachodził intensywniej w wyniku reakcji przeciwciała specyficznego w stosunku do PS I, niż przeciwciała specyficznego w stosunku do PS II (chloroplasty klasy II). Świadczy to, że antygen odpowiedzialny za aglutynację chloroplastów, występujący na powierzchni lamelli jest składnikiem I układu fotosyntezy; w nieuszkodzonych tylakoidach przeciwciała trudniej dostają się do cząstek należących do PS II niż do PS I.

W innego rodzaju doświadczeniach otrzymano antysurowicę przeciwko cząstkom PS II (17, 18). W obecności tych przeciwciał następowało zahamowanie wydzielania tlenu w chloroplastach klasy II, co było przypuszczalnie wynikiem przerwania transportu elektronów na odcinku pomiędzy miejscami włączenia się $MnCl_2$ i dwufenylokarbozydu (DCP) (Ryc. 1). Autorzy przypuszczają, że przeciwciała te działają na czynnik białkowy, który ulega inaktywacji podczas przemywania chloroplastów 0,8 M buforem TRIS o $pH = 8,0$. Czynnik reagujący ze specyficznym przeciwciałem można usunąć przez kilkakrotne zamrażanie i rozmrażanie chloroplastów (19).

Stosując inkubację chloroplastów w roztworze dezoksycholanu i następnie sączenie na żelu Sephadex rozdzielono białka lamellarne chloroplastów na trzy frakcje o masach cząsteczkowych 600 000, 110 000 i 83 000, które wykazywały aktywność kolejno PS I, PS I i PS II oraz PS II (20). Antysurowica przeciwko frakcji I nie powodowała aglutynacji struktur lamellarnych ani nie hamowała przepływu elektronów. Natomiast po rozbiciu tylakoidów działaniem ultradźwięków zachodziła bezpośrednia aglutynacja, oraz obserwowano przerwanie transportu elektronów w rejonie I reakcji świetlnej. Antysurowica przeciwko frakcji II aglutynowała bezpośrednio pozbawione stromy lamelle i hamowała transport elektronów w obrębie PS I. Przeciwciała przeciwko frakcji III aglutynowały chloroplasty klasy II i hamowały reakcję Hilla z żelazicyjankiem potasowym jako akceptorem elektronów, podczas gdy redukcja żelazicyjanku w obecności dwufenylokarbozydu jako donatora elektronów przebiegała bez zakłóceń. Wyniki te wskazują, że antysurowica przeciwko frakcji III blokuje transport elektronów na odcinku pomiędzy układem rozszczepiającym wodę, a miejscem przekazywania elektronów z dwufenylokarbozydu na PS II (Ryc. 1).

Stosując elektroforezę na żelu poliakryloamidowym w obecności SDS wyizolowano z błon tylakoidów cztery polipeptydy o masach cząsteczkowych: 66 000, 62 000, 33 000, 24 000 (21). Przeciwciała otrzymane przeciwko tym czterem polipeptydom aglutynowały chloroplasty pozbawione stromy, co wskazywało, że determinanty antygenowe tych polipeptydów występują na zewnętrznej powierzchni błony tylakoidu. Badano również wpływ tych przeciwciał na aktywność fotochemiczną chloroplastów stosując dla porównania także surowice kontrolne. Okazało się, że antysurowica przeciwko polipeptydowi o masie cząsteczkowej 66 000 hamowała tylko redukcję metylowiologenu (MV) przy udziale PS I (Tabela 1). Antysurowica ta działała przypuszczalnie pomiędzy pierwotnym akceptorem PS I a ferredoksyną (Ryc. 1). Przeciwciała przeciwko polipeptydowi o masie 33 000 hamowały redukcję metylowiologenu a także w około 30% cykliczną fosforylację w obecności metylosiarczanu N-metylofenazyniowego (PMS). Fosforylacja niecykliczna w obecności metylowiologenu jako akceptora elektronów przebiegała bez zakłóceń. Przeciwciała te działały prawdopodobnie w miejscu przekazywania elektronów na P 700. Antysurowica przeciwko polipeptydowi o masie 62 000 hamowała w około 60% redukcję NADP^+ z udziałem wodoru z wody. Zjawisko to nie występowało w obecności czynników rozprzegających fotofosforylację. Ponadto surowica ta hamowała w około 87% cykliczną fosforylację w obecności metylosiarczanu N-metylofenazyniowego i w około 65% — fosforylację niecykliczną. Antysurowica przeciwko polipeptydowi o masie 24 000 hamowała o 10—16% przepływ elektronów z wody na NADP^+ ; nie udało się jednak ustalić miejsca jej działania.

Wiązanie się specyficznych przeciwciał z odpowiednimi przenośnikami elektronów prowadziło również do zahamowania aktywności PS I. W ten sposób wykazano, że indukowany światłem przepływ elektronów ustaje po wprowadzeniu przeciwciał przeciwko ferredoksynie (22), substancji redukującej ferredoksynę (23), reduktazie ferredoksyna : NADP^+ (24, 25) i P 700 (26); wszystkie te nośniki muszą się przeto znajdować po stronie zewnętrznej błony. Natomiast przeciwciała przeciwko plastocyjaninie (27) i cytochromowi f (26) hamują transport elektronów tylko w chloroplastach rozbitych działaniem ultradźwięków. Hamowanie transportu elektronów za pomocą przeciwciał przeciwko plastocyjaninie obserwowano również po napęcznieniu chloroplastów (28). W tych warunkach przeciwciała miały dostęp do obszaru przegrody (ang. *partition*) w obrębie błon tylakoidów, gdzie mogą występować determinanty antygenowe plastocyjaniny.

Szczepiąc króliki oczyszczonym preparatem ferredoksyny z liści szpinaku otrzymano przeciwciała o wysokim stopniu specyficzności w stosunku do tego białka (29, 30). Przeciwciała te charakteryzowały się dużą specyficznością wobec ferredoksyny ze szpinaku, mniejszą w stosunku do ferredoksyny pochodzącej z sinicy *Phormidium persicinum*, a nie reagowały z ferredoksyną z *Clostridium*. Badania porównawcze tego typu mogą rzucić

Tabela 1

Wpływ antysurowic przeciwko polipeptydom izolowanym z układu lamellarnego *Antirrhinum majus* na reakcje fosforylacji w chloroplastach *Nicotiana tabacum* (21).

Antysurowica przeciwko polipeptydowi o masie cząsteczkowej	$\mu\text{M AT}^{32}\text{P}/\text{mg chlorofilu}/\text{godz}$		
	fosforylacja niecykliczna $\text{H}_2\text{O}-\text{K}_3(\text{FeCN})_6$	fosforylacja niecykliczna $\text{H}_2\text{O}-\text{MV}$	fosforylacja cykliczna zależna od PMS
66 000	48,1	8,8	477
Surowica kontrolna	43,1	11,3	515
% zahamowania	0	22	7
62 000	16	4,4	24,3
Surowica kontrolna	47	12,5	187
% zahamowania	66	65	87
33 000	47	14,8	156
Surowica kontrola	47	12,6	222
% zahamowania	0	0	30
24 000	47,3	9,0	331
Surowica kontrolna	49	8,8	0
% zahamowania	3	0	0
Kontrola bez dodania surowicy	31	10,3	395

pewne światło na podobieństwa i różnice w strukturze pokrewnych związków pochodzących z różnych źródeł.

Wykazano również (29, 30), że przeciwciała otrzymane przeciwko ferredoksynie hamowały redukcję NADP^+ i fosforylację cykliczną, co może wskazywać na reagowanie przeciwciał zarówno z wolną ferredoksyną, łatwo wypłukiwaną w czasie izolowania chloroplastów, jak również ze związaną z błonami. Z drugiej strony jednak zaobserwowano, że silniejsze hamowanie enzymatycznej redukcji cytochromu c przez NADPH można osiągnąć w układach enzymatycznych *in vitro* w porównaniu z preparatem chloroplastów. Fakt ten może z kolei sugerować, że związana ferredoksyna jest niedostępna dla przeciwciał.

Zastosowanie metod immunologicznych przyczyniło się także do poznania rozmieszczenia reduktazy ferredoksyna : NADP^+ w lamellach chloroplastów. Wiadomo, że enzym ten ulega łatwo wypłukaniu z tylakoidów i dlatego niektórzy badacze uważali, że znajduje się on we frakcji rozpuszczalnej. Początkowo nie udawało się stwierdzić obecności tego enzymu na powierzchni lamelli; po wprowadzeniu specyficznych przeciwciał do zawiesiny chloroplastów lub fragmentów tylakoidów nie tworzyły się precipitaty. Dopiero zastosowanie testu podwójnych przeciwciał (aglutynacja pośrednia) i mieszanej antygenowo aglutynacji (Ryc. 3) pozwoliło na wykaza-

nie obecności tego enzymu na powierzchni lamelli (24,25). Stwierdzono mianowicie, że γ -globuliny przeciwko reduktazie ferredoksyna : NADP^+ wiążą się z powierzchnią lamelli choć nie prowadzi to do aglutynacji. Aglutynacja występuje dopiero po wprowadzeniu do takiej zawiesiny przeciwciał przeciwko tym γ -globulinom (*anty- γ -globulin*).

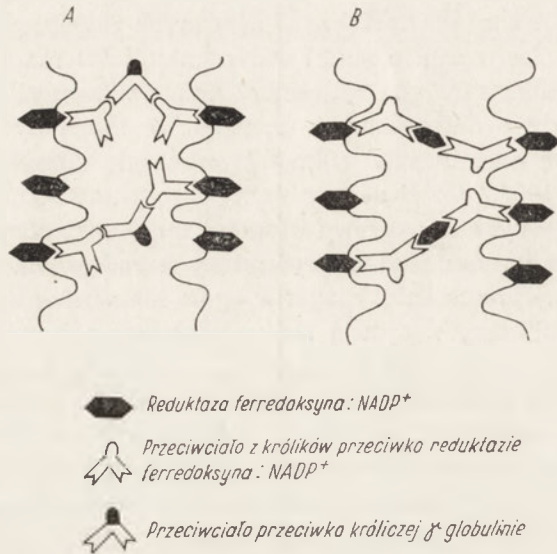
Przedstawione fakty wskazują, że reduktaza ferredoksyna : NADP^+ jest integralną częścią błon tylakoidów i, że determinanty antygenowe znajdują się na ich zewnętrznej powierzchni w znacznych zagłębieniach. Częsteczką wiążącego je przeciwciała o stałej sedymentacji 7S ma kształt litery Y, a odległość pomiędzy dwoma wiążącymi końcami wynosi około 160Å (31), co oznacza że dwie determinanty antygenowe mogą być wiązane przez jedną cząsteczkę przeciwciała tylko wówczas, gdy odległość między nimi nie przekracza 160Å. Jeżeli determinanty antygenowe znajdują się w zagłębieniach większych niż połowa długości cząsteczki przeciwciała (jak to ma miejsce w przypadku ułożenia reduktazy ferredoksyna : NADP^+ w błonach tylakoidów) prosta aglutynacja w ogóle nie występuje: determinanty antygenowe reduktazy znajdują się w zagłębieniach wynoszących 60—200Å (32).

Występowanie aglutynacji mieszanej antygenowo również wskazuje na umiejscowienie cząsteczek reduktazy ferredoksyna : NADP^+ w zagłębieniach lamelli. Izolowane chloroplasty lub ich fragmenty poddawano działaniu przeciwciał specyficznych w stosunku do reduktazy; aglutynacja występowała dopiero po dodaniu oczyszczonej reduktazy ferredoksyna : NADP^+ . Prowadzący do aglutynacji sposób łączenia się oczyszczonego enzymu z przeciwciałami przeciwko reduktazie pokazany jest na rycinie 3.

Wysuwano przypuszczenie, że reduktaza ferredoksyna : NADP^+ znajduje się w zagłębieniach powstałych na skutek obecności na powierzchni lamelli czynnika sprzęgającego fosforylację (CF_1) (25, 32). Usunięcie bowiem tego czynnika przez przemywanie roztworem EDTA umożliwiło wystąpienie bezpośredniej aglutynacji układu lamellarnego po wprowadzeniu przeciwciał przeciwko reduktazie.

Ostatnio jednak opisano warunki (32), w których zachodziła bezpośrednia aglutynacja układów lamellarnych (bez konieczności wcześniejszego usunięcia CF_1) po dodaniu przeciwciał specyficznych w stosunku do reduktazy ferredoksyna : NADP^+ . Aglutynacja występowała po napęcznieniu tylakoidów co prowadziło do rozciągania błon lub po rozpadzie struktur granowych. W takich przypadkach odpowiednie przeciwciała miały dostęp do całej ilości reduktazy, i redukcja NADP^+ była całkowicie zahamowana. Dodanie MgCl_2 lub metyloaminy prowadziło do odtworzenia struktur granowych i zmniejszenia stopnia zahamowania redukcji NADP^+ . Wynika z tego, że w normalnych warunkach przeciwciała te nie dostają się w obręb lamelli granowych, a dostępne są dla nich jedynie cząsteczki reduktazy w lamellach międzygranowych i zewnętrznych odcinkach gran. Do tego samego wniosku doprowadziły badania mutantów posiadających układ la-

mellarny zredukowany w różnym stopniu. Wprowadzenie $MgCl_2$ lub metyloaminy do chloroplastów z wydłużonymi odcinkami lamelli międzygraniowych i ze znacznie zredukowaną liczbą gran powstało mniejsze obniżenie stopnia zahamowania redukcji $NADP^+$ pod wpływem specyficznych przeciwciał niż w przypadku normalnych chloroplastów.



Ryc. 3. Schemat aglutynacji błon tylakoidów (25, zmodyfikowany). A. pośredniej (test podwójnych przeciwciał); B. mieszanej antygenowo.

Otrzymano również antysurowicę przeciwko czynnikowi sprzęgającemu fotofosforylację (CF_1), która charakteryzowała się względnie małą specyficznością. Antysurowica przeciwko CF_1 z liści szpinaku była aktywna także w stosunku do CF_1 z grochu oraz z *Valerianella locusta* L (34). Aglutynacja nie wystąpiła po wprowadzeniu antysurowicy do zawiesiny chloroplastów nieuszkodzonych, co może sugerować, że czynnik sprzęgający nie występuje w osłonce chloroplastu.

Stosując metody immunologiczne i mikroskopię elektronową (34) usiłowano określić sposób reakcji CF_1 ze specyficznym przeciwciałem. Stosując technikę kriorytowania (ang. *freeze etching*) przygotowano preparaty tylakoidów, których zewnętrzne powierzchnie były pokryte cząstkami białkowymi o średnicy 14 i 10nm (Ryc. 4).

Jeżeli wcześniej potraktowano chloroplasty surowicą anti- CF_1 , to duże cząstki (reprezentujące CF_1) agregowały, natomiast mniejsze nie zmieniały swego położenia (Ryc. 5).

Obserwowano prostą zależność pomiędzy stężeniem specyficznej antysurowicy a wielkością agregatów. Wydaje się, że agregacja występuje na skutek ruchów większych globul w płaszczyźnie błony. W normalnej błonie

nie cząstki białkowe o średnicy 14nm są oddalone od siebie na odległość większą niż wynosi długość cząsteczki przeciwciała. Po wprowadzeniu surowicy immunizowanej cząsteczka przeciwciała łączy się najpierw jednym końcem z większą cząstką. Kompleks taki „pływając” w warstwie lipidowej



Ryc. 4. Obraz powierzchni błony tylakoidu uzyskany w mikroskopie elektronowym (preparat przygotowany metodą kriorytowania).

Widać równomiernie rozmieszczone cząstki o średnicy 14 (L) i 10 (S) nm (34).

napotyka następną cząsteczkę CF_1 , która przyłącza się do drugiego końca specyficznego przeciwciała i w ten sposób zachodzi agregacja co prowadzi do zahamowania fosforylacji. Zahamowanie fosforylacji można znieść przez preinkubację antysurowicy z preparatem zawierającym czynnik sprzęgający (35). Występowanie ruchów cząstek białkowych w płaszczyźnie błony potwierdzają także inne badania (36).

Przy pomocy specyficznych przeciwciał badano również usytuowanie karboksylazy rybulozodwufosforanu (37). Przeciwciała przeciwko temu białku aglutynowały izolowane układy lamellarne, hamowały fosforylację i aktywność karboksylazy rybulozodwufosforanu. Aglutynacja nie występowała po przemyciu lamelli roztworem EDTA. Autorzy wnioskują, że zarówno czynnik sprzęgający jak i karboksylaza rybulozodwufosforanu (ta jej część która występuje w połączeniu z błonami) rozmieszczone są na zewnętrznej powierzchni tylakoidów.

W komórkach *Euglena gracilis* elektrony przenoszone są na P 700 bezpośrednio z cytochromu 552 (38). Przeciwciała przeciwko temu cytochromowi nie powodowały aglutynacji chloroplastów i nie hamowały przepływu elektronów z wody na NADP^+ (39). Wynika z tego, że w normalnych warunkach cytochrom 552, podobnie jak plastocyanina, jest niedostępny dla



Ryc. 5. Obraz powierzchni błony tylakoidu po potraktowaniu chloroplastów anty-surowicą przeciwko CF_1 .

Widoczna agregacja większych cząsteczek (34).

przeciwciał. Reakcja przeciwciał—cytochrom 552 zachodziła dopiero po otwarciu tylakoidów przez potraktowanie ich roztworem cholanu. Fakty te wskazują, że cytochrom 552 znajduje się po wewnętrznej stronie błony lub mieści się w wodnej przestrzeni wnętrza tylakoidu.

Natomiast P 700 jest dostępny dla specyficznych przeciwciał, gdyż pod ich wpływem zachodzi aglutynacja fragmentów lamelli i hamowanie utleniania askorbinianu w obecności metylowiologenu (26).

Metody immunologiczne przyczyniły się również do wykrycia w błonach tylakoidów jeszcze innych, dotychczas niezidentyfikowanych przenośników elektronów. Otrzymano anty-surowicę, która reagowała z pierwotnym akceptorem elektronów PS I (40). Dodanie reduktazy ferredoksyna : NADP^+ lub CF_1 nie przywracało aktywności PS I. Otrzymane przeciwciała nie były więc wynikiem odpowiedzi immunologicznej na reduktazę ferredoksyna : NADP^+ lub CF_1 . Wyekstrahowano z chloroplastów czynnik przypusz-

czalnie identyczny z opisaną przez Yocum i San Pietro (41) substancją redukującą ferredoksynę, który przywracał wspomnianą aktywność (23, 40). Otrzymano również przeciwciała, z których jedno reagowało z apoenzymem, a drugie z grupą prostetyczną tego czynnika.

II. Rozmieszczenie składników niebiałkowych w tylakoidach

Metody immunologiczne wykorzystuje się również do badania rozmieszczenia związków niebiałkowych w błonach tylakoidów. Otrzymano na przykład antysurowicę przeciwko luteinie i plastochinonowi (42), oraz przeciwko neoksantynie (43). Po wprowadzeniu antysurowic przeciwko luteinie i plastochinonowi do pozbawionych stromy chloroplastów nie zauważono aglutynacji. Aglutynacja zachodziła natomiast po dodaniu do zawiesiny chloroplastów króliczej anti- γ -globuliny typu IgG (test podwójnych przeciwciał). Częściowe rozłożenie białek znajdujących się na powierzchni lamelli przez subtylizynę prowadziło również do prostej aglutynacji struktur lamellarnych po dodaniu specyficznych dla tego związku przeciwciał. Antysurowica przeciwko neoksantynie zachowywała zdolności aglutynacyjne w stosunku do chloroplastów napęczniałych, natomiast nie wykazywała ich w przypadku chloroplastów, które utraciły zdolność pęcznienia. Obserwacje te wskazują, że immunoglobuliny przeciwko luteinie, plastochinonowi i neoksantynie są wiązane na powierzchni lamelli; związki te znajdują się przypuszczalnie w zagłębieniach lamelli podobnie jak reduktaza ferredoksyna : NADP^+ .

Stwierdzono również, że antysurowica przeciwko luteinie hamowała transport elektronów na etapie pomiędzy wodą a miejscem redukcji żelazicyjanku, natomiast nie wpływała na reakcje oksydoredukcyjne na etapie pomiędzy miejscem donorowym dla elektronów z DPC, a miejscem redukcji żelazicyjanku (Ryc. 1). Przyczyna zahamowania transportu elektronów przez antysurowicę przeciwko luteinie nie jest jasna. Należałoby oczekiwać, że związanie pewnych karotenoidów doprowadzi w pierwszym rzędzie do zmniejszenia efektywności przekazywania energii na chlorofil a_{11} . Trzeba jeszcze podkreślić, że dodanie przeciwciał przeciwko luteinie nie wpływało na aktywność PS I, tzn. nie hamowało cyklicznej fosforylacji i redukcji NADP^+ w obecności egzogennych donorów elektronów. Antysurowica przeciwko neoksantynie hamowała fosforylację niecykliczną i sprzężony z nią transport elektronów.

Antysurowica przeciwko plastochinonowi hamowała redukcję żelazicyjanku niezależnie od tego czy donorem elektronów była woda czy DCP, natomiast nie wpływała na aktywność I układu fotosyntezy.

Szczepiąc króliki zemulgowanym roztworem chlorofilu a stwierdzono, że jeden spośród ośmiu zaszczeplonych osobników wytworzył przeciwciała przeciwko temu barwnikowi (44). Przeciwciała te charakteryzowały się du-

żą specyficznością, gdyż nie stwierdzono ich reakcji z glikolipidami, mono- i dwugalaktozyłodwuglicerydami, fosfatydyloglicerolem, fosfatydylocholiną, oraz z witaminą K₁ i fitolem. Zachodziła jedynie reakcja z chlorofilem b. Traktowanie struktur lamellarnych taką antysurowicą prowadziło do zahamowania w około 22% reakcji Hilla (45). Otrzymane wyniki wskazują, że przynajmniej część cząsteczek chlorofilu należącego do PS II jest dostępna dla przeciwciał, a więc musi znajdować się na powierzchni lamelli (46). Jednakże przeciwciała przeciwko chlorofilowi nie hamowały redukcji NADP⁺ w obecności DCIP i askorbinianu, czyli antysurowica chlorofilowa nie działała na chlorofil należący do PS I. Chlorofil wchodzący w skład PS I jest albo niedostępny dla przeciwciał, albo reakcja przeciwciała — chlorofil w obrębie PS I nie wpływa na zmiany natężenia transportu elektronów.

Rozmieszczenie niektórych tłuszczowców w obrębie błon tylakoidów było również przedmiotem badań immunologicznych. Otrzymano specyficzną antysurowicę przeciwko monogalaktozyłodwuglicerydom przez wstrzyknięcie królikowi tego antygeny zaadsorbowanego na metylowanej albuminie z surowicy wołu (47). Antysurowica ta powodowała bezpośrednią aglutynację chloroplastów pozbawionych stromy, natomiast nie aglutynowała chloroplastów klasy I (posiadających błonę zewnętrzną). Wyniki te prowadzą do wniosku, że przynajmniej część monogalaktozyłodwuglicerydów występuje na powierzchni tylakoidów. Natomiast ilościowe badania nad wiązaniem się przeciwciał przeciwko różnym lipidom z układem lamellarnym *Antirrhinum majus* wykazały, że większość cząsteczek monogalaktozyłodwuglicerydów znajduje się na wewnętrznej powierzchni tylakoidów (48).

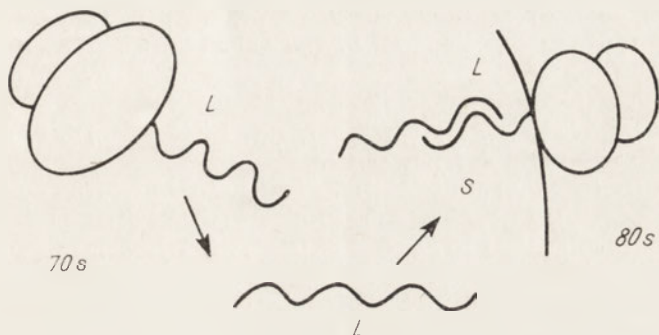
W podobny sposób otrzymano również przeciwciała przeciwko fosfatydyloglicerolowi (49). Przeciwciała te, po dodaniu do pozbawionych stromy chloroplastów *Antirrhinum majus* i *Nicotiana tabacum*, nie powodowały prostej aglutynacji. Stosując test podwójnych przeciwciał wykazano jednak, że na powierzchni lamelli zachodziło wiązanie tych przeciwciał. Wcześniejsze traktowanie błon tylakoidów preteazami prowadziło do bezpośredniej aglutynacji. Wyniki te wskazują, że determinanty antygenowe fosfatydyloglicerolu występują na powierzchni błon tylakoidów w zagłębieniach.

Podobne wyniki otrzymano badając rozmieszczenie sulfolipidów. Na podstawie przeprowadzonych badań, należy przyjąć, że sulfolipidy znajdują się we wnętrzu błon tylakoidów, ale fragmenty cząsteczek są skierowane na zewnątrz i dlatego są one dostępne dla przeciwciał (50).

Badano także immunofluorescencję galaktozyłodwuglicerydów w błonach chloroplastów i wykazano, że związki te występują zarówno w błonach tylakoidów jak i w osłonce chloroplastu (51, 52). W osłonce są one równomiernie rozmieszczone na powierzchni całej błony, natomiast w bło-

nach tylakoidów tworzą wyraźne „wysepki”; w obu wypadkach reszta galaktozy jest skierowana na zewnątrz.

Należy podkreślić, że metody immunologiczne można stosować do badania niektórych aspektów powstawania aparatu fotosyntetyzującego. Na przykład badając warunki powstawania precipitatów przeciwciała—antygen próbowano określić rolę rybosomów 80S i 70S w powstawaniu różnych podjednostek karboksylazy rybulozodwufosforanu w układzie *in vitro* (53).



Ryc. 6. Schemat przedstawiający tworzenie cząsteczki karboksylazy dwufosforybulozy.

L — duża podjednostka, S — mała podjednostka (53, zmodyfikowany).

Uzyskano przeciwciała przeciwko dużym lub małym podjednostkom enzymu i następnie śledzono powstawanie precipitatów na skutek reakcji tych przeciwciał z łańcuchami polipeptydowymi (znakowanymi ^3H puromycyną) będącymi jeszcze w kompleksie z rybosomami 70S lub 80S. W ten sposób zdołano wykazać, że duże podjednostki powstają na rybosomach chloroplastów 70S, małe zaś na rybosomach 80S związanych z błonami. Łączenie się tych podjednostek zachodzić ma w warunkach, gdy mniejsza z nich jest jeszcze przyczepiona do rybosomu (Ryc. 6).

III. Uwagi końcowe

Metody immunologiczne pozwalają w znacznym stopniu uzupełnić dotąd fragmentaryczne dane o sposobie rozmieszczenia składników chemicznych w błonach tylakoidów.

Wyniki badań, które uzyskano tymi metodami wskazują na asymetryczną strukturę i dynamiczny charakter błon tylakoidów. Potwierdzają także słuszność głównych założeń modelu K i r k a, a nawet umożliwiają wprowadzenie pewnych uzupełnień do tego modelu, zwłaszcza dotyczących rozmieszczenia poszczególnych przenośników elektronów.

PISMIENICTWO

1. Menke W., (1961), *Z. Naturforsch.*, **16b**, 334—336.
2. Menke W., (1962), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **13**, 27—44.
3. Menke W., (1966), w *Biochemistry of Chloroplasts*, red. Goodwin T. W., t. 1, str. 3—18, Academic Press, London and New York.
4. Więckowski S., (1975), *Post. Biol. Kom.*, **2**, 147—164.
5. Bishop D. G., (1974), *Photochem. Photobiol.*, **20**, 281—299.
6. Goedheer J. C., (1966), w *Biochemistry of Chloroplasts*, red. Goodwin T. W., t. 1, str. 75—82, Academic Press, London and New York.
7. Junge W., Eckhof A., (1973), *FEBS Letters*, **36**, 207—212.
8. Brenton J., Michel-Villaz M., Paillot G., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 42—56.
9. Kirk J. T. O., (1971), *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 161—196.
10. Branton D., (1968), w *Photophysiology*, red. Giese A. C., t. 3, str. 197—224, Academic Press, London and New York.
11. Branton D., (1969), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **20**, 209—238.
12. Branton D., Park R. B., (1967), *J. Ultrastruct. Res.*, **19**, 283—305.
13. Rivas E., Luzzati V., (1960), *J. Mol. Biol.*, **41**, 261—275.
14. Kreutz W., (1966), *Ber. Deut. Bot. Ges.*, **79**, 34—43.
15. Kreutz W., (1966), w *Biochemistry of Chloroplasts*, red. Goodwin T. W., t. 1, str. 83—88, Academic Press, London and New York.
16. Briantais J. M., Picaud M., (1972), *FEBS Letters*, **20**, 100—104.
17. Zilinskas Braun B., Govindjee, (1972), *FEBS Letters*, **25**, 143—146.
18. Koenig F., Menke W., Craubner H., Schmid G. H., Radunz A., (1972), *Z. Naturforsch.*, **27b**, 1225—1238.
19. Zilinskas Braun B., Govindjee (1974), *Plant Science Letters*, **3**, 219—227.
20. Menke W., (1973), *Physiol. Veg.*, **11**, 231—238.
21. Menke W., Koenig F., Radunz A., Schmid G. H., (1975), *FEBS Letters*, **49**, 372—375.
22. Hiedemann-Van Wyk D., Kannangara C. G., (1971), *Z. Naturforsch.*, **26b**, 46—50.
23. Regitz G., Oettmeier W., (1972), w IInd International Congress on Photosynthesis, Stresa 1971, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 1, str. 499—506, Dr. W. Junk N. V. Publishers, The Hague.
24. Berzborn R. J., (1968), *Z. Naturforsch.*, **23b**, 1096—1104.
25. Berzborn R. J., (1969), w *Progress in Photosynthesis Research*, red. Metzner H., t. 1, str. 106—114, International Union of Biological Sciences, Tubingen.
26. Racker E., Hauska G. A., Lien S., Berzborn R. J., Nelson N., (1972), w IInd International Congress on Photosynthesis, Stresa 1971, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 2, str. 1097—1113, Dr. W. Junk N. V. Publishers, The Hague.
27. Hauska G. A., McCarty R. E., Berzborn R. J., Racker E., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3524—3531.
28. Schmid G. H., Radunz A., Menke W., (1975), *Z. Naturforsch.*, **30c**, 201—212.
29. Tel-Or E., Avron M., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **47**, 417—421.
30. Tel-Or E., Fuchs S., Avron M., (1973), *FEBS Letters*, **29**, 156—158.
31. Valentine R. C., Green N. M., (1967), *J. Mol. Biol.*, **27**, 615—617.
32. Berzborn R. J., (1969), *Z. Naturforsch.*, **24b**, 436—446.
33. Schmid G. H., Radunz A., (1974), *Z. Naturforsch.*, **29c**, 384—381.

34. Berzborn R. J., Kopp F., Muhlethaler K., (1974), *Z. Naturforsch.*, **29c**, 694—699.
35. Berzborn R. J., Menke W., Trebst A., Pistorius E., (1966), *Z. Naturforsch.*, **21b**, 1057—1059.
36. Ojakian G. K., Satir P., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2052—2056.
37. Kannangara C. G., Van Wyk D., Menke W., (1970), *Z. Naturforsch.*, **25b**, 613—618.
38. Wildner G. F., Hauska G., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 127—135.
39. Wildner G. F., Hauska G., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 136—144.
40. Regitz G., Berzborn R. J., Trebst A., (1970), *Planta*, **91**, 8—17.
41. Yocum C. F., San Pietro A., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.* **140**, 152—160.
42. Radunz A., Schmid G. H., (1973), *Z. Naturforsch.*, **28c**, 36—44.
43. Radunz A., Schmid G. H., (1975), *Z. Naturforsch.*, **30c**, 622—627.
44. Radunz A., (1972), w IInd International Congress on Photosynthesis, Stresa 1971, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 2, str. 1613—1618, Dr. W. Junk N. V. Publishers, The Hague.
45. Schmid G. H., (1972), w IInd International Congress on Photosynthesis, Stresa 1971, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 2., str. 1603—1612, Dr. W. Junk N. V. Publishers, The Hague.
46. Radunz A., Schmid G. H., Menke W., (1971), *Z. Naturforsch.*, **26b**, 435—446.
47. Radunz A., (1972), *Z. Naturforsch.*, **27b**, 822—826.
48. Radunz A., (1975), *Z. Naturforsch.*, **30c**, 484—488.
49. Radunz A., (1971), *Z. Naturforsch.*, **26b**, 916—919.
50. Radunz A., Berzborn R. J., (1970), *Z. Naturforsch.*, **25b**, 412—419.
51. Billecocq A., Douce R., Faure M., (1972), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **275**, 1135—1137.
52. Billecocq A., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **352**, 245—251.
53. Gooding L. R., Roy H., Jagendorf A. T., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 324—335.

UWAGA P.T. AUTORZY

OD DRUGIEGO ZESZYTU 23 TOMU „POSTĘPÓW BIOCHEMII” WPROWADZAMY ZWYCZAJ ROZPOCZYNANIA ARTYKUŁU OD RZECZOWEGO SPISU TREŚCI.

SPIS WINIEN ZAPOWIADAĆ W SPOSÓB MERYTORYCZNY W JĘ-
ZYKU POLSKIM I ANGIELSKIM TREŚĆ ARTYKUŁU POCZYNAJĄC
OD WSTĘPU, POPRZEZ RZECZOWE TYTUŁY ROZDZIAŁÓW I POD-
ROZDZIAŁÓW, AŻ PO WNIOSKI KOŃCOWE.

REDAKCJA

EWA DAHLIG *)

Różne formy molekularne niektórych enzymów metabolizmu węglowodanów w nowotworach wątroby, wątrobie regenerującej i tkankach płodowych

Multiple Molecular Forms of Some Enzymes of Carbohydrates Metabolism in Livers Tumours, Regenerating Liver and Fetal Tissues.

O nieprawidłowości ekspresji genetycznej w komórkach nowotworowych świadczą między innymi (1—3): wytwarzanie hormonów polipeptydowych przez nowotwory pochodzenia niegruczolowego, pojawienie się w nowotworach antygenów, charakterystycznych również dla tkanek płodowych oraz zmiany w składzie izoenzymów szeregu enzymów.

Należy podkreślić, że wiele z opisanych w artykułach przeglądowych izoenzymów (3—7) stanowi raczej różne formy molekularne. Nie wiadomo bowiem, czy różnią się one zdeterminowaną genetycznie strukturą I-rzędową, co stanowi warunek sklasyfikowania ich jako izoenzymy.

Do badań nad formami molekularnymi enzymów w nowotworach często stosuje się jako model indukowane chemicznymi karcynogenami pierwotne i przeszczepialne wątrobiaki szczura (8—10). Chociaż nazwano je początkowo wątrobiakami o „minimalnym odchyleniu” od zdrowej tkanki wątrobowej (11), przedstawiają one szerokie spektrum zróżnicowania i szybkości wzrostu. Na podstawie kryteriów histologicznych — uwzględniając zmiany w morfologii, liczbie chromosomów i kariotypie (12) — wyróżnia się wątrobiaki wysoko, dobrze i słabo zróżnicowane (1, 3, 13, 14). Wykazano równoległość między stopniem zróżnicowania wątrobiaków a szybkością ich wzrostu (1, 3, 14) oraz między szybkością wzrostu a poziomem aktywności wielu enzymów (15).

Hipoteza Warburga (16) wskazująca na wysoką aerobową glikolizę jako cechę swoistą komórki nowotworowej wpłynęła na rozwój badań nad enzymami metabolizmu węglowodanów. Stwierdzono jednak, że wysoko

*) Mgr, Zakład Biochemii, Instytut Biofarmacji, Akademia Medyczna, ul. Bana-cha 1, 02—097 Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: 3'Me4-DAB — 3'metylo-4-dwumetyloaminoazobenzen; FDP — fruktozo-1,6-dwufosforan; F1P — fruktozo-1-fosforan; PEP — fosfoenolopirogronian; pI — punkt izoelektryczny.

oraz dobrze zróżnicowane, wolno rosnące wątrobiaki — w przeciwieństwie do słabo zróżnicowanych i szybko rosnących — charakteryzują się niewielką aktywnością glikolityczną (17, 18). Stąd obecnie intensywną aerobową glikolizę traktuje się jako przejaw odróżnicowania, a nie pierwotnej transformacji nowotworowej (1, 14).

W artykule przedstawiono dane dotyczące form molekularnych heksokinazy, aldolazy, kinazy pirogronianowej, fosfofruktokinazy, fosfatazy fruktozo-1,6-dwufosforanowej, fosforylasy i syntetazy glikogenowej z nowotworów wątroby oraz ze zdrowych tkanek o wzmożonej proliferacji, takich jak tkanki płodowe, czy regenerująca wątroba.

I. Heksokinaza

W wątrobie ssaków znajdują się dwa enzymy fosforylujące glukozę, a mianowicie heksokinaza (E.C. 2.7.1.1) i glukokinaza (E.C. 2.7.1.2).

Heksokinaza wykazuje powinowactwo do wielu heksoz, ma niską K_m dla glukozy = 0,01mM (19). Metodą elektroforezy w żelu skrobiowym wykazano heterogenność heksokinazy i różne jej formy oznaczono I—IV w miarę wzrastającej ruchliwości w kierunku anody. Formą IV, dominującą w wątrobie jest glukokinaza (20). Formy I—III heksokinazy mają podobną masę cząsteczkową, optimum pH, K_m dla fruktozy. Różnią się natomiast nieco K_m dla glukozy, K_i dla glukozo-6-fosforanu, termostabilnością, podatnością na działanie czynników proteolitycznych i stopniem inhibicji substratowej (21). Aktywność heksokinazy w wątrobie szczura, w przeciwieństwie do glukokinazy, nie zależy zasadniczo od warunków dietetycznych zwierzęcia i wpływu hormonów (19,22,23). Obserwowano jednak spadek aktywności formy II w wątrobie szczurów głodzonych oraz z cukrzycą (24—27).

Uważa się, że glukokinaza, charakterystyczna dla wątroby, gra istotną rolę regulacyjną w wykorzystaniu glukozy. Enzym ten cechuje wysoka K_m dla glukozy = 10mM (19). Aktywność glukokinazy maleje w wątrobie szczurów głodzonych lub z cukrzycą, a wraca do normy po podaniu zwierzętom glukozy lub insuliny (22—24,28,29). Stwierdzono, że wzrost aktywności tego enzymu w powyższych warunkach wynika z jego biosyntezy *de novo* (19).

Forma I heksokinazy dominuje w mózgu i nerce, II w mięśniu szkieletowym, a IV, czyli glukokinaza, w wątrobie (20,21,30). Mimo częstego określania omawianych form jako izoenzymy, nie jest to jak dotąd udowodnione (31). Masa cząsteczkowa glukokinazy równa 48 000, wobec masy cząsteczkowej heksokinazy równej 96 000 oraz podobieństwo składu aminokwasowego obu enzymów (32—34) może wskazywać na powstanie heksokinaz I—III przez podwojenie genu glukokinazy (34).

I-1. Tkanki płodowe

W wątrobie płodowej stwierdzono brak glukokinazy (35—38) lub bardzo małą jej aktywność (14,39).

Jako formy dominujące w wątrobie płodowej obserwuje się niespecyficzne heksokinazy I,II,III (14), I i Ia (38,40) lub II (39), a nie glukokinazę, charakterystyczny enzym dojrzałej wątroby. W różnych tkankach płodowych szczura i człowieka wykazano przewagę formy I heksokinazy (29,40). Ostatnio stwierdzono, że podczas rozwoju ontogenetycznego pojawiają się w wątrobie szczura kolejno heksokinazy I,II,III i IV (glukokinaza) (41).

I-2. Wątroba regenerująca

Dane dotyczące aktywności różnych form molekularnych heksokinazy w wątrobie regenerującej po częściowej hepatektomii są niejednoznaczne. Donoszono o obniżeniu aktywności glukokinazy (23,24,35,39,42) i wzroście aktywności heksokinazy (39,42) w wątrobie regenerującej. Wielu jednak autorów nie stwierdziło w wątrobie regenerującej wyraźnych zmian form molekularnych heksokinazy (14,36—38).

I-3. Wątrobiaki

W dobrze zróżnicowanych wątrobiakach wykazano spadek aktywności glukokinazy i wzrost aktywności heksokinazy w porównaniu z aktywnością tych enzymów w zdrowej wątrobie (18,21,23,35,37). Badania porównawcze ujawniły równoległość między stopniem zróżnicowania wątrobiaków a rodzajem znajdujących w nich form molekularnych heksokinazy (Tabela 1).

W wątrobiaku Morrisa 9618A, wysoko zróżnicowanym i bardzo wolno rosnącym, dominowała glukokinaza, podobnie jak w wątrobie. W wątrobiaku Novikoffa, słabo zróżnicowanym i szybko rosnącym, aktywność heksokinazy była kilkadziesiątkrotnie wyższa niż w wątrobie z przewagą form II i III przy prawie zupełnym zaniku aktywności glukokinazy. Te zmiany rodzaju form molekularnych wynikają prawdopodobnie z postępującego odróżnicowania, a nie z pierwotnej transformacji nowotworowej, o czym świadczy duża aktywność glukokinazy w wysoko zróżnicowanym wątrobiaku. Jednocześnie nie stwierdzono całkowitego zaniku aktywności glukokinazy nawet w słabo zróżnicowanym wątrobiaku, co może wskazywać na blokadę ekspresji, a nie na delecję odpowiednich genów strukturalnych (14).

W pierwotnym raku wątroby człowieka również wykazano spadek aktywności glukokinazy (44), któremu towarzyszył wzrost aktywności heksokinazy I (44, 45).

Formy molekularne heksokinazy w wątrobiakach szczura

Tabela 1

źródło enzymu	metody	formy molekularne	forma dominująca	piśmiennictwo
wątrobiaki wysoko zróżnicowane Morrisa 9618 A	elektroforeza w żelu skrobiowym, chromatografia na kolumnie z DEAE-celulozy	I, II, III, IV	IV	14
wątrobiaki dobrze zróżnicowane Morrisa 7800, 7777	elektroforeza w żelu skrobiowym	I, II, III	III	38
7800, 7794B	elektroforeza w żelu skrobiowym, chromatografia na kolumnie z DEAE-celulozy	I, II, III, IV	II, III	14
7316A, 7793	elektroforeza na paskach z acetylocelulozy	I, II, III, IV	II	39
wątrobiaki słabo zróżnicowane Morrisa 3924A Novikoffa	elektroforeza w żelu skrobiowym, chromatografia na kolumnie z DEAE-celulozy	I, II, III, IV	II, III	14
Novikoffa	elektroforeza w żelu skrobiowym	I, II, III, IV	II	43
Yoshida AH 7974 AH 127	elektroforeza na paskach z acetylocelulozy.	I, II	II	39

II. Aldolaza

W tkankach ssaków występują trzy izoenzymy aldolazy fruktozo-dwufosforanowej (E.C. 4.1.2.13) — aldolaza A (mięśniowa), B (wątrobowa) i C (mózgowa). Charakteryzują się one budową tetrameryczną (46—52), podobieństwem struktury centrum aktywnego (48, 50, 51, 53, 54) i mechanizmu reakcji enzymatycznej (51, 55). Oprócz homotetramerów A_4 , B_4 i C_4 występują aktywne formy hybrydowe AB (tj. A_1B_3 , A_2B_2 , A_3B_1), AC i BC. *In vivo* znajdują się głównie hybrydy AB i AC, stanowiące wynik rekombinacji podjednostek. Wykryto również t.zw. mikroheterogenność w obrębie podjednostek aldolazy A (52,56—58) i aldolazy C(59). Pełną pierwszorzędową strukturę podjednostek aldolazy A podali La i i wsp. (60—62), potwierdzając poprzednie wyniki (63) i wykazując, że jedyną różnicą między

podjednostkami wchodzącymi w skład homotetrameru A_4 jest występowanie asparaginy w podjednostce α , a asparaginianu w podjednostce β jako czwartej reszty aminokwasowej od końca $-\text{COOH}$.

Najczęściej przyjmuje się następujące kryteria odróżniania aldolaz:

- specyficzność substratową wobec fruktozo-1,6-dwufosforanu (FDP) i fruktozo-1-fosforanu (F1P) (46, 64), t.zn. stosunek aktywności wobec FDP i F1P: stosunek ten równy 50 cechuje aldolazę A, równy 1 — aldolazę B, a równy 5—10 — aldolazę C;
- skład aminokwasowy (65—67) i ruchliwość elektroforetyczną: największa w kierunku anody charakteryzuje aldolazę C, najmniejsza — aldolazę B (46);
- własności immunologiczne (46, 64, 68);
- zmianę specyficzności substratowej aldolazy A, polegającą na obniżeniu stosunku aktywności wobec FDP i F1P do 1 pod wpływem trawienia karboksypeptydazą A (62, 69, 70);
- hamowanie przez ATP (71) i aldehyd 3-fosfoglicerynowy (72) aktywności aldolazy A.

Kochman (48) w artykule przeglądowym podał rozmieszczenie tkankowe aldolaz. W mięśni szkieletowym, sercu i śledzionie występuje tylko aldolaza A, w wątrobie i w nerce głównie aldolaza B wraz z małą aktywnością aldolazy A, zaś w mózgu aldolazy A, C oraz ich hybrydy.

II-1. Tkanki płodowe

W wątrobie płodowej szczura i człowieka wykazano obecność obok aldolazy B również aldolazy A, o czym świadczy wysoka wartość stosunku aktywności enzymu wobec FDP i F1P i dane elektroforetyczne (35, 42, 73—84). Badając ekstrakt z wątroby płodowej szczura stwierdzono, że stosunek aktywności wobec FDP i F1P wynosił 8,5 w 15 dniu życia płodowego, a 1,4 w 20—21 dniu (75).

W wątrobie płodowej wykryto również hybrydy AC stosując elektroforezę w żelu skrobiowym (73—76, 78, 79, 81, 85) i metody immunologiczne (74—76, 79). Doniesiono, że w wielu różnych tkankach ssaków w okresie płodowym występują aldolazy A i C (81). W mięśni płodowym szczura wykryto jednak tylko aldolazę A, a w nerce płodowej aldolazę B i hybrydy AB (83).

II-2. Wątroba regenerująca

W wątrobie regenerującej często nie stwierdzano zmian izoenzymów aldolazy w porównaniu z izoenzymami w dojrzałej wątrobie (35, 36, 78, 87). Niektórzy autorzy wykryli jednak w wątrobie regenerującej zwiększoną aktywność aldolazy A (83, 86, 88), a nawet aldolazę C (88). Wykazano także,

że zmiany obrazu izoenzymów aldolazy zależą od wieku zwierzęcia i rozmiarów hepatektomii. Po 24 i 48 godz. od częściowej (1/3 lub 2/3) hepatektomii w wątrobie 6 tygodniowych szczurów występowała aldolaza C i hybrydy AC, a w wątrobie 5 miesięcznych szczurów tylko hybrydy AC. Po 72 godzinach, gdy wątroba histologicznie nie różniła się już od wątroby kontrolnej, w wątrobie młodych szczurów, którym uprzednio wycięto 1/3 wątroby znajdowano aldolazę A i hybrydy AC, a po wycięciu 2/3 wątroby — hybrydy AC. W tym czasie obraz izoenzymów z wątroby 5 miesięcznych zwierząt nie odbiegał od normy (88).

Tabela 2

Izoenzymy aldolazy w wątrobiakach szczura

źródło enzymu	metody	izoenzymy	forma dominująca	piśmien- nictwo
wątrobiaki dobrze zróżnicowane H 122, H 175, H 189 (indukowane N-2-fluorenylodwuacetamidem)	immunologiczne, elektroforeza w żelu skrobiowym	B, AB	B	73, 74
indukowane 2-acetyloaminofluorenem Morrisa 7793	elektroforeza na paskach z acetylocelulozy immunologiczne, elektroforeza na paskach z acetylocelulozy	B, AB A, B, AB	AB	93, 94 90
7800 7777	elektroforeza na paskach z acetylocelulozy	A, AB	A	83
wątrobiaki słabo zróżnicowane Morrisa 3683 F	elektroforeza na paskach z acetylocelulozy	A, (A ₃ B ₁)	A	83
Yoshida AH 130	immunologiczne, elektroforeza na paskach z acetylocelulozy	A, AB	A	90
AH 143 A	immunologiczne, elektroforeza na paskach z acetylocelulozy, chromatografia na kolumnie z DEAE-celulozy	A, A ₃ C ₁	A	95
H 178 (indukowany N-2-fluorenylodwuacetamidem)	immunologiczne, elektroforeza w żelu skrobiowym.	A, AC, C	A	73, 74

II-3. Wątrobiaki

Schapiro i Payet (89) badając krew chorych z pierwotnym rakiem wątroby wykryli hyperaldolazemię. Ze względu na podwyższoną wartość stosunku aktywności aldolazy wobec FDP i F1P autorzy ci postulowali pojawienie się aldolazy typu mięśniowego. Wzrost stosunku aktywności aldolazy wobec FDP i F1P wykazano również w wątrobiakach człowieka (wartość tego stosunku równa 5,5), w wątrobie płodowej człowieka (wartość tego stosunku równa 2—3) oraz w doświadczalnym wątrobiaku Zajdela szczura (wartość tego stosunku równa 30). Na podstawie tych obserwacji sugerowano, że w nowotworze wątroby następuje represja syntezy aldolazy B i derepresja formy płodowej, aldolazy A (77). Tę hipotezę potwierdzono w dalszych badaniach. Zauważono paralelizm między stopniem odróżnicowania i szybkością wzrostu nowotworu a odchyleniem od obrazu izoenzymów charakteryzującego zdrową tkankę wątrobową (Tabela 2).

Aldolaza z dobrze zróżnicowanego wątrobiaka Morrisa 7793 jest prawie w tym samym stopniu hamowana przez antyaldolazę B (97%) i antyaldolazę A (84%), co wskazuje na występowanie hybrydowych cząsteczek AB oraz małych ilości form macierzystych A i B. Natomiast aldolazę ze słabo zróżnicowanego wysiękowego wątrobiaka Yoshida AH 130 antyaldolaza B hamuje tylko w 40%, zaś tylko aldolaza A całkowicie. Świadczy to o obecności w wątrobiaku Yoshida AH 130 aldolazy A i hybrydowych form AB, co potwierdzono też elektroforetycznie (90).

Wykazano, że ATP i surowica przeciwko aldolazie A (antyaldolaza A) hamowały zarówno enzymy z pierwotnego raka wątroby człowieka i z wątrobiaków szczura indukowanych 3'metylo-4-dwumetyloaminoazobenzemem (3'Me 4-DAB), jak i z wątroby płodowej (91, 92). W elektroforezie na paskach z acetylocelulozy aldolaza mięśniowa, płodowa i nowotworowa charakteryzowały się podobną ruchliwością (92).

Badając ekstrakty z wątroby szczura podczas karcynogenezy indukowanej 2-acetyloaminofluorenem stwierdzono zmiany stosunku aktywności wobec FDP i F1P oraz obrazu izoenzymów aldolazy. Po 5 miesiącach podawania karcynogenu z pokarmem zaobserwowano podwyższenie stosunku aktywności wobec FDP i F1P od 1 do 1,7 oraz obecność homotetramerów A_4 i B_4 na elektroforegramie. Hepatocyty w tym okresie charakteryzowały się słabą polimorfią. Po 9,5 miesiącach wartość stosunku wobec FDP i F1P wzrastała do 8, na elektroforegramie uwidocznił homotetramer A_4 i hybrydy AB, a homotetramer B_4 był już niewykrywalny. Jednocześnie wykazano zmiany histologiczne typowe dla wątrobiaka dobrze zróżnicowanego (93, 94).

W pewnych wątrobiakach, obok dominującej aldolazy A wykryto również aldolazę C, występującą w mózgu i wątrobie płodowej. W słabo zróżnicowanym wysiękowym wątrobiaku Yoshida AH 143 A szczura znaleziono aldolazę A i formę hybrydową A_3C_1 . Z ekstraktu z wątrobiaka uzyskano

dwie aktywne frakcje w wyniku chromatografii na kolumnie z DEAE-celulozy, podczas gdy z ekstraktu z mózgu szczura — pięć frakcji (A_4 , A_3C_1 , A_2C_2 , A_1C_3 , C_4). Do elucji stosowano bufor Tris-HCl o pH 8,6 zawierający FDP oraz liniowy gradient NaCl w tym samym buforze. Traktowanie poszczególnych frakcji antyaldolazą A pozwoliło wykazać, że pierwsza frakcja z ekstraktu z nowotworu zawiera aldolazę A, a druga formę hybrydową A_3C_1 . Wyniki te potwierdzono stosując elektroforezę ekstraktu i otrzymanych frakcji na paskach z acetylocelulozy (95). Również w słabo zróżnicowanym wątrobiaku H 178 oprócz dominującej aldolazy A wykryto hybrydowe formy AC i homotetramer C_4 (73).

Częściowo oczyszczona aldolaza C z wątrobiaka H 178 charakteryzuje się stosunkiem aktywności wobec FDP i F1P równym 5 i całkowitym hamowaniem aktywności przez antyaldolazę C z mózgu szczura. Wyniki te sugerują identyczność obu aldolaz (74, 79).

Badania oczyszczonych enzymów z szybko rosnących wątrobiaków dostarczyły przekonujących danych świadczących o dominacji aldolazy A. Wykazano, że aldolaza z wysiękowego wątrobiaka Novikoffa (58, 96) i z pierwotnego raka wątroby indukowanego 3'Me 4-DAB (97) jest identyczna z aldolazą A z mięśnia szkieletowego szczura (Tabela 3).

Tabela 3

Porównanie własności aldolazy z wątroby, mięśni i wątrobiaków szczura (58,96,97)

Źródło enzymu	masa cząsteczkowa	stosunek aktywności wobec FDP i F1P	hamowanie przez ATP		hamowanie aldehydem 3-P-glicerynowym	hamowanie an-tysurowicą A(%)	pI
			%	K_i (mM)			
wątroba (aldolaza B)	160 000	1	5	1	—	4	10,1
mięsień (aldolaza A)	160 000	45 (97); 55 (58)	64	0,4	+	98	9,1—9,7
wątrobiak indukowany 3'Me 4-DAB	160 000	44	61			95	9,1—9,7
wątrobiak Novikoffa	160 000	54		0,7	+		

III. Kinaza pirogronianowa

W tkankach ssaków występują trzy formy molekularne kinazy pirogronianowej (E.C. 2.7.1.40) oznaczane najczęściej jako L, M_1 , M_2 (98, 99), L, M, K (83, 100), I, II, III (101) lub A, B, C (102).

Forma L stanowi główną formę kinazy w wątrobie, a dodatkową w nerwie (98, 103). Podlega regulacji allosterycznej przez efekторы dodatnie — (fosfoenolopirogronian (PEP) i FDP) oraz ujemne (ATP i aminokwasy glu-

kogenne) (98, 100, 102, 103—110). W nieobecności aktywatora (FDP) otrzymuje się sigmoidalną krzywą zależności szybkości reakcji od stężenia substratu (PEP). W obecności FDP krzywa sigmoidalna przekształca się w hiperbolę. FDP ponadto całkowicie odwraca hamowanie aktywności przez alaninę. Forma L różni się od form M_1 i M_2 ruchliwością elektroforetyczną i właściwościami immunologicznymi (98, 99, 103, 104, 107, 111). Aktywność formy L kinazy pirogronianowej, podobnie jak glukokinazy (22—24, 28, 29), zależy od warunków dietetycznych zwierzęcia i wpływu hormonów (104, 111, 112).

W mięśniu szkieletowym, w sercu i mózgu występuje głównie forma M_1 . W odróżnieniu od formy L nie jest aktywowana przez FDP — krzywa zależności szybkości reakcji od stężenia PEP jest hiperboliczna niezależnie od obecności FDP (98, 103, 110, 113). Wykazano, że alanina (99, 100, 103, 108) w przeciwieństwie do fenyloalaniny (100, 114) nie hamuje aktywności formy M_1 .

Forma M_2 występuje w bardzo wielu tkankach tj. w grasicy, śledzionie, jelicie, żołądku, nerce, tkance tłuszczowej, jądrach i jajnikach. Niewielką aktywność formy M_2 wykryto w wątrobie, sercu i mózgu (98, 103). Forma M_2 , podobnie jak L, jest aktywowana przez FDP. W obecności FDP sigmoidalna krzywa zależności szybkości reakcji od stężenia substratu przekształca się w hiperbolę, a alanina i fenyloalanina są inhibitorami formy M_2 (98, 100, 103, 108, 114—116).

Wykazano budowę tetrameryczną form L i M_1 badając uzyskane *in vitro* hybrydy L— M_1 (110, 113, 117, 118). Ostatnio wykryto *in vivo* hybrydy M_2 —L i M_2 — M_1 (119).

III-1. Tkanki płodowe

Stwierdzono elektroforetycznie dominację formy M_2 nad formą L w płodowym mięśniu, wątrobie, mózgu (83, 98) i nerce (83) szczura. Stosując elektroforezę w żelu skrobiowym (42) i chromatografię na kolumnie z DEAE-celulozy (101) wykazano, że aktywność formy M_2 stanowi około 60% aktywności enzymu z wątroby szczura. Badając płody ludzkie zaobserwowano na elektroforegramie przewagę formy M_2 w nerce, płucach, sercu i mózgu. W płodowym mięśniu szkieletowym wykryto formę M_1 , a w wątrobie formy M_2 i L oraz dwie formy dodatkowe (120).

III-2. Wątroba regenerująca

Badając ekstrakty z wątroby regenerującej po częściowej hepatektomii stwierdzono, że wartość stosunku aktywności form $L/M_2 = 11$ (101), charakteryzująca kinazę pirogronianową z wątroby, zmniejszała się do 3 (101)

lub 1 (35, 42, 83). Maksymalny wzrost aktywności formy M_2 w wątrobie wraz ze spadkiem aktywności formy L wykazano w ekstraktach z wątroby 48—72 godz. po częściowej hepatektomii (42).

W izolowanych hepatocytach (komórkach parenchymalnych) regenerującej wątroby stwierdzono obecność zarówno formy L, charakterystycznej dla hepatocytów, jak i M_2 , znajdowanej zwykle w komórkach nie parenchymalnych. Brak hybrydów, zaobserwowany w elektroforezie homogenatu na paskach z acetylocelulozy i podczas chromatografii na kolumnie z DEAE-celulozy może wskazywać, że w danym hepatocycie geny decydujące o biosyntezie formy L i M_2 nie funkcjonują jednocześnie (121).

III-3. Wątrobiaki

Na podstawie badań elektroforetycznych, chromatograficznych, immunologicznych oraz wpływu diety zwierzęcia oraz hormonów na aktywność enzymu wykazano, że w szybko rosnącym wysiękowym wątrobiaku AH 130 szczura występuje kinaza pirogronianowa typu M (104, 111). Z elektroforegramów uzyskanych przez I m a m u r a i wsp. (98) wynika, że jest to prawdopodobnie forma M_2 . Przemawiają za tym również właściwości kinetyczne częściowo oczyszczonych (98) i oczyszczonych preparatów (99) kinazy pirogronianowej z wątrobiaka AH 130 z formami M_1 , M_2 i L tego enzymu (Tabela 4). Forma M_2 , podobnie jak L jest enzymem allosterycznym, lecz mniej wrażliwym na działanie efektorów.

Tabela 4

Porównanie własności kinazy pirogronianowej z wątroby, mięśni i wątrobiaka szczura (98,99).

źródło enzymu	masa cząsteczkowa	K_m PEP (mM)	Współczynnik Hilla (PEP)	aktywacja przez FDP	K_i (mM)			hamowanie antysuwrowicą M_2 (%)
					ATP	alani-na	fenyloalana	
wątroba (L)	208 000	0,83 (krzywa sigmoidalna)	2	+	0,15	1	5	0
wątroba (M_2)		0,4 (krzywa sigmoidalna)		+	3	0,45		100
mięsień (M_1)	250 000	0,075 (krzywa hiperboliczna)	1	—	3	—	—	85
wątrobiak Yoshida AH 130	216 000	0,4 (krzywa sigmoidalna)	1,4—1,5	+	2,5	0,6	0,5	100

Stwierdzono, że właściwości kinetyczne częściowo oczyszczonego enzymu z wątrobiaka Novikoffa (101) są identyczne z właściwościami formy M_2 z wątrobiaka AH 130 (98, 99). Badania elektroforetyczne wykazały, że M_2 jest jedyną formą kinazy pirogronianowej w pierwotnych wątrobiakach indukowanych 3'Me 4-DAB (98) i w wątrobiaku Morrisa 7777 (83) oraz dominującą w wątrobiaku Morrisa 7800 (83).

Podsumowując, przedstawione wyniki świadczą o występowaniu w wątrobiakach formy M_2 zamiast głównej wątrobowej formy L. Podobnie jak w przypadku heksokinazy i aldolazy stwierdzono, że zmiany form molekularnych kinazy pirogronianowej zależą od stopnia zróżnicowania wątrobiaków tj. wzrasta aktywność formy M_2 wraz z postępującym odróżnicowaniem nowotworów (Tabela 5).

Zwykle identyfikuje się formę M_2 w wątrobiakach z formą płodową kinazy pirogronianowej (98, 99, 101). Niektóre fakty doświadczalne wskazują

Tabela 5

Formy molekularne kinazy pirogronianowej w wątrobiakach szczura

źródło enzymu	metody	formy molekularne	forma dominująca	piśmiennictwo
wątrobiaki wysoko zróżnicowane Morrisa 9618 A	chromatografia na kolumnie z DEAE-celulozy	L, M_2	L(94%)	101
indukowane N-2-fluorenyloacetamidem	immunologiczne, elektroforeza w żelu poliakryloamidowym	L, M_2	L(70—80%)	126
wątrobiaki dobrze zróżnicowane Morrisa 9618 B	chromatografia na kolumnie z DEAE-celulozy	L, M_2	M_2 (68%)	101
indukowane N-2-fluorenyloacetamidem	immunologiczne, elektroforeza w żelu poliakryloamidowym	L, M_2	M_2 (60—74%)	126
indukowane 2-acetyloamino-fluorenem	kinetyczne, elektroforeza na paskach z acetylocelulozy	L, M_2 , (M_1)	M_2	94
wątrobiaki słabo zróżnicowane Novikoffa	chromatografia na kolumnie z DEAE-celulozy	L, M_2	M_2 (92%)	101
indukowane N-2-fluorenyloacetamidem	immunologiczne, elektroforeza w żelu poliakryloamidowym	L, M_2	M_2 (90%)	126

jednak na odmienne właściwości enzymu w tkankach nowotworowych. Stwierdzono, że częściowo oczyszczony enzym z szybko rosnącego wątrobiaka Morrisa 3924 A wykazuje hiperboliczną krzywą zależności szybkości reakcji od stężenia substratu (PEP), podobnie jak enzym z mięśni. W porównaniu z kinazą pirogronianową z wątroby i mięśni, enzym z nowotworu cechuje niestabilność i inna ruchliwość elektroforetyczna. Nie wiadomo jednak, czy jest to nowa forma enzymu, czy też forma M_2 wątrobowa (122).

Ostatnio wykryto dwie formy (L i M) kinazy pirogronianowej w wątrobiaku indukowanym N-nitrozodwuetuloaminą. Forma M wykazuje właściwości kinetyczne identyczne z właściwościami formy M_2 z wątroby. Natomiast forma L z nowotworu znacznie różni się kinetycznie od głównej formy wątrobowej. Tak więc, sigmoidalna krzywa zależności szybkości reakcji od stężenia substratu (PEP) nie przekształca się w hiperbolę pod wpływem wzrastających stężeń homotropowego efektora (PEP). Kinetyka reakcji nie zmienia się również w obecności FDP. ATP, w przeciwieństwie do alaniny, nie hamuje aktywności formy L z wątrobiaka (123). Identyfikacja tej interesującej formy, dokładne określenie metabolicznego znaczenia jej złożonych właściwości kinetycznych wymaga niewątpliwie dalszych badań.

W szybko rosnącym wątrobiaku Novikoffa *C r i s s* (125) stosując frakcjonowanie izoelektryczne znalazł formę o $pI = 7,28$, nie występującą ani w mięśniu, ani w wątrobie płodowej szczura. Jednak wyniki tego autora nie zostały potwierdzone (98, 101, 125, 126). Zakwestionowano ponadto identyczność formy M_2 z wątrobiaków z formą charakterystyczną dla wątroby płodowej, porównując enzym z pierwotnego raka wątroby i wątroby płodowej człowieka. Ustalono, że kinazę pirogronianową z nowotworu charakteryzuje krzywa niehiperboliczna zależności szybkości reakcji od stężenia PEP (współczynnik Hilla = 0,8), natomiast enzym z wątroby płodowej — krzywa hiperboliczna (127). Zarówno enzym płodowy, jak i nowotworowy mają jednak znacznie wyższe powinowactwa do PEP ($K_m = 0,16$ i $0,11$ mM) w porównaniu z formą L ($K_m = 0,75$ mM) (127).

IV. Fosfofruktokinaza

Donoszono o występowaniu jednej (128), dwóch (129) lub nawet pięciu (130) form molekularnych fosfofruktokinazy (E.C. 2.7.1.11) w wątrobie szczura. Stosując elektroforezę na paskach z acetylocelulozy wykazano zmiany rodzaju form molekularnych zależne od stopnia zróżnicowania wątrobiaka tj. zanik typowej formy wątrobowej (IV) w miarę postępującego odróżnicowania wraz z pojawieniem się form charakterystycznych dla mózgu (II), a także nerki, śledziony i erytrocytów (I, III) (128, 131). Inni autorzy nie stwierdzili różnic w formach molekularnych fosfofruktokinazy z wątrobiaków o różnej szybkości wzrostu (132). Ponadto wykazano identyczność dwóch form molekularnych fosfofruktokinazy z szybko rosnącego wątrobiaka 3924 A i wątroby szczura. Podstawę stanowiły wyniki badań

chromatograficznych, elektroforetycznych, kinetycznych (K_m , optimum pH, K_i dla inhibitorów — ATP i cytrynianu, K_a dla aktywatora—AMP) i immunologicznych ekstraktów i oczyszczonych preparatów (129, 133, 134). Stwierdzono znaczny wzrost aktywności fosfofruktokinazy w wątrobiakach (132—134), spowodowany prawdopodobnie wzmoczoną biosyntezą (133).

Zaobserwowano, że jedna z trzech form molekularnych fosfofruktokinazy wykrytych w wątrobiaku 3924 A, stanowiąca 20% całkowitej aktywności, różni się zarówno od enzymu wątrobowego i mięśniowego oraz nie występuje w wątrobie płodowej (134).

V. Fosfataza fruktozo-1,6-dwufosforanowa

Fosfataza fruktozo-1,6-dwufosforanowa (E.C. 3.1.3.11) z wątroby ssaków, wrażliwa na działanie hormonów (135) jest ważnym enzymem glukoneogenezy. Aktywność fosfatazy fruktozo-1,6-dwufosforanowej wykryto również w mięśniu szkieletowym (136). Funkcja tego enzymu w mięśniu jest niejasna (137). Enzym mięśniowy różni się od wątrobowego składem aminokwasów (138, 139) i właściwościami immunologicznymi (140). Jest on hamowany allosterycznie przez AMP w niskim stężeniu ($K_i = 1—2\mu\text{m}$) w przeciwieństwie do fosfatazy fruktozo-1,6-dwufosforanowej z wątroby ($K_i = 100—200\mu\text{m}$) (136, 141, 142).

W wolno rosnących wątrobiakach Morrisa 7316 A i 5123 D stwierdzono wysoką aktywność fosfatazy fruktozo-1,6-dwufosforanowej mało wrażliwej na AMP, podobnie jak w wątrobie. Natomiast w szybko rosnących wątrobiakach Yoshida i mięśniu szkieletowym wykazano bardzo niską aktywność enzymu silnie hamowanego przez AMP. Pojawienie się fosfatazy fruktozo-1,6-dwufosforanowej typu mięśniowego wraz z zanikiem „funkcjonalnej” formy wątrobowej może być konsekwencją odróżnicowania wątrobiaków (142).

VI. Fosforylaza glikogenowa

Sato i wsp. (143—146) stwierdzili na podstawie frakcjonowania izoelektrycznego fosforylazy glikogenowej (E.C. 2.4.1.1), że w wolno rosnących wątrobiakach szczura obok typowej dla wątroby formy o punkcie izoelektrycznym (pI) wynoszącym 5,9, pojawia się niewielka ilość formy o pI = 5,6. W szybko rosnących wątrobiakach forma o pI = 5,6 staje się dominująca. Wyniki te potwierdzono badając szereg wątrobiaków Morrisa i Yoshida z zastosowaniem elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (147, 148). Istotna różnica pomiędzy znalezioną formą fosforylazy w wątrobiakach a występującą w mięśniu dotyczy pI (143—146, 148). Enzymy te są zbliżone jednak pod względem optimum pH (144—146), silnej aktywacji przez AMP i braku aktywacji przez SO_4^{-2} (143—148). (Tabela 6).

Immunologicznie forma enzymu z nowotworu różni się zarówno od fosforylasy wątrobowej, jak i mięśniowej, wydaje się natomiast być identyczna z płodowym enzymem tych tkanek (143—148). Znalaziono ją również w wątrobie regenerującej. Obserwuje się ją jako jedyną w łożysku i płodzie. W rozwoju płodowym w mięśniu i wątrobie pojawiają się formy swoiste dla tych tkanek. W wielu innych dojrzałych tkankach (np. nerka, mózg) występuje forma płodowa fosforylasy (147, 148). Wykazano metodami immunologicznymi identyczność płodowej formy dominującej w dojrzałym mózgu z formą z łożyska, płodowych mięśni i wątroby i z oczyszczoną fosforylazą z szybko rosnącego wątrobiaka AH 130 (147).

Jest to więc kolejny przykład ekspresji płodowych białek w wątrobiakach towarzyszący ich postępującemu odróżnicowaniu.

Tabela 6

Porównanie właściwości fosforylasy glikogenowej (forma b) z wątroby, mięśni i wątrobiaków szczura (143—148)

źródło enzymu	frakcjonowanie izoelektryczne (pI)	forma dominująca (pI)	aktywacja przez SO_4^{2-}	aktywacja przez AMP	optimum pH
wątroba	5,9		+	±	7
wątroba płodowa	5,9; 5,6	5,9	+	±	
mięsień	6,1		—	+	5,5—7
mięsień płodowy			—	+	
wątrobiaki dobrze zróżnicowane					
Morrisa 9618 B			+		
20	5,9; 5,6	5,9	+		
66			+	—	
16			+	—	
wątrobiaki słabo zróżnicowane					
Morrisa 3924 A	5,6; 5,9	5,6	—	+	
Novikoffa	5,6; 5,9	5,6	—	+	5,5—7
Yoshida AH 130			—	+	
AH 7974			—	+	

VII. Syntetaza glikogenowa

Syntetaza glikogenowa (E.C. 2.4.1.11) z wątroby wykazuje optimum pH 8,5—8,8, natomiast enzym z mięśni 7—8,5. Przy pH 7,4 maleinian, PO_4^{---} i SO_4^{--} nie mają wpływu na aktywność syntetazy z mięśni, lecz hamują enzym z wątroby. Syntetaza ta z wolno rosnącego wątrobiaka Morrisa 66 zachowuje się jak enzym z wątroby, a z szybko rosnącego wątrobiaka Morrisa 3924 A — jak enzym z mięśni (144, 146). Stwierdzono również podobieństwo enzymu z mięśni i z dwóch szybko rosnących wysiękowych wątrobiaków Yoshida na podstawie optimum pH oraz wartości K_m dla UDP-glukozy (149).

Uwagi końcowe

Wykazano, że w miarę postępującego odróżnicowania i progresji wątrobiaków następuje utrata form molekularnych enzymów charakterystycznych dla wątroby i związanych z jej specyficznymi funkcjami. W wątrobiakach ulega upośledzeniu glukoneogeneza, a nasila się przemiana glikolityczna. Sprzyjają temu między innymi:

- wzrost aktywności heksokinaz I—III o wysokim powinowactwie wobec glukozy i spadek aktywności wątrobowej glukokinazy o niskim powinowactwie wobec glukozy;
- wzrost aktywności mięśniowej aldolazy A, rozkładającej głównie fruktozo-1,6-dwufosforan i spadek aktywności wątrobowej aldolazy B, czynnej w glukoneogenezie;
- spadek aktywności wątrobowej fosfatazy fruktozo-1,6-dwufosforanowej wraz z pojawieniem się mało aktywnej formy mięśniowej;
- wzrost aktywności formy M_2 kinazy pirogronianowej, mniej podatnej na hamowanie allosteryczne przez prekursorzy glukoneogenezy (np. aminokwasy glikogenne) niż forma L oraz spadek aktywności formy L.

Wzrost aktywności danej formy molekularnej enzymu wynika najprawdopodobniej ze wzmożonej syntezy możliwej dzięki odblokowaniu odpowiednich genów strukturalnych. Pojawiają się w wątrobiakach formy molekularne występujące w okresie płodowym. Mają one wspólną cechę — podlegają słabszej regulacji niż enzymy dojrzałego narządu, zarówno na poziomie białka już istniejącego (mniejsza wrażliwość na działanie efektów allosterycznych), jak i biosyntezy *de novo*.

Aktywność heksokinaz I—III i formy M_2 kinazy pirogronianowej nie jest regulowana przez dietę i hormony w przeciwieństwie do glukokinazy i formy L kinazy pirogronianowej, typowych adaptacyjnych enzymów w wątrobie. W e i n h o u s e (1—3) uważa, że zastąpienie kluczowych izoenzymów wątrobowych, kontrolowanych przez warunki dietetyczne i hormony gospodarza przez inne izoenzymy nie będące pod tą kontrolą, może

stanowiąc podstawę molekularną niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych. Te „nowe” formy nie są specyficzne dla nowotworów, lecz występują w życiu płodowym w tym samym narządzie lub u osobnika dorosłego w innym narządzie (4). Przykładem są aldolazy A i C w wątrobiakach, izoenzymy spotykane w wątrobie płodowej lub w dojrzałym mięśniu (A) i mózgu (A i C).

Zjawisko zaburzonej ekspresji genów w nowotworach tj. wyłączenie genów kodujących białka syntetyzowane przez zróżnicowane tkanki i włączanie innych, aktywnych w rozwoju płodowym, lecz ulegających supresji podczas normalnego różnicowania (1—3) określano jako „dysdyferencjację” (*dis-differentiation*) (90), „retrodyferencjację” (150) lub „rewersję” (151). Zbliżony sens mają hipotezy „onkogenezy jako zablokowanej ontogenezy” (152), czy derepresji genów płodowych w nowotworach (77).

Należy podkreślić, że normalny obraz izoenzymów cechujący wątrobiaki wysoko zróżnicowane mające jednak wszelkie cechy nowotworów złośliwych zdaje się wykluczać związek zmian izoenzymów z pierwotną transformacją. Zmiany te są natomiast wyraźnie związane z rozwojem anaplastycznym wątrobiaków. Mogą one występować również w wątrobie regenerującej (39, 88, 101) oraz w komórkach z wątroby szczura hodowanych *in vitro* (153), jednak tylko w nowotworach wątroby zakłócenia w ekspresji genów są stałe, nieodwracalne i progresywne (2). Ich przyczyny i mechanizm prowadzące do zaburzeń w obrazie izoenzymów są jeszcze nieznanne. Warto zwrócić uwagę na fakt, że zmiany izoenzymów w nowotworach dotyczą nie tylko enzymów związanych z metabolizmem węglowodanów (3). Analizując bogatą literaturę S a t o i wsp. (147) podtrzymują znany pogląd, że jest to ogólne zjawisko w wątrobiakach.

Zgodnie z dawną hipotezą G r e e n s t e i n a (154) o konwergencji profilu enzymatycznego nowotworów różnego pochodzenia zaobserwowano zbieżność składu ilościowego enzymów w słabo zróżnicowanych nowotworach wątroby i gruczołu mlekowego szczura.

Jako obiekt badań w przyszłości zaproponowano głównie nowotwory o znacznym odróżnicowaniu, z prototypowym, płodowym obrazem izoenzymów, a nie wysoko zróżnicowane, w których się oczekuje „minimalnych zmian” (155).

Po oddaniu pracy do redakcji ukazał się artykuł przeglądowy dotyczący izoenzymów w nowotworach: Kwiatkowska J., (1976), Post. Hig. Med. Dośw., 30, 49—78.

Pani Profesor Irenie Mochnackiej serdecznie dziękuję za cenne uwagi i sugestie podczas przygotowania niniejszego artykułu.

Artykuł nadszedł 24.1.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 29.6.1976.

PIŚMIENNICTWO

1. Weinhouse S., Shatton J. B., Criss W. E., Morris H. P., (1972), *Biochimie*, **54**, 685—693.
2. Weinhouse S., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 2007—2016.
3. Weinhouse S., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 2162—2167.
4. Schapira F., (1973), w *Advances in Cancer Research*, red. Klein G., Weinhouse S., t. 18, str. 77—153, Academic Press, New York.
5. Criss W. E., (1971), *Cancer Res.*, **31**, 1523—1542.
6. Hodosowa I. A., (1974), *Cytologia*, **16**, 667—674.
7. Komow W. P., (1975), *Wop. Onkol.*, **21**, 80—87.
8. Morris H. P., Sidransky H., Wagner B. P., Dyer H. M., (1960), *Cancer Res.*, **20**, 1252—1254.
9. Potter V. R., Pitot H. C., Ono T., Morris H. P., (1960), *Cancer Res.*, 1255—1261.
10. Morris H. P. (1965), w *Advances in Cancer Research*, red. Haddow A., Weinhouse S., t. 9, str. 227—302, Academic Press, New York.
11. Potter V. R., (1961), *Cancer Res.*, **21**, 1331—1333.
12. Nowell P. C., Morris H. P., Potter V. R., (1967), *Cancer Res.*, **27**, 1561—1579.
13. Wu C., (1967), *J. Nat. Cancer Inst.*, **39**, 1149—1154.
14. Shatton J. B., Morris H. P., Weinhouse S., (1969), *Cancer Res.*, **29**, 1161—1172.
15. Weber G., Lea M. A., (1966), w *Advances in Enzyme Regulation*, red. Weber G., t. 4, str. 115—145, Pergamon Press, Oxford.
16. Warburg O., (1930), *Metabolism of Tumors*, Constable, London.
17. Aisenberg A. C., Morris H. P., (1961), *Nature*, **191**, 1314—1316.
18. Elwood J. C., Lin Y. C., Cristofalo V. J., Morris H. P., (1963), *Cancer Res.*, **23**, 906—913.
19. Sols A., Salas M., Vinuela E., (1967), w *Advances in Enzyme Regulation*, red. Weber G., t. 5, str. 177—188, Pergamon Press, Oxford.
20. Katzen H. M., Schimke R. T., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 1218—1225.
21. Grossbard L., Schimke R. T., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 3546—3560.
22. Sharma C., Manjeshwar R., Weinhouse S., (1964), w *Advances in Enzyme Regulation*, red. Weber G., t. 2, str. 189—200, Pergamon Press, Oxford.
23. Salas M., Vinuela E., Sols A., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3535—3538.
24. Katzen H. M., Soderman D. D., Nitowsky H. M., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 377—382.
25. Katzen H. M., (1967), w *Advances in Enzyme Regulation*, red. Weber G., t. 5, str. 335—356, Pergamon Press, Oxford.
26. Katzen H. M., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 531—536.
27. Mc Lean P., Brown J., Greenslade K., Brew K., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 117—121.
28. Sharma C., Manjeshwar R., Weinhouse S., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3840—3845.
29. Manjeshwar R., Sharma C., Morris H. P., Donnelly A. J., Weinhouse S., (1965), w *Advances in Enzyme Regulation*, red. Weber G., t. 3, str. 317—324, Pergamon Press, Oxford.
30. Grossbard L., Weksler M., Schimke R. T., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 32—38.

31. Purich D. L., Fromm H. J., Rudolph F. B., (1973), w *Advances in Enzymology*, red. Meister A., t. 39, str. 249—326, Interscience Publ., New York.
32. Holroyde M., Allen M., Storer A., Warsy A., Chesher J., Trayer I., Cornish-Bowden A., Walker D., (1976), *Biochem. J.*, 153, 363—373.
33. Chou A. C., Wilson J. E., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, 151, 48—55.
34. Holroyde M., Trayer I., (1976), *FEBS Letters.*, 62, 215—219.
35. Walker P. R. Potter V. R., (1972), w *Advances in Enzyme Regulation*, red. Weber G., t. 10, str. 339—364, Pergamon Press, Oxford.
36. Farina F. A., Adelman R. C., Lo C. H., Morris H. P., Weinhouse S., (1968), *Cancer Res.*, 28, 1897—1900.
37. Knox W. E., Jamdar S. C., Davis P. A., (1970), *Cancer Res.*, 30, 2240—2244.
38. Farron F., (1972), *Enzyme*, 13, 233—237.
39. Sato S., Matsuhima T., Sugimura T., (1969), *Cancer Res.*, 29, 1437—1446
40. Kamel R., Schwarzfischer F., (1975), *Humangenetik*, 30, 181—185.
41. Ureta T., Bravo R., Babul J., (1975), *Enzyme*, 20, 334—348.
42. Bonney R. J., Hopkins H. A., Walker P. R., Potter V. R., (1973), *Biochem. J.*, 136, 115—124.
43. Gumaa K. A., Greenslade K. R., (1968), *Biochem. J.*, 107, 22p.
44. Ueda M., Taketa K., Shimamura J., Kosaka K., (1974), *Clin. Chim. Acta*, 53, 361—383.
45. Balinsky D., Cayanis E., Geddes E. W., Bersohn I., (1973), *Cancer Res.*, 33, 249—255.
46. Penhoet E., Rajkumar T., Rutter W. J., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 56, 1275—1282.
47. Penhoet E., Kochman M., Valentine P., Rutter W. J., (1967), *Biochemistry*, 6, 2940—2949.
48. Kochman M., (1969), *Post. Hig. Med. Dośw.*, 23, 747—786.
49. Kochman M., Kwiatkowska D., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, 152, 856—868.
50. Kochman M., Dżugaj A., (1973), *Post. Biochem.*, 19, 499—531.
51. Horecker B. L., Tsolas O., Lai C. Y., (1972), w *The Enzymes* red. Boyer P., t. 7, str. 213—258, Academic Press, New York.
52. Dżugaj A., Wnuk W., Baranowski T., (1974), *Acta Biochim. Polon.*, 21, 237—245.
53. Lai C. Y., Oshima T., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, 144, 363—374.
54. Ting S., Lai C. Y., Horecker B. L., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, 144, 476—484.
55. Morse D. E., Horecker B. L., (1968), w *Advances in Enzymology*, red. Nord F. F., t. 31, str. 125—181, Interscience Publ., New York.
56. Chan W., Morse D. E., Horecker B. L., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 57, 1013—1020.
57. Koida M., Lai C. Y., Horecker B. L., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, 134, 623—631.
58. Gracy R. W., Lacko A. G., Brox L. W., Adelman R. C., Horecker B. L., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, 136, 480—490.
59. Hatzfeld A., Banroques J., Schapira F., (1974), *C. R. Acad. Sci., Paris*, 278, 2219—2222.
60. Nakai N., Chang D., Lai C. Y., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, 166, 339—346.
61. Nakai N., Chang D., Lai C. Y., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, 166, 347—357.

62. Lai C. Y., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**, 358—368.
63. Lai C. Y., Chen C., Horecker B. L., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 460—468.
64. Blostein R., Rutter W. J., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3280—3285.
65. Gracy R. W., Lacko A. G., Horecker B. L., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 3913—3919.
66. Gürtler B., Bally C., Leuthard F., (1971), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1455—1462.
67. Eagles P. A. M., Iqbal M., (1973), *Biochem. J.*, **133**, 429—439.
68. Rutter W. J., (1964), *Fed. Proc.*, **23**, 1248—1257.
69. Drechsler E. R., Boyer P. D., Kowalsky A. G., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 2627—2634.
70. Kowalsky A., Boyer P. D., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 604—608.
71. Spolter P. D., Adelman R. C., Weinhouse S., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 1327—1337.
72. Rose I. A., O'Connell E. L., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 126—134.
73. Schapira F., Reuber M. D., Hatzfeld A., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 321—327.
74. Schapira F., Hatzfeld A., Reuber M. D., (1971), *Cancer Res.*, **31**, 1224—1230.
75. Hatzfeld A., Schapira F., (1973), *Biochimie*, **55**, 53—57.
76. Hatzfeld A., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **350**, 314—318.
77. Schapira F., Dreyfus J. C., Schapira G., (1963), *Nature*, **200**, 995—997.
78. Schapira F., Nordmann Y., (1969), *Clin. Chim. Acta*, **26**, 189—195.
79. Schapira F., Hatzfeld A., (1972), *Biochimie*, **54**, 695—700.
80. Rensing U., Schmid A., Leuthard F., (1967), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 921—928.
81. Masters C. J., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **167**, 161—171.
82. Susor W. A., Rutter W. J., (1971), *Anal. Biochem.*, **43**, 147—155.
83. Farron F., Hsu H. H. T., Knox W. E., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 302—308.
84. Croizat B., Granelli-Piperno A., Lambiotte M., Gross F., (1972), *Biochimie*, **54**, 375—380.
85. Schapira F., Josipowicz A., (1970), *C. R. Soc. Biol., Paris*, **164**, 32—36.
86. Weber A., Schapira F., (1972), *C. R. Soc. Biol., Paris*, **166**, 312—316.
87. Leberherz H. G., Rutter W. J., (1969), *Biochemistry*, **8**, 109—121.
88. Berges J., Nechaud B., Uriel J., (1974), *FEBS Letters*, **48**, 76—78.
89. Schapira F., Payet M., (1960), *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.*, **5**, 825—826.
90. Matsuhima T., Kawabe S., Shibuya M., Sugimura T., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 565—570.
91. Nordmann Y., Schapira F., (1967), *C. R. Acad. Sci., Paris*, **264**, 1931—1933.
92. Nordmann Y., Schapira F., (1967), *Eur. J. Cancer*, **3**, 247—250.
93. Silber D., Chęcińska E., Rabczyński J., Kochman M., (1975), *Int. J. Cancer*, **16**, 675—681.
94. Silber-Kasprzak D., (1975), praca doktorska, Wrocław.
95. Sugimura T., Sato S., Kawabe S., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 626—630.
96. Brox L. W., Lacko A. G., Gracy R. W., Adelman R. C., Horecker B. L., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 994—998.
97. Ikehara Y., Endo H., Okada Y., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **136**, 491—497.
98. Imamura K., Tanaka T., (1972), *J. Biochem. (Tokyo)*, **71**, 1043—1051.

99. Imamura K., Taniuchi K., Tanaka T., (1972), *J. Biochem. (Tokyo)*, **72**, 1001—1015.
100. Ibsen K. H., Trippet P., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **156**, 730—744.
101. Farina F. A., Shatton J. B., Morris H. P., Weinhouse S., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 1439—1446.
102. Susor W. A., Rutter W. J., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 14—20.
103. Imamura K., Tanaka T., Nishina T., Nakashima K., Miwa S., (1973), *J. Biochem. (Tokyo)*, **74**, 1165—1175.
104. Tanaka T., Harano Y., Sue F., Morimura H., (1967), *J. Biochem. (Tokyo)*, **62**, 71—91.
105. Rozengurt E., de Asua L. J., Carminatti H., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 3142—3147.
106. Llorente P., Marco R., Sols A., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **13**, 45—54.
107. Middleton M. C., Walker D. G., (1972), *Biochem. J.*, **127**, 721—731.
108. Carbonell J., Feliu J. E., Marco R., Sols A., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **37**, 148—156.
109. Spivey H. O., Flory W., Peczon B. D., Chandler J. P., Koeppe R. E., (1974), *Biochem. J.*, **141**, 119—125.
110. Cardenas J. M., Dyson R. D., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6938—6944.
111. Tanaka T., Harano Y., Morimura H., Mori R., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 55—60.
112. Sandoval I. V., Carbonell J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **315**, 343—346.
113. Cardenas J. M., Dyson R. D., Strandholm J. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6931—6937.
114. Ibsen K. H., Trippet P., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 470—480.
115. Van Berkel T. J. C., Koster J. F., Hülsmann W. C., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **321**, 171—180.
116. Cardenas J. M., Strandholm J. J., Miller J. M., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4041—4045.
117. Dyson R. D., Cardenas J. M., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8482—8488.
118. Hubbard D. R., Cardenas J. M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4931—4936.
119. Strandholm J. J., Dyson R. D., Cardenas J. M., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 125—131.
120. Faulkner A., Jones C. T., (1975), *FEBS Letters*, **53**, 167—169.
121. Garnett M. E., Dyson R. D., Dost F. N., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5222—5226.
122. Taylor C. B., Morris H. P., Weber G., (1969), *Life Sci.*, **8**, 635—644.
123. Irving M. G., Williams J. F., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 284—291.
124. Criss W. E., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 901—905.
125. Yanagi S., Kamiya T., Ikehara Y., Endo H., (1971), *Gann*, **62**, 283—291.
126. Yanagi S., Makiura S., Arai M., Matsumura K., Hirano K., Ito N., Tanaka T., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 2283—2289.
127. Balinsky D., Cayanis E., Bersohn I., (1973), *Biochemistry*, **12**, 863—879.
128. Tanaka T., An T., Sakaue Y., (1971), *J. Biochem. (Tokyo)*, **69**, 609—612.
129. Dunaway G. A., Weber G., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**, 620—628.
130. Kirby W., Taylor C. B., (1974), *Int. J. Biochem.*, **5**, 89—93.
131. Kurata N., Matsuhima T., Sugimura T., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 473—479.
132. Kirby W., Morris H. P., Taylor C. B., (1974), *Eur. J. Cancer*, **10**, 629—631.

133. Dunaway G. A., Morris H. P., Weber G., (1972), *Life Sci.*, **11**, (II), 909—918.
134. Dunaway G. A., Morris H. P., Weber G., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 2209—2216.
135. Weber G., Singhal R. L., Sriwastava S. K., (1965), w *Advances in Enzyme Regulation*, red. Weber G., t. 3, str. 43—75, Pergamon Press, Oxford.
136. Krebs H. A., Woodford M., (1965), *Biochem. J.*, **94**, 436—445.
137. Horecker B. L., Melloni E., Pontremoli S., (1975), w *Advances in Enzymology*, red. Meister A., t. 42, str. 193—226, Interscience Publ., New York.
138. Fernando J., Pontremoli S., Horecker B. L., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**, 370—376.
139. Black W. J., Van Tol A., Fernando J., Horecker B. L., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**, 576—590.
140. Enser M., Shapiro S., Horecker B. L., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**, 377—383.
141. Opie L. H., Newsholme A., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 353—360.
142. Sato K., Tsuiki S., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**, 173—180.
143. Sato K., Morris H. P., Weinhouse S., (1972), *Science*, 879—881.
144. Sato K., Weinhouse S., Morris H. P., (1972), w *Advances in Enzyme Regulation*, red. Weber G., t. 11, str. 343—358, Pergamon Press, Oxford.
145. Sato K., Weinhouse S., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 151—159.
146. Sato K., Morris H. P., Weinhouse S., (1973), *Cancer Res.*, **33**, 724—733.
147. Sato K., Satoh K., Sato T., Imai F., Morris H. P., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 487—495.
148. Sato K., Sato T., Morris H. P., Weinhouse S., (1975), *Ann. N. Y. Acad. Sci. U.S.A.*, **259**, 273—286.
149. Sato K., Abe N., Tsuiki S., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 646—653.
150. Uriel J., (1969), *Path. Biol.*, **17**, 877—884.
151. Wu C., (1973), *Int. J. Cancer*, **11**, 438—447.
152. Potter V. R., (1969), w *Recent Trends in Cancer Biochemistry: The Importance of Studies on Fetal Tissues* w *Proceedings of the Eight Canadian Cancer Research Conference*, Honey Harbor, Ontario, Canada 1968, red. Morgan J. F., str. 9, Pergamon Press, New York.
153. Walker P. R., Potter V. R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4610—4616.
154. Greenstein J. P., (1956), *Cancer Res.*, **16**, 641—653.
155. Knox W. E., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 2102—2108.

SPRAWOZDANIE

Konferencja nt. „Immobilizowane enzymy i białka”

Berlin-Buch, NRD, 15—17 marzec 1976

W ramach wielostronnej współpracy Akademii Nauk krajów socjalistycznych w dniach 15—17 marca 1976 r. w Centralnym Instytucie Biologii Molekularnej, Akademii Nauk NRD, w Berlinie-Buch odbyła się konferencja na temat immobilizowanych enzymów i białek. Zorganizowanie jej zostało zalecone przez podkomisję „Białka i Enzymy” działającą w ramach komisji „Molekularna Biologia”. Miała ona charakter naukowo-roboczego spotkania 23 pracowników z Akademii Nauk i wyższych uczelni: Bułgarii, Czechosłowacji, NRD, Polski, Węgier i ZSRR. Przewodniczył jej prof. P. Mohr, kierownik Zakładu Biokatalizy w/w instytutu. W części naukowej konferencji przedstawiono 16 referatów na temat preparacji, właściwości i zastosowania w praktyce immobilizowanych enzymów.

Prof. dr I. V. Berezin przedstawił badania prowadzone w Państwowym Uniwersytecie im. Łomonosowa w Moskwie. Referent poinformował, że na uczelni tej badania nad immobilizowanymi enzymami rozpoczęto już w roku 1970 a obecnie problematyką tą zajmuje się około 100 pracowników naukowych z katedr: biochemii, mikrobiologii, biologii molekularnej i chemii organicznej. Berezin krótko przedstawił badania nad niektórymi unieruchomionymi enzymami, mającymi znaczenie praktyczne jak: acylaza penicylinowa (produkcja kwasu 6-amino-penicylanowego i synteza tzw. półsyntetycznych penicylin), asparaginaza (leczenie niektórych nowotworów) i układy enzymatyczne syntetyzujące tyrozynę i tryptofan z kwasu pirogronowego i odpowiednich związków aromatycznych. Przedstawił on także nową metodę uzyskania stabilnych unieruchomionych enzymów przez modyfikację ich akroleiną i następną kopolimeryzację z akryloamidem. Wspomniał również o pracach nad stabilizowaniem chloroplastów przez ich immobilizację, a także o możliwości produkcji błon światłoczułych, posiadających nieaktywną, immobilizowaną chymotrypsynę zacylowaną kwasem *cis*-cynamonowym.

Duże zainteresowanie wzbudziło przedstawienie przez Berezina możliwości otrzymania ogniwa enzymowego, posiadającego hydrogenazę bakteryjną, unieruchomioną na graficie. Enzym ten rozkłada wodór do elektronu i protonu wodorowego, co może być dobrym źródłem energii elektrycznej.

Prof. G. Langhammer z Instytutu Chemii Technicznej AN w Lipsku przedstawił badania nad trypsyną kowalencyjnie związaną z kopolimerem akroleiny i akryloamidu, poliaminostyrenem, CM-celulozą, wofatytem ZE-20 oraz z kopolimerem styrenu i bezwodnika maleinowego, (który pod nazwą POVMAL ST jest produkowany przez VES Chemische Werke BUNA, Schkopau, NRD). W przypadku stosowania tych nośników ilość związanej trypsyny była nieraz bardzo duża i dochodziła do 400 mg/g suchego nośnika, lecz wraz ze zwiększeniem ilości związanego enzymu, obserwowano wyraźny spadek swoistej aktywności. Według Langhammera metoda wiązania enzymów z nośnikami poprzez jony metali (np. Ti) nie odegra w przyszłości większego znaczenia. Referent poinformował, że w jego instytucie opracowano produkcję immobilizowanej dekstranazy na skalę przemysłową.

Dr K. Pommerening z Centralnego Instytutu Biologii Molekularnej w Berlinie-

-Buch przedstawił badania hemoglobiny związanej aktywowanym bromocyjanem z żelalem typu Sephadex, bądź też grupami aldehydowymi tegoż nośnika uprzednio utlenionego nadjodanem. Uzyskane w ten sposób preparaty hemoglobiny wykazywały obniżoną zdolność wiązania z tlenem oraz zmniejszony współczynnik Hilla. Właściwości immobilizowanej hemoglobiny zależały od warunków wiązania, które decydowały o konformacji unieruchomionego białka. Związaną hemoglobinę można było usunąć z nośnika przez elucję guanidyną, natomiast była niemożliwa elucja alkaliczna.

Niżej podpisany przedstawił pracę J. Gryszkiewicza, E. Dziambor-Gryszkiewicz i W. Ostrowskiego z Instytutu Biochemii Lekarskiej AM w Krakowie na temat uściślenia fosfatazy kwaśnej z prostaty ludzkiej z albuminą przez aldehyd glutarowy. Opracowano optymalne warunki uzyskania nierozpuszczalnego preparatu enzymu, który oznacza się znaczną stabilnością termiczną oraz wyższą trwałością w stężonych roztworach mocznika i etanolu a także zmniejszoną wrażliwością na działanie inhibitorów. Niektóre aminokwasy wybitnie zmniejszają szybkość tworzenia żelu, natomiast heksametylenodwuamina przyspiesza ten proces. Również niżej podpisany przedstawił badania wykonane w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu nad możliwością zastosowania inkludowanych lub związanych kowalencyjnie z Enzacryl AM enzymów indykatorowych do histochemicznej lokalizacji niektórych acylaz po elektroforezie na żelu poliakryloamidowym. Zademonstrowano również przykład zastosowania immobilizowanej pronazy przy oczyszczaniu niektórych enzymów wysokocząsteczkowych.

Dr L. V. Kozlov z Instytutu Bioorganicznej Chemii AN w Moskwie przedstawił metody immobilizowania α -chymotrypsyny, β -galaktozydazy, pepsyny i oryzyny po uprzedniej chemicznej modyfikacji tych enzymów. Dwie fazy utraty aktywności stwierdzono w czasie ogrzewania unieruchomionych enzymów, co tłumaczono poliwalentnym charakterem wiązania enzym-matryca.

Dr J. Lasch z Instytutu Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu im. M. Lutra w Halle przedstawił badania prowadzone wspólnie z Kozlovem nad wpływem matrycy na konformacyjne zmiany immobilizowanych enzymów. Badania wykonano za pomocą własnej techniki fluorymetrycznej na karboksypeptydazie A i leucylopeptydazie związanej z kopolimerem kwasu akrylowego i maleinowego. Lasch uważa, że enzymy są związane z matrycą jednym lub więcej wiązaniami chemicznymi, co ma wpływ na konformację a także na ich stabilność termiczną.

Dr A. Gabert z Instytutu Chemii Technicznej AN w Lipsku zaprezentował badania nad wpływem ramienia bocznego („*spacer*”) na stabilność termiczną immobilizowanych enzymów. W porównaniu z bezpośrednim wiązaniem enzymu z matrycą, jego wiązanie poprzez heksametylenodwuaminę lub dwukarboksylowe kwasy nie ma istotnego wpływu aktywności i stabilności.

Dr P. Herman z Uniwersytetu M. Lutra w Halle zademonstrował zastosowanie kolumn z immobilizowanymi enzymami do syntezy niektórych substancji radioaktywnych jak: cystationiny, tiolizyny i innych. Ponadto referent poinformował o opracowaniu metody immobilizowania aminoacylazy I przy zastosowaniu substancji ochraniających centrum aktywne enzymu w czasie wiązania z matrycą polisacharydową.

Dr J. Turkova z Instytutu Chemii Organicznej i Biochemii AN w Pradze omówiła prace nad zastosowaniem żelu polihydroksymetakrylowego do otrzymania immobilizowanej pepsyny. Metoda otrzymania tych polimerów zwanych Spheron została opracowana przez grupę organików czechosłowackich, a obecnie ich produkcję rozpoczęła f-ma Lachema i niektóre firmy w USA. Referentka przedstawiła również badania nad tymi polimerami, posiadającymi grupę heksametylenodwuaminy (NH_2 -Spheron) i ω -aminokarbonowego kwasu (COOH -Spheron) użytego w formie aktywnego estru *p*-nitrofenyloвого.

Dr B. Blagoev poinformował o badaniach prowadzonych w Instytucie Chemii Organicznej AN w Sofii. Referent wykazał, że Spheron wiązał około 2,5 krotnie mniej peptydazy bakteryjnej lub ficyny, lecz aktywność uzyskanego preparatu była o około 60% wyższa w porównaniu ze związaniem przez Enzacryl AA i Enzacryl AH. Również związanie z poliakryloamidem poprzez łańcuch utworzony z trzech reszt fenylenodwuazowych, powodowało znaczne obniżenie aktywności oraz termicznej stabilności stosowanych proteaz serynowych.

Prof. A. Schellenberg z Uniwersytetu M. Lutra w Halle przedstawił wpływ sposobu wiązania z matrycą na właściwości dehydrogenazy pirogronowej. Wykazał on, że przedłużenie łańcucha węglowego pomiędzy matrycą a enzymem zwiększa aktywność tego ostatniego oraz skraca czas potrzebny do jego pełnej aktywacji. Zdaniem Schellenberga tzw. „spacer” odgrywa tylko wtedy dostrzegalny wpływ, gdy zachodzi interakcja pomiędzy enzymem a matrycą. Dający się aktywować preparat uzyskano tylko, gdy do wiązania z nośnikiem użyto holenzymu, natomiast unieruchomionego apoenzymu nie udało się przeprowadzić w formę aktywną.

Prace nad elektrodą enzymową, posiadającą immobilizowaną oksydazę glukozy przedstawił Dr P. Scheller z Centralnego Instytutu Biologii Molekularnej w Berlinie-Buch. Jego elektrodę zastosowano ostatnio w kilku laboratoriach klinicznych do rutynowych pomiarów glukozy we krwi i moczu.

Prof. L. Boross z Uniwersytetu im. J. Attila w Szeged zreferował badania termostabilności i wpływu pH na immobilizowaną aminoacylazę I, acylazę penicylinową i dehydrogenazę izocytrynową. Poinformował on również, że opierając się na opracowanej w jego laboratorium technologii — f-ma Reanal rozpocznie wkrótce produkcję immobilizowanej aminoacylazы.

Dypl. chem. pani W. Schwarze z instytutu w Berlinie-Buch przedstawiła matematyczny model kinetyki reakcji katalizowanej przez immobilizowane układy enzymatyczne oraz katalizę reakcji wielosubstratowej.

Dr. D. Kirstein z tego samego instytutu zreferował wyniki badań nad heterogenną kinetyką w reaktorach enzymowych. Grupa jego zajmowała się badaniem dwóch typów reaktorów (recykulacyjnego i typu CSTR) a pomiary wykonano na immobilizowanej tyrozynazie. Ostatecznym wnioskiem było, że nie można stosować bez jakichkolwiek zmian metod chemicznej katalizy heterogennej, do pracy reaktorów enzymowych.

Ostatni referat wygłosił Dr E. Kahring z instytutu gospodarzy, który zajmował się hamującym wpływem substratu w transporcie systemów reakcyjnych w reaktorach z inwertazą związaną ze Spheron. Wyniki te potwierdziły znaczną już opinię, że stopień konwersji substratu maleje ze wzrostem jego stężenia lub z szybkością przepływu.

Na posiedzeniu roboczym konferencji uczestnicy spotkania omówili dalsze formy współpracy pomiędzy instytutami naukowymi krajów socjalistycznych. Sprecyzowano zadania badawcze dla współpracy na najbliższą przyszłość. Na koordynatora współpracy powołano prof. P. Mohra. Zwrócono się z propozycją do prof. I. V. Berezina o zorganizowanie następnego spotkania na temat immobilizowanych enzymów w 1977 roku w Moskwie. Parafowany przez przewodniczących delegacji protokół ma być przedstawiony do zatwierdzenia podkomisji „Białka i Enzymy” w maju br. w Krakowie a następnie odpowiednim Akademiom Nauk.

Apolinary Szewczuk

RECENZJE

Dla kogo ta chemia fizyczna?

Lucjan Sobczyk i Adolf Kiswa (1975), *Chemia fizyczna dla przyrodników*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, stron 581.

Przedmowa autorska tak odpowiada na to pytanie: przede wszystkim dla osób studiujących biologię i biochemię. Ale nie tylko. Autorzy bowiem dalej piszą o swym podręczniku: „Sądźmy, że znajdzie on czytelników także wśród studentów innych specjalności...”, a mianowicie tych którym potrzebna jest znajomość wybranych zagadnień z pogranicza fizyki, chemii i biologii. „Sądźmy” a nie — „mamy nadzieję” czy „chcielibyśmy”, więc też kontynuują w tym samym afirmatywnym duchu: „Jesteśmy przekonani, że podręcznik może być zalecany na studiach podyplomowych dla nauczycieli, zwłaszcza biologów i chemików”.

Zachęcony taką przedmową, biochemik spogląda na spis treści i odkrywa, z mieszanym uczuciem, że jedna z siedmiu części książki poświęcona została koloidom (str. 511—568). Z mieszanym, bo chociaż ten nieco secesyjnie brzmiący termin odradza w pamięci ciepłe wspomnienia szkolne i studenckie, to jednocześnie wzbudza pewien niepokój. Albowiem termin „koloidy” poszedł w biochemii i biofizyce w zapomnienie i to z bardzo dobrych przyczyn. Rozwój biologii molekularnej został opóźniony o kilka dziesiątków lat w wyniku dziewiętnastowiecznej tezy (i jej filozoficznych implikacji), że roztwory białek i kwasów nukleinowych nie są roztworami prawdziwymi i że nie można ich rozpatrywać w pojęciach klasycznej termodynamiki. Dziś wiemy, że związki te tworzą roztwory prawdziwe i jest to jednym z kamieni węgielnych współczesnej wiedzy o ich strukturze oraz o ich funkcji *in vitro* i *in vivo*. Swoją pogląd (str. 512) na tę sprawę autorzy formułują w sposób następujący: „Właściwości roztworów koloidalnych różnią się od właściwości roztworów prawdziwych tylko w sposób fizyczny — wynika to z wielkości, kształtu i bardzo rozwiniętej powierzchni cząstek koloidalnych”. A więc — różnią się czy nie różnią? Chyba jednak się różnią, bo w rozdziałach poświęconych termodynamice roztworów nie ma mowy o białkach i kwasach nukleinowych, a w rozdziałach o „koloidach” — nie nawiązuje się do wcześniejszych opisów właściwości roztworów. Ma to katastrofalny skutek dla przydatności podręcznika w ogóle, a dla wymienionych w przedmowie czytelników w szczególności.

Informacje o budowie ewnych „koloidów” zawarte są w Części 2, zatytułowanej „Stany skupienia materii” w rozdziale pt. „Stan stały” (*sic!*). Kwasom nukleinowym poświęcono tam 16 wierszy druku (str. 167—8) — w prawie 600-stronicowym podręczniku. Czytelnik znajdzie tam ładnie wykonane rysunki, obrazujące budowę przestrzenną DNA i dowie się, że występują w nim cztery zasady heterocykliczne oraz że podwójna spirala DNA stabilizowana jest wiązaniami wodorowymi. O innych zasadach, o innych kwasach nukleinowych i innych siłach stabilizujących ich strukturę, tak jak o fizykochemii kwasów nukleinowych w ogóle — w całym tekście podręczni-

ka nie ma nic więcej. Budowa białek jest obszerniej omówiona: na dwu stronach druku (str. 165—7), z których jedną zajmują wyłącznie rysunki. Z tekstu tego czytelnik się dowie, że łańcuch polipeptydowy powstaje w kondensacji α -aminokwasów i że posiada on „fragmenty płaskie”. Może się domyślić, że „fragment płaski” — to wiązanie peptydowe wraz z sąsiadującymi z nim atomami węgla C_{α} , bo w tekst został włączony wzór tego ugrupowania atomów. Tylko, że wzór ten prawidłowy formalnie, nie jest prawidłowy w kontekście struktury przestrzennej łańcucha polipeptydowego, bo z wzoru tego nie wynika dlaczego ma przedstawiać konfigurację płaską. Pomijając zaś naturę pozostałych wiązań w łańcuchu, autorzy od razu przechodzą do omawiania jego konformacji i stwierdzają, że uwarunkowana ona jest możliwością wysycenia międzypeptydowych wiązań wodorowych. To zaś prowadzi do powstania dwu możliwych postaci łańcucha polipeptydowego: spirali i sfałdowanego arkusza. Dostrzegają pewną trudność w tym wywodzie: oprócz białek „o strukturze włóknistej” istnieją przecież również „białka globularne, które charakteryzują się sferyczną budową (kłębki)” (str. 165). Oferują jednak czytelnikowi — raczej zaskakującą — hipotezę w tej sprawie: „Przypuszcza się, że i w tym przypadku wyjściową jest liniowa struktura spiralna, która uległa skłębieniu” (str. 165). I dalej: „Skłębienie spirali utrwalone jest wiązaniami dwusiarczkowymi, wiązaniami koordynacyjnymi za pośrednictwem jonów metali i oddziaływaniami van der Waalsa pomiędzy różnymi częściami spirali” (str. 167). A wiązania hydrofobowe scharakteryzowano (str. 494) w sposób następujący: „O grupach hydrofobowych mówimy wtedy, gdy nie wykazują powinowactwa do wody. Termin „hydrofobowość” wprowadzono dla rozróżnienia typów oddziaływań międzycząsteczkowych. Wiązanie hydrofobowe sprowadza się przede wszystkim do oddziaływań dyspersyjnych. Zeby zaś nie było wątpliwości co do poglądów autorów na rolę wiązań hydrofobowych w białku, passus ten zilustrowany jest rysunkiem (Rys. 6.13 str. 495), przedstawiającym jak grupy hydrofilowe i grupy hydrofobowe zgodnie powiewają na zewnętrznej powierzchni cylindrów reprezentujących α -heliksy.

Nasza wiedza o budowie przestrzennej białek niewątpliwie ma znaczne luki. Nie takie jednak, aby nie można było jej opisać w sposób wewnątrznie zborny, zgodny ze znanymi faktami doświadczalnymi i z tym, co wiemy o zależności pomiędzy strukturą cząsteczki białka a jej właściwościami fizykochemicznymi i wieloma funkcjami biologicznymi. Opisu takiego nie można jednak przedstawić w podręczniku, jeżeli pomija się te cechy łańcucha polipeptydowego, które nadają mu swobodę rotacji wewnętrznej i te cechy łańcuchów bocznych aminokwasów, które swobodę tę ograniczają. I opis ten nie wyjdzie poza granice artykułu popularno-naukowego, jeżeli nie zostaną w nim uwzględnione dane termodynamiczne, a m.in. konsekwencje zmian wolnej energii i entropii przy przenoszeniu reszt hydrofobowych do środowiska wodnego. Bez tego czytelnik, którego wiedza jeszcze wymaga studiowania podręczników studenckich, w dalszym ciągu nie będzie wiedział o separacji grup polarnych i apolarnych w cząsteczce białka, ani o konformacji białka i jej zależności od składu środowiska. Nie będzie wiedział więc o krytycznych właściwościach jego cząsteczki, od których zależy rola białka w zjawiskach biologicznych. Konsekwencje tak szczególnego potraktowania struktury białka są w omawianym podręczniku pogłębione przez jeszcze jedną poważną jego lukę, uniemożliwiającą wyjaśnienie podstaw fizykochemicznych procesów zachodzących w komórce żywej. Pomimo bowiem, że znaczną część książki poświęcono właściwościom roztworów, to nigdzie nie omówiono reakcji, jakie zachodzą pomiędzy związkami wielkocząsteczkowymi a innymi związkami, drobno- i wielkocząsteczkowymi, obecnymi w tymże roztworze. Taka jest konsekwencja wyodrębnienia „koloidów liofilowych” w podręczniku chemii fizycznej dla przyrodników! Czytelnik więc nic się z niego nie dowie o szczególnych cechach wspomnianych interakcji: o zróżnicowaniu formalnie identycznych miejsc wiążących, o mnogich równowagach wiązania ligandów, o pozytywnej i negatywnej kooperacji. I niemożliwym stanie się

zrozumienie fizykochemii transportu, katalizy enzymatycznej i regulacji procesów metabolicznych. A to są jedne z najważniejszych problemów współczesnej biologii molekularnej.

Reakcjom enzymatycznym w podręczniku poświęcono niespełna trzy strony, jeżeli połączyć informacje zamieszczone w rozdziałach „Reakcje enzymatyczne” i „Struktura enzymów”. Enzymy zostały scharakteryzowane (str. 490) w sposób następujący: „Enzymy zaliczamy do katalizatorów mikroheterogenicznych. Makrocząsteczki enzymów o średnicy 100 do 1000Å, o masie cząsteczkowej 20 000 do 500 000, stanowią specyficzną koloid białkowy. Kataliza zatem na enzymach jest pośrednia pomiędzy homogeniczną a heterogeniczną”. Asekuracyjna dwuznaczność tego określenia, analogiczna do dwuznaczności określeń wyżej zacytowanych, nie ratuje jednak autorów przed zarzutem błędu. Katalityczne właściwości enzymów znamy prawie wyłącznie z badań prowadzonych w układach homogenicznych: enzym i substrat tworzą w wodzie roztwór prawdziwy, adekwatnie opisywany w pojęciach termodynamiki roztworów, jak ją dzisiaj znamy. To właśnie jest fundamentem całej naszej współczesnej wiedzy o mechanizmach działania enzymów. Jednocześnie jednak wiele faktów wskazuje na to, że w komórce żywej kataliza enzymatyczna przebiega w układzie heterogenicznym, gdyż enzymy na ogół są immobilizowane w aparacie błoniastym komórki. Kluczowym problemem w biologii molekularnej jest wyjaśnienie, w jakim stopniu wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* odzwierciedlają procesy, zachodzące *in vivo*. Wprowadzenie terminu „katalizator mikroheterogeniczny” na określenie enzymów nie tylko pozbawione jest wartości heurystycznej, ale dezinformuje czytelnika. Na szczęście dostępne są podręczniki biochemii, w których zagadnienie katalizy enzymatycznej jest — lepiej czy gorzej — ale na ogół prawidłowo omówione.

Opis kinetyki reakcji enzymatycznych sprowadzony został wyłącznie do kinetyki Michaelisa-Mentena (490—491). O tym, że istnieją kinetyki sigmoidalne, czy efekty allosteryczne i inne modulacje aktywności enzymu — w podręczniku brak nawet wzmianki. O zależności pomiędzy pH a aktywnością enzymu napisano (str. 493): „pH ma istotny wpływ, gdyż większość grup funkcyjnych na powierzchni makrocząsteczki enzymu to grupy kwasowo-zasadowe”, tak, jakby one to właśnie odgrywały główną rolę w katalizie enzymatycznej. Spadek aktywności enzymu w podwyższonej temperaturze przypisano wyłącznie denaturacji „substancji białkowej” (str. 493), tak, jakby nie mogły w tym odgrywać roli liczne inne mechanizmy. Mechanizm działania enzymów autorzy streszczają (str. 495—6) w czterech punktach, kolejno wyliczonych w jednym zdaniu, załączając ładny schemat (Rys. 6.14 str. 496) ilustrujący jedną ze starszych hipotez w tej sprawie („indukowane wpasowanie”). W punktach tych można dopatrzyć się reminiscencji z szeregu aktualnie dyskutowanych hipotez, ale wartość tego streszczenia jest żadna. Zupełnie nie można zrozumieć, dlaczego autorzy nie wykorzystali swych wcześniejszych rozważań termodynamicznych, aby dać chociaż zarys zależności pomiędzy wiązaniem substratu a aktem katalitycznym.

Drugie, obok katalizy, zagadnienie biologii w którego rozwiązaniu chemia fizyczna odgrywa rolę zasadniczą — błony komórkowe — zostało tak potraktowane, że nie nadaje się do omawiania. W podręczniku błony określone zostały jako „półprzepuszczalne” (str. 443) i podzielone (str. 444) „ze względu na mechanizm działania” na „homogeniczne, działające na zasadzie selektywnej rozpuszczalności” oraz „porowate działające jak sita, przesiewające cząsteczki substancji rozpuszczonej w zależności od ich wielkości, ciepła adsorpcji oraz (w przypadku roztworów elektrolitów) od znaku i wielkości ich ładunków”. O tym, że po dwu stronach błony może wytworzyć się różne stężenie substancji na zasadzie innej niż równowaga Donnana, czy efekt sita molekularnego i o nagromadzeniu substancji wbrew gradientowi stężenia w podręczniku nie ma w ogóle mowy. Jest to zapewne pierwszy od kilkudziesięciu lat podręcznik dla przyrodników w którym nie występuje pojęcie transportu aktywnego.

Wszystko to, co powyżej powiedziano nie wyczerpuje jeszcze pełnej listy zarzutów odnośnie sposobu, w jaki potraktowane zostały w podręczniku podstawy fizykochemiczne procesów biologicznych (czy też — same zjawiska biologiczne). Do podreżnika takiego przyrodnik często sięga również po to aby zapoznać się z metodami stosowanymi w eksperymencie biochemicznym czy biofizycznym. Odnajdzie ich wiele w różnych rozdziałach, ale poniżej skomentowane one będą w podziale na dwie grupy: na metody oparte na zjawisku transportu w roztworze i metody wykorzystujące absorpcję i emisję radiacji.

W grupie pierwszej, przedstawiając zjawisko dyfuzji (str. 520—1) podręcznik podaje pierwsze prawo Fick'a, ale nie podaje drugiego — pomimo, że właśnie drugie prawo Fick'a stanowi podstawę wszystkich dokładnych metod oznaczania stałej dyfuzji. O tym, że kształt cząsteczki wpływa na stałą dyfuzji, czytelnik dowie się z uwagi (str. 523) wyjaśniającej rozbieżność (w przytoczonym przykładzie obliczeniowym) pomiędzy masą cząsteczkową ureazy, obliczoną z pomiarem stałej dyfuzji, a jej masą rzeczywistą. O znaczeniu warstwy solwatacyjnej w interpretacji wyników pomiaru stałej dyfuzji nie ma mowy. Analizę sedymentacyjną omawia się bez najbardziej nawet ogólnych danych o jej warunkach technicznych, m.in. bez scharakteryzowania metod pomiaru stężenia substancji w wirowanej kuwecie. Schemat rozkładu cząsteczek w kuwecie (Rys. 7.3 str. 525) został podany w sposób który nie wyjaśnia procesu zachodzącego ani przy pomiarze szybkości sedymentacji ani równowagi sedymentacyjnej. We wzorach opisujących przebieg ultrawierowania (liczne wzory na stronach 525—528), czynnik wypornościowy (t.zw. *buoyancy factor*) podano jako $1 - d_0/d$ zamiast $1 - \bar{v}d_0$, utożsamiając cząstkową objętość właściwą substancji rozpuszczonej z odwrotnością jej gęstości. Nie jest to proste odstępstwo od konwencjonalnej symboliki, ale istotny błąd. I to nie tylko dlatego, że czytelnik nigdzie nie znajdzie wartości liczbowych gęstości biopolimerów (i nie dlatego, że te dwa parametry nie są identyczne). Zastosowanie we wzorze z analizy sedymentacyjnej \bar{v}_0 , cząstkowej objętości właściwej, dla substancji rozpuszczonej a gęstości d_0 dla rozpuszczalnika wynika z teorii procesu sedymentacji w polu siły odśrodkowej, opartej o termodynamikę procesów nieodwracalnych (a ta ostatnia jest w podręczniku pokrótce omówiona!). I następujące kwestie nie zostały czytelnikowi wyjaśnione: czy oznaczana w ultrawierówce masa cząsteczki jest masą solwatowaną czy nie, czy kształt cząsteczki wpływa na szybkość sedymentacji, jakie parametry molekularne można wyznaczyć z analizy sedymentacyjnej oprócz stałej sedymentacji i masy cząsteczkowej. Inna szeroko stosowana w badaniach biochemicznych i biofizycznych metoda, pomiar lepkości, opisana jest tak jakby równanie Newtona było zawsze spełniane (str. 529). A co z kwasami nukleinowymi i białkami „o strukturze włóknistej”? Najważniejszym zastosowaniem pomiaru lepkości wg. autorów ma być wyznaczanie masy cząsteczkowej (str. 530), czego od dziesiątków lat się nie robi. Natomiast wyznaczanie kształtu cząsteczki jest co prawda wspomniane, ale przytoczono jedynie empiryczny wzór opisujący zależność pomiędzy stosunkiem długości półosi elipsoidu obrotowego a lepkością graniczną (wzór nienumerowany str. 530). O wyprowadzonych na podstawie rygorystycznych rozważań hydrodynamicznych wzorach Perrina i Simha'y (i stosowanych w praktyce odpowiednich wykresach) nie wspomina się, a — co jeszcze bardziej zaskakujące — nie wspomina się w ogóle całej teorii Sheraga-Mandelkern. I wreszcie — inne metody z tej grupy: jedyny osmometr jaki zilustrowano i opisano to osmometr statyczny (Rys. 4.6 str. 288), podczas gdy wszystkie współcześnie stosowane osmometry oparte są o zasadę pomiaru dynamicznego; w elektroforezie (str. 549—550) — pominięto całkowicie teorię transportu cząstki naładowanej w polu elektrycznym, a jako ilustrację (Rys. 7.17 str. 550) podano schemat muzealnej kuwety do elektroforezy swobodnej (z błędem w opisie w tekście). O elektroforezie w podłożu stabilizowanym i o ogniskowaniu izoelektrycznym w ogóle nie wspomniano, tak jak nie wspomniano do jakich celów można stosować elektroforezę.

Niewiele lepiej potraktowano drugą grupę metod badawczych, wykorzystujących absorpcję i emisję promieniowania. Przy omawianiu widm oscylacyjnych nie ma nawet wzmianki o ich zastosowaniu do badania konformacji polipeptydów, ani o możliwościach, jakie otworzyła spektroskopia ramanowska laserowa. Przy widmach elektronowych nie mówi się o wpływie, jaki na wielkość i pozycję pasma absorbcyjnego chromoforu może mieć wielkość cząsteczki, w której on się znajduje, obecność ładunków sąsiadujących, czy skład rozpuszczalnika — a więc o parametrach szeroko wykorzystywanych do badania struktury i interakcji kwasów nukleinowych i białek. Skręcalność optyczną omówiono na poziomie podręcznika szkolnego, a uzupełniono jedynie wzmiankę (6-wierszową) o dyspersji rotacji optycznej (str. 94—5). Ale na dichroizm kołowy, a w związku z tym — na omówienie powiązań pomiędzy ORD, CD i absorpcją promieniowania, nie znalazło się miejsce w tym podręczniku. Elektronowy rezonans paramagnetyczny omówiono na niespełna trzech stronach druku (str. 96—99) w sposób popularno-naukowy, z informacją, że jest on stosowany do wykrywania i badania wolnych rodników. O znacznikach spinowych nie ma mowy, i nie wspomniano o zastosowaniu EPR do badania specyficznych obszarów w cząsteczce białka, czy błon biologicznych. Opis jądrowego rezonansu magnetycznego zajął autorom mniej niż jedną stronę druku (32 wiersze, str. 99 i 100), a działanie przyrządu pomiarowego czytelnik ma rozumieć ze skrajnie uproszczonego schematu blokowego (Rys. 1.43 str. 100). W tekście wymieniony jest parametr przesunięcia chemicznego (jako wprowadzony „dla celów porównawczych”), ale nie wspomniano o procesach relaksacji. Brak nawet wzmianki o tym, że NMR jest obecnie jedną z dwu najpotężniejszych metod badania biopolimerów, w niektórych zastosowaniach — bardziej użyteczną niż krystalografia rentgenowska. Przy opisie tej drugiej metody zapomniano wspomnieć, iż stosuje się ją do badania m.in. białek i kwasów nukleinowych! O kilku innych jeszcze metodach jest w tekście mowa, a brak tutaj komentarza nie oznacza, że podane opisy są wystarczające, a także, że nie pominięto szeregu innych metod.

Omawiany podręcznik został przez Państwowe Wydawnictwo Naukowe wydany bardzo pięknie. Skład, druk, czcionka, kolory, rysunki, oprawa — stoją na najlepszym poziomie światowym. Nie bardzo wiadomo dlaczego tyle wysiłku zostało włożone właśnie w tę książkę — przy tylu podręcznikach na takie wyróżnienia nie zasługujących. A przecież w gruncie rzeczy nie jest to podręcznik a raczej kompendium odpowiedzi egzaminacyjnych. Tylko że student na egzaminie z biochemii i biofizyki na wiele pytań z zakresu chemii fizycznej nie znajdzie w nim odpowiedzi, a za niektóre dostanie ocenę niedostateczną. Wielka szkoda, że sygnałny egzemplarz omawianego podręcznika nie został przysłany do kwartalnika „*Postępy Biochemii*” do recenzji.

Kazimierz Zakrzewski

Biomolekularne podstawy interakcji hormon — komórka

Pod redakcją naukową Doc. dra med. Aleksandra Dawidowicza Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich. Nakład Tarchomińskich Zakładów Farmaceutycznych „Polfa”, Warszawa 1975, (stron 162, 5.000 egz.)

W listopadzie 1973 r. odbyło się z inicjatywy doc. dr med. A. Dawidowicza i Zarządu Oddziału Warszawskiego Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego sympozjum na temat biomolekularnych podstaw interakcji hormon — komórka. Owocem tego sympozjum jest tom materiałów wydany w postaci książki, opracowanych w formie prac przeglądowych lub doświadczalnych, z obszerną bibliografią doprowadzoną do 1974 roku. W części ogólnej książki wydrukowano trzy świetne referaty omawiające ogólne aspekty czynności hormonów, ze szczególnym uwzględnieniem badań nad rolą receptorów hormonalnych i ich przekształcaniem się w efekторы (prof. dr med. K. Zakrzewski), omówieniem zastosowania wyników tych badań w patofizjologii klinicznej (doc. dr med. J. Tatoń, dr E. Kowalik) oraz ich interpretacji biocybernetycznej (doc. dr med. T. Bogdanik).

Część szczegółowa zawiera 11 prac omawiających różne aspekty mechanizmów działania hormonów u człowieka lub w organizmach zwierzęcych oraz 1 praca poświęcona hormonom roślinnym. Obszerne — na ogół — wprowadzenia do tych prac pozwalają czytelnikowi poznać szersze tło zagadnień, nad którymi pracuje się w polskich ośrodkach, a także w Instytucie Endokrynologii w Pradze (dr L. Starka).

Wartość omawianego tomu podnosi staranne opracowanie redakcyjne, z drobnymi tylko potknięciami nomenklaturowymi, wspomniana już aktualna bibliografia oraz streszczenia w języku angielskim.

Szybki rozwój biochemii białek, odkrycie receptorów tkankowych hormonów oraz wywołana „teorią drugiego przekaźnika” Sutherlanda eksplozja badań nad rolą cAMP spowodowały, że postęp w badaniach mechanizmów działania hormonów jest ostatnio bardzo szybki. Znajduje to oczywiście odbicie w literaturze z tego zakresu, jednakże jest to w znakomitej większości literatura obcojęzyczna i z tego względu trudno dostępna dla licznej grupy biologów, lekarzy i studentów wydziałów medycznych i przyrodniczych. „Biomolekularne podstawy interakcji hormon — komórka” są pozycją wypełniającą lukę w piśmiennictwie polskim, pozycją która jeszcze nie straciła aktualności. Żywot książki naukowej jest jednak coraz krótszy i każdy tydzień jej przetrzymywania w magazynach jest marnotrawstwem, którego nie da się odrobić. Należy zatem wyrazić ubolewanie, że omawiana książka została udostępniona tylko członkom Polskiego Towarzystwa Endokrynologicznego i Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, a nie ma jej w sprzedaży, pomimo niewyczerpania nakładu.

Irena Szumiel

SPIS TREŚCI

D. Frąckowiak, K. Fiksiński — Przekazywanie energii w jednostkach fotosyntetycznych (<i>Referat sympozjalny wygłoszony na XIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego</i>)	439
R. Dąbrowska — Systemy regulujące cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni	467
M. Pilarzka — Biosynteza eterowych odpowiedników lecytyn i fosfatydylo- -etanoloamin	483
K. Konopka — Wewnątrzkomórkowy transport żelaza	491
M. Droba, K. Strzałka — Zastosowanie metod immunologicznych do bada- nia struktury błon tylakoidów	511
E. Dahlig — Różne formy molekularne niektórych enzymów metabolizmu węglowodanów w nowotworach wątroby, wątrobie regenerującej i tkan- kach płodowych	527
Sprawozdanie — Konferencja nt. Imobilizowane enzymy i białka 15—17.3.1976, Berlin (<i>A. Szewczuk</i>)	548
Recenzje :	551

POSTĘPY BIOCHEMII

December 1976

ARTICLES IN POLISH

Volume 22

Number 4

D. Frąckowiak, K. Fiksiński — Energy Transfer in Photosynthetic Units (Inst. Physics, Technical University, Poznań)	439
R. Dąbrowska — Regulatory Systems of Contraction — relaxation Cycle of Muscle (Dept. Biochem. Nervous System and Muscle, M. Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci, Warszawa)	467
M. Pilarśka — Biosynthesis of Ether Bonds Containing Analogues of Phosphatidylcholines and Phosphatidylethanolamines (Dept. Biochem. Nervous System and Muscle, M. Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci, Warszawa)	483
K. Konopka — Intracellular Transport of Iron (Dept. Biochem., Inst. Physiol. Biol., Medical Academy, Łódź)	491
M. Droba, K. Strzałka — Application of Immunological Methods for Investigation of Tylakoid Structure (Dept. Plant Biochem., Inst. Mol. Biol., Jagiellonian University, Kraków)	511
E. Dahlig — Multiple Molecular Forms of Some Enzymes of Carbohydrates Metabolism in Livers Tumours, Regenerating Liver and Fetal Tissues, (Dept. Biochem., Inst. Biopharmacy, School. Med., Warszawa)	527
Meeting report	548
Book reviews	551

POSTĘPY BIOCHEMII

— kwartalnik

Cena zł 20.—

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej

półrocznie zł 40.—

rocznie zł 80.—

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SPIS TREŚCI

D. Frąckowiak, K. Fiksiński — Przekazywanie energii w jednostkach fotosyntetycznych (<i>Referat sympozjalny wygłoszony na XIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego</i>)	439
R. Dąbrowska — Systemy regulujące cykl skurczowo-rozkurczowy mięśni	467
M. Piłarska — Biosynteza eterowych odpowiedników lecytyn i fosfatydylo- -etanolamin	483
K. Konopka — Wewnątrzkomórkowy transport żelaza	491
M. Droba, K. Strzałka — Zastosowanie metod immunologicznych do bada- nia struktury błon tylakoidów	511
E. Dahlig — Różne formy molekularne niektórych enzymów metabolizmu węglowodanów w nowotworach wątroby, wątrobie regenerującej i tkan- kach płodowych	527
Sprawozdanie — Konferencja nt. Immobilizowane enzymy i białka 15—17.3.1976, Berlin (A. Szewczuk)	548
Recenzje	551