

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postepy Biochemii

POSTBAH 30 (3-4)
(217-512) (1984)

1984

tom 30 nr 3-4

PL ISSN 0032-5422



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy, oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny w sposób syntetyczny omawiać wybrany temat na podstawie możliwie pełnego piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu na podstawie piśmiennictwa z ostatnich dwu lat. Objętość takich artykułów nie powinna przekraczać 25 stron maszynopisu (nie licząc ilustracji i piśmiennictwa). Kwartalnik publikuje także artykuły typu *minireviews*, do 10 stron maszynopisu, z dziedziny zainteresowań autora, opracowane na podstawie najnowszego piśmiennictwa, wystarczającego dla zilustrowania problemu. Ponadto kwartalnik publikuje krótkie noty, do 5 stron maszynopisu, informujące o nowych, interesujących osiągnięciach biochemii i nauk pokrewnych, oraz noty przybliżające historię badań w zakresie różnych dziedzin biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem 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 Polską.

Układ maszynopisu: strona okładkowa 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, adres prywatny, 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 informować rzeczowo winny o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści 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 rozstrzełonego 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. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. 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 doraźnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postepy Biochemii

KWARTALNIK

1984 TOM 30 ZESZYT 3-4

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 30 (3-4)
(217—512) (1984)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)

Zastępca przewodniczącego: I. Szumiel (Warszawa)

Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Chorąży (Gliwice), E. Czuryło (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), E. Gąsior (Lublin), J. Gregorczyk (Szczecin), M. Gumińska (Kraków), D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa), L. Wojtczak (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa)

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

SEKRETARZ REDAKCJI

J. Tępińska

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (Warszawa), J. Rytka (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

W opracowaniu zeszytu uczestniczył L. Wojtczak (Warszawa)

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1984

Nakład 1810 egz.	Oddano do składania 12.VII.1984 r.
Ark. wyd. 22,75, ark. druk. 18,5	Podpisano do druku w styczniu 1985 r.
Papier druk. b. sat. kl. IV, 80 g 70×100	Druk ukończono w kwietniu 1985 r.
Zam. 6863/12/84	Cena zł 180,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa



Profesor dr Antoni Dmochowski
1896—1983

**Twórca pierwszej w Polsce
uniwersyteckiej katedry biochemii**

<http://rcin.org.pl>

Antoni Dmochowski urodził się 6 grudnia 1896 roku we wsi Sarnów (pow. Łuków, woj. lubelskie). Po ukończeniu Gimnazjum Filologicznego im. E. Konopczyńskiego w Warszawie, w listopadzie 1915 roku wstąpił na Wydział Filozoficzny Uniwersytetu Warszawskiego. Okres zdobywania wiedzy przerwał na prawie dwa lata biorąc udział w walkach o niepodległość Polski. Powrócił na Uniwersytet Warszawski jako inwalida wojenny.

Przypadkowe wysłuchanie wykładu prof. Jakuba Parnasa z chemii fizjologicznej przesądziło o kierunku dalszych studiów Antoniego Dmochowskiego, który zamierzał poświęcić się matematyce. Jeszcze jako student został asystentem prof. Stanisława Bądryńskiego, kierującego wówczas Katedrą Chemii Fizjologicznej na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu, gdzie wykonał pracę doktorską pod tytułem: „O produktach trawienia oksyhemoglobiny krwi za pomocą pepsyny”. Dyplom doktora filozofii w zakresie chemii oraz fizjologii zwierząt otrzymał Antoni Dmochowski w Uniwersytecie Warszawskim w 1924 roku. W tymże roku w czasopiśmie Polskiego Towarzystwa Przyrodników im. Kopernika ukazała się jego pierwsza publikacja naukowa: „Badania nad hematyną trawienną”.

Po śmierci prof. Bądryńskiego w 1927 roku Katedrę Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu objął prof. Stanisław Przyłęcki — jeden z pionierów w chemii biokoloidów. W jego katedrze dr Antoni Dmochowski rozpoczął jako pierwszy w Polsce badania budowy i roli kwasów nukleinowych w komórkach i tkankach organizmów. Równocześnie, we współpracy z profesorem fizjologii zwierząt Kazimierzem Białoszewiczem, zajął się zagadnieniem rezerw białkowych u zwierząt stało- i zmiennocieplnych badając zmiany stosunku jądro — cytoplazma w komórkach organizmów głodzonych. W ramach prac nad purynami mięśni wykrył On — niemal równocześnie z prof. Embdenem (1927) i prof. Parnasem (1928) — nieznanym dotychczas kwas adenyłowy mięśniowy (adenozyno-5'-fosforan), różny od znanego już kwasu adenyłowego drożdżowego (adenozyno-3'-fosforan). Za badania te uzyskał I nagrodę Związku Asystentów Polskich.

Jako stypendysta Funduszu Kultury Narodowej dr Antoni Dmochowski odbył studia uzupełniające w Austrii (1925), Szwajcarii (1930) i w USA (1931). Podczas stażu u prof. Levine'a w Instytucie Rockefellera w Nowym Jorku opracował pierwszą skuteczną metodę izolowania 3'-fosforybozy z kwasu guanyłowego drożdżowego, co odegrało zasadniczą rolę przy wyjaśnieniu miejsca przyłączenia kwasu fosforowego w nukleotydach. Praca „O purynach mięśni” stała się podstawą przeprowadzonej w 1932 roku na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Uniwersytetu Warszawskiego habilitacji z zakresu chemii fizjologicznej. W 1935 roku ogłosił On wyczerpującą monografię „O współczesnym stanie chemii i fizjologii kwasów nukleinowych” omawiając w niej osiągnięcia z lat 1931—1935. Była to czwarta w ówczesnej literaturze światowej monografia nt. kwasów nukleinowych, po wcześniejszych opracowaniach Jonesa (1921), Fuelgena (1923)

oraz Levine'a i Bassa (1931). Przez wiele następnych lat monografia Antoniego Dmochowskiego stanowiła dla czytelnika polskiego jedyne i fundamentalne źródło wiedzy w zakresie kwasów nukleinowych.

Z Łodzią profesor Dmochowski związał się już przed wojną. Jako docent Uniwersytetu Warszawskiego podjął wykłady z chemii fizjologicznej w Łódzkim Oddziale Wolnej Wszechnicy Polskiej, uczelni bardzo postępowej i o wysokim poziomie naukowym. W 1934 roku został kierownikiem Zakładu Chemii Fizjologicznej z siedzibą w Warszawie i filią w Łodzi. Obu Zakładom profesor Dmochowski służył swą wiedzą i zapałem badawczym. W 1937 roku został mianowany profesorem nadzwyczajnym chemii fizjologicznej i kierownikiem Katedry i Zakładu Chemii Fizjologicznej Wolnej Wszechnicy Polskiej. Była to pierwsza w Polsce Katedra Chemii Fizjologicznej poza wydziałami medycznymi. W latach 1942—1944 profesor Dmochowski brał żywy udział w tajnym nauczaniu w Warszawie, wykładając chemię fizjologiczną na Wydziale Lekarskim i Farmaceutycznym Uniwersytetu Warszawskiego oraz na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Poznańskiego.

W marcu 1945 r. Ministerstwo Oświaty zaproponowało profesorowi Dmochowskiemu przeniesienie do Łodzi, gdzie rozpoczęto właśnie organizowanie Uniwersytetu Łódzkiego. Wkrótce stał się On współtwórcą i współorganizatorem tej uczelni. Dzięki Jego staraniom z dniem 1 września 1945 r. została utworzona w Uniwersytecie Łódzkim pierwsza uniwersytecka Katedra Biochemii na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym, której był On organizatorem i wieloletnim kierownikiem (do 30 września 1967 r.). Będąc profesorem nadzwyczajnym na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym, pełnił jednocześnie funkcję zastępcy profesora chemii fizjologicznej na Wydziale Lekarskim i Stomatologicznym, które do 31 grudnia 1949 roku wchodziły w skład Uniwersytetu Łódzkiego. Kierując Katedrą Chemii Fizjologicznej oraz Zakładem Chemii Ogólnej w latach 1946—1949 odegrał On ważną rolę w zorganizowaniu studiów biochemicznych dla studentów medycyny, stomatologii i farmacji. On też stał się głównym organizatorem Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, który powstał w 1951 roku w wyniku podzielenia Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego na Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii oraz na Wydział obejmujący zakłady biologiczne i geograficzne. Był pierwszym i wieloletnim dziekanem nowego Wydziału (1951—1958) oraz twórcą specjalizacji biochemicznej.

W okresie powojennym profesor Antoni Dmochowski położył olbrzymie zasługi w kształceniu nowej biochemicznej kadry w Polsce. Wykształcił wielu doktorów i prawie 200 magistrów. Spośród Jego uczniów ponad dziesięć osób uzyskało już tytuły profesorskie. Swoje zainteresowania i doświadczenie w badaniach kwasów nukleinowych, nukleotydów adeninowych i hemoglobiny profesor Dmochowski przeszczerpił na teren łódzkiego środowiska biochemicznego, gdzie są one kontynuowane i pogłę-

biane do dziś przez Jego uczniów. Profesor był zwolennikiem idei wielokierunkowego kształcenia i wychowywania biochemików. Zainicjował On więc w ośrodku łódzkim nie tylko badania kwasów nukleinowych i nukleoprotein w tkankach zdrowych, lecz i patologicznych. Drugim nurtem Jego zainteresowań stały się kwaśne mukopolisacharydy, zwłaszcza w ścianach tętnic ludzkich w miarę starzenia się i miażdżycy. We współpracy z profesorem Emilem Łożą rozwinął On w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego dalsze kierunki badawcze, a mianowicie badania wpływu soli jodowych na działanie penicyliny, zagadnienie związków fosforowych fibrynogenu i włókniaka krwi, biochemię łuszczycy i gośca przewlekłego postępującego, a także biochemię miedzioprotein. Wspólnie z prof. Wacławą Maciejewską-Potapczyk podjął też badania wpływu kinetyny na metabolizm roślin. Z wymienionych dziedzin ogłosił On samodzielnie lub zespołowo 59 rozpraw naukowych, a całkowity dorobek publikacyjny kierowanej przez Niego w latach 1945—1967 Katedry Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego liczył w sumie 232 pozycje.

Profesor Antoni Dmochowski odszedł na emeryturę w 1967 roku. Za zasługi na polu naukowym i dydaktycznym otrzymał On liczne nagrody i odznaczenia, m.in. Złoty Krzyż Zasługi (1954), Krzyż Kawalerski Orderu Odrodzenia Polski (1958), Krzyż Oficerski Orderu Odrodzenia Polski (1959), nagrodę indywidualną I stopnia Ministra Szkolnictwa Wyższego za osiągnięcia dydaktyczno-wychowawcze (1963), nagrodę naukową m. Łodzi (1966). W 1979 roku Uniwersytet Łódzki nadał Profesorowi Antoniemu Dmochowskiemu najwyższą godność — doktora Honoris Causa w zakresie nauk przyrodniczych.

Profesor Dmochowski był członkiem zwyczajnym Łódzkiego Towarzystwa Naukowego, współorganizatorem i wieloletnim członkiem Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego i jednym z członków założycieli Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz pierwszym, wieloletnim przewodniczącym Oddziału tego Towarzystwa w Łodzi. W uznaniu osiągnięć naukowych i zasług na polu życia naukowego w Łodzi i kształcenia młodzieży w zakresie biochemii Polskie Towarzystwo Biochemiczne nadało Profesorowi Dmochowskiemu w 1971 roku godność swego Członka Honorowego.

Profesor Antoni Dmochowski zmarł w Łodzi 23 grudnia 1983 roku. Pożegnaliśmy Go w Laskach pod Warszawą w dniu 27 grudnia. Odszedł od nas żarliwy naukowiec zadziwiający żywością intelektu i niezwykłym uwrażliwieniem na wszystko, co nowe w nauce w ogóle, a w biochemii w szczególności, jednocześnie zaś czujny zwierzchnik, dbały o rozwój naukowy każdego ze współpracowników, zawsze chętny i gotowy do krytycznych dyskusji i podsumowania cennych sugestii.

Jego najwyższym umiłowaniem była czytelnia czasopism bieżących i w ogóle literatura naukowa. Czytał do późnych godzin w Zakładzie lub w Bibliotece Uniwersyteckiej. Z rozrzewnieniem wspominamy, jak to Profesor, nie zastawszy o godzinie 21 pełnego kompletu swych współpra-

owników w Zakładzie wyrażał zdziwienie: „Co to? Wszyscy już wyszli?”.

Jego pytania na zebraniach naukowych, kolokwiach habilitacyjnych, egzaminach doktorskich, czy nawet magisterskich — zawsze dotyczyły ostatnich danych z pieśmiennictwa, co zmuszało prelegentów i egzaminowanych do bieżącego śledzenia literatury. Zdarzało się i tak: Gdy Profesor pytał kogoś np. w czerwcu, czy zna ostatnią pracę na dany temat wydrukowaną w „Nature”, to na odpowiedź „owszem, znam taką pracę z kwietnia”, padało stwierdzenie: „Ale mnie chodzi o tę z czerwca”.

Był człowiekiem olbrzymiej wiedzy, nie tylko z dziedziny biochemii, obdarzonym niezwykle krytycyzmem, a jednocześnie fantazją naukową, znakomitym popularyzatorem najnowszych osiągnięć w biologii i chemii. Wielka szkoda, że swoich myśli nie przelewał na papier. Podobno miał awersję do pisania. Mawiał nieraz, że ucieka Mu myśl, gdy tylko weźmie pióro do ręki. Zapewne urodził się za wcześnie. Okres Jego najwyższej twórczości winien był przypaść na dobę magnetofonów. Żałujemy ogromnie, że Jego wykłady nie zostały zarejestrowane. Były one wielkim przeżyciem dla słuchaczy. Są wśród nas i tacy, dla których wysłuchanie tylko jednego wykładu Profesora Antoniego Dmochowskiego stało się wielką przygodą — wytyczeniem kierunku zainteresowań i drogi życiowej.

Uczniowie

HANS RUDOLF BOSSHARD *)

Funkcja cytochromu c — wzorzec molekularnego rozpoznawania

The Function of Cytochrome c, a Paradigm for Chemical Recognition

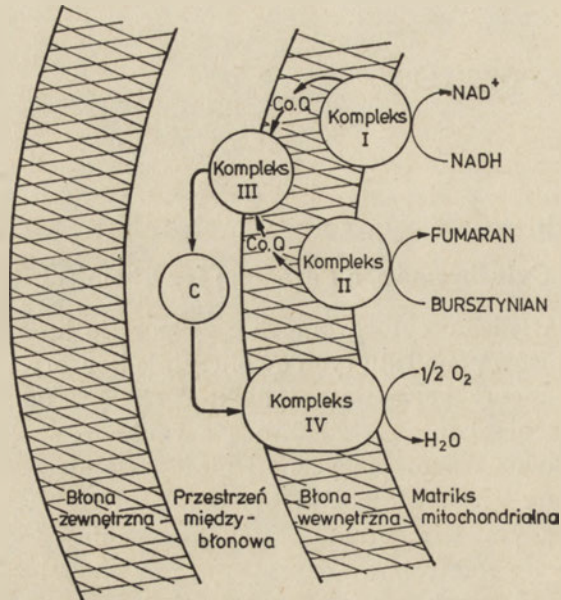
Współczesna wiedza o cytochromach c dysponuje już znajomością sekwencji aminokwasów ponad stu tych ewolucyjnie konserwatywnych białek i znajomością budowy krystalicznej niektórych spośród nich. Mimo to, zrozumienie zależności między strukturą a funkcją cytochromu c pozostawało do niedawna fragmentaryczne i niezadawalające. Obecnie jednak wyłania się ogólny i zadziwiająco prosty obraz oddziaływania tego białka z jego fizjologicznymi partnerami i funkcjonowania odpowiednich kompleksów transportu elektronów. Zaproponowany model zakłada istnienie wiązań elektrostatycznych pomiędzy resztami lizyny cząsteczki cytochromu c a resztami kwasów asparaginowego i glutaminowego jego fizjologicznych partnerów.

Po ponownym odkryciu cytochromów przez Keilina w 1925 roku, rozpuszczalny w wodzie lecz wiążący się z wewnętrzną błoną mitochondrialną cytochrom c stał się jednym z najintensywniej badanych białek. Był on trzecim z kolei białkiem, którego sekwencja aminokwasów została ustalona. Obecnie znamy ją już w cytochromie c z ponad stu różnych eukariontów i prokariontów. Rozporządząmy również wyczerpującymi danymi rentgenograficznymi o budowie krystalicznej wielu cytochromów c, w tym również cytochromów c niektórych prokariontów, strukturalnie zbliżonych do cytochromu c eukariontów.

W połowie lat siedemdziesiątych mnogość informacji na temat cytochromu c wysunęła go na czoło białek „podręcznikowych”. Niemniej nadal niezrozumiała pozostawała sprawa molekularnego mechanizmu jego działania (Ryc. 1). Przed około ośmiu laty szereg badaczy podjęło, przy pomocy różnych podejść eksperymentalnych, badania rejonów cząsteczki cytochromu c czynnych w procesie przenoszenia elektronów. Jedną z metod polegała na modyfikowaniu cytochromu c w różnych miejscach jego cząsteczki. Można było oczekiwać, że niektóre z tych zmienionych cytochromu

*) Department of Biochemistry, University of Zürich, CH-8057 Zürich
Tłumaczył Lech Wojtczak, prof. dr Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego, PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

mów c będą wykazywać zmienioną reaktywność, podczas gdy inne, w których modyfikacja dotknie miejsca cząsteczki dalekie od rejonu interakcji, będą oddziaływać w sposób nie zmieniony.



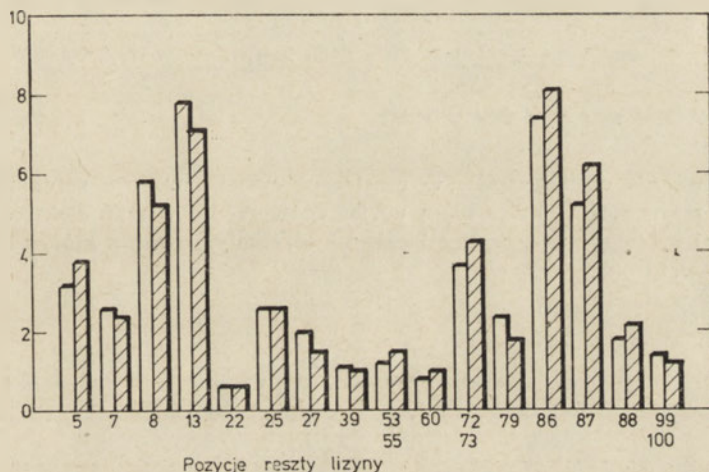
Ryc. 1. Pozycja cytochromu c w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym. Cytochrom c pośredniczy w transporcie elektronów między kompleksem III (oksydoreduktaza ubichinol-cytochrom c) a kompleksem IV (oksydoreduktaza cytochrom c — tlen). Zarówno kompleks III jak i IV oddziałują z tą samą domeną na powierzchni cytochromu c.

Przygotowanie i oczyszczenie tych związków wymagało znacznego trudu. Na przykład, rozdzielanie mieszaniny samych tylko pochodnych cytochromu c podstawionych w jednej reszcie lizyny nie było łatwe, gdyż związki te są po prostu chemicznymi izomerami. Trzeba zaś pamiętać, że pochodnych tych jest w sumie 19, a reszty lizyny rozmieszczone są na całej powierzchni cząsteczki. Pracownia dr E. Margoliasa posłużyła się w tym celu 4-karboksy-2,5-dinitrofenolem (CDNP). Związek ten ma tę zaletę, że wiążąc się z resztą lizyny powoduje zmianę dwóch ładunków elektrycznych powstałych pochodnych cytochromu c, co pozwala na ich lepsze rozdzielanie za pomocą chromatografii. W rezultacie, starannie przeprowadzona chromatografia mieszaniny reakcyjnej na wymienniczkach kationowych doprowadziła do uzyskania 12 różnych CDNP-cytochromów c w stanie czystości przekraczającym 99%.

Badając następnie przenoszenie elektronów między tak zmodyfikowanymi cytochromami c a ich różnymi białkowymi partnerami, stwierdzano niezmiennie, że niezależnie od chemicznego charakteru modyfikacji podstawienie pewnych reszt lizynowych powodowało znaczne zahamowanie

transportu elektronów, podczas gdy podstawienie innych reszt lizyny miało wpływ znacznie mniejszy, lub nawet pozostawało bez wpływu. Lista stosowanych tu partnerów reakcji obejmowała układy oksydoredukcyjne błony mitochondrialnej, takie jak oksydaza cytochromowa w różnych jej formach, reduktaza ubichinol-cytochrom c, reduktaza bursztynian-cytochrom c i oczyszczony cytochrom c_1 . Badano również białka, które normalnie występują w formie rozpuszczonej w mitochondrialnej przestrzeni międzymbłonowej, jak peroksydaza cytochromu c z drożdży, oksydaza siarczynowa z wątroby szczura i cytochrom b_5 , a także białka, z którymi cytochrom c nie kontaktuje się w warunkach fizjologicznych, jak azuryna i plastocyanina.

Jeszcze bardziej przekonujące są wyniki naszej pracowni, wykazujące, że te same reszty lizyny zaangażowane są w reakcję cytochromu c z oksydazą cytochromową, reduktazą cytochromu, oczyszczonym cytochromem c_1 i peroksydazą cytochromu c (Ryc. 2). Nasze podejście ekspery-

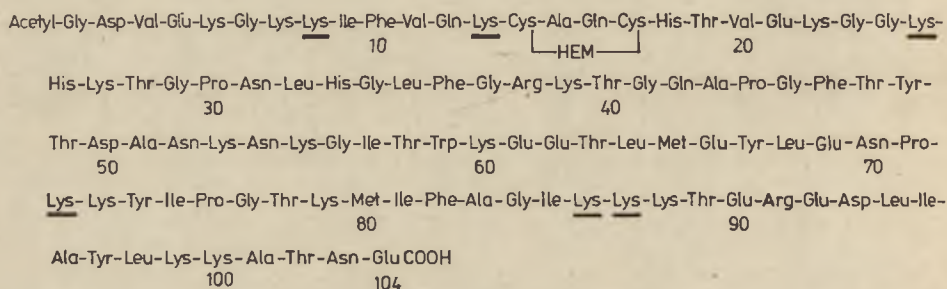


Ryc. 2. Różnicowe modyfikowanie chemiczne reszt lizyny cytochromu c. Wysokość każdego słupka obrazuje reaktywność odpowiedniej reszty lizyny wolnego cytochromu c podzieloną przez reaktywność tej samej reszty lizynowej cytochromu c połączonego w kompleksie z oksydazą cytochromową (słupki puste) lub z reduktazą ubichinol-cytochrom c (słupki zakreskowane). Według Riedera i Bossharda (1980).

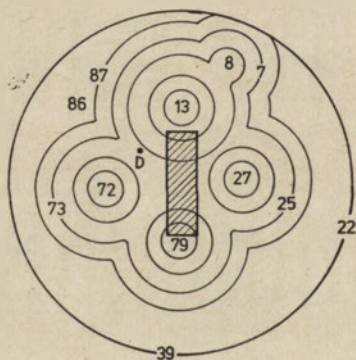
mentalne polegało na różnicowym chemicznym modyfikowaniu reszt lizynowych, przy czym porównywano reaktywność chemiczną każdej reszty lizynowej cytochromu c swobodnie rozpuszczonego i cytochromu c związanego kompleksowo z odpowiednim partnerem oksydoredukcyjnym. Wielkość powierzchni zaangażowanej w taką interakcję oceniano na podstawie stopnia osłaniania poszczególnych reszt lizynowych, o czym świadczyła zmiana ich reaktywności. Podejście nasze jest szczególnie zachęcające z powodu jego prostoty i bezpośredniości w porównaniu z ogromną pracą nie-

zbędną dla otrzymania czystych pojedynczo podstawionych pochodnych cytochromu c według metody wcześniej opisanej.

Wykazaliśmy w ten sposób przekonywająco i po raz pierwszy, że w cząsteczce cytochromu c jest tylko jedna domena interakcji. Reszty lizynowe, które się w tej domenie znajdują (lizyny w pozycjach 8, 13, 27, 86 i 87), wyznaczają na powierzchni cząsteczki strefę zawierającą również inne reszty aminokwasowe, zarówno hydrofilowe jak i hydrofobowe, o małej zmienności ewolucyjnej, takie jak izoleucyna 81, alanina 82, glutamina 12 i 16 oraz asparagina 70 (Ryc. 3 i 4). Godne uwagi jest to, że w skład tej domeny wchodzi również większa część, a być może całość, dostępnej dla rozpuszczalnika krawędzi polarnej hemowej grupy prostetycznej na



Ryc. 3. Sekwencja aminokwasów w cząsteczce cytochromu c z serca konia. Podkreślono te reszty lizyny, które biorą udział w tworzeniu wiązań elektrostatycznych z partnerami cytochromu c, czyli z białkami enzymatycznymi, z którymi cytochrom c wymienia elektrony.



Ryc. 4. Schematyczne przedstawienie domen cząsteczki cytochromu c, oddziaływujących ze wszystkimi fizjologicznymi partnerami cytochromu c. Zakresowany prostokąt obrazuje krawędź reszty hemowej dostępnej dla rozpuszczalnika. Liczba okręgów wokół każdej reszty lizynowej jest proporcjonalna do procentu zahamowania funkcji cytochromu c, gdy odpowiednia reszta ulegnie modyfikacji. Promienie tych okręgów są wielokrotnością arbitralnie przyjętej wartości 25 nm. Liczby wskazują względne pozycje atomów węgla α odpowiednich reszt. Litera D wskazuje punkt, w którym przecina powierzchnię cząsteczki dodatni koniec osi dipolu natywnego cytochromu c. Według Koppenola i Margoliasha (1982).

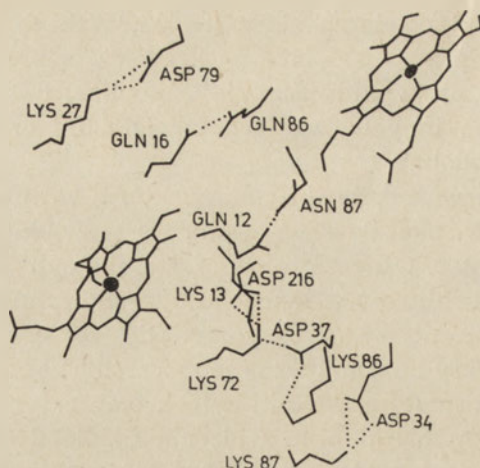
tak zwanej czołowej powierzchni cząsteczki. Wskazuje to, że wymiana elektronu zachodzi prawdopodobnie na krawędzi hemu lub za pośrednictwem jakiejś struktury znajdującej się w pobliżu, i że fizjologiczna wymiana elektronu na innych częściach powierzchni cząsteczki białkowej jest mało prawdopodobna.

Jest szczególnie ważne, że domena, w której zachodzi proces przekazywania elektronów, okazała się tą samą we wszystkich badanych układach donator-akceptor. Oznacza to, że cząsteczka cytochromu c musi wykazywać znaczną ruchliwość w łańcuchu oddechowym podczas przenoszenia elektronów z reduktazy na oksydazę. Nie jest bowiem możliwe, aby te tak duże kompleksy enzymatyczne jednocześnie zajmowały ten sam rejon na powierzchni małej cząsteczki cytochromu c.

Następnym ważnym z punktu widzenia fizjologii cytochromu c problemem było określenie natury i stopnia tej ruchliwości. Mogłaby ona ograniczać się tylko do rotacji cząsteczki, gdyby cytochrom c był umiejscowiony we „wnęce”, w której znajdowałyby się również miejsce donorowe elektronu odpowiedniej reduktazy i miejsce akceptorowe oksydazy. Jest to tak zwany model stanu ciała stałego. Alternatywnie, cytochrom c mógłby dyfundować między oksydazą a reduktazą po powierzchni błony (model dyfuzji dwuwymiarowej) lub oddysocjowywać od błony po każdym przeniesieniu elektronów (model dyfuzji trójwymiarowej). W naszych badaniach skłaniamy się ku modelowi będącemu połączeniem tych dwóch ostatnich, uważając, że zarówno wiązaniem cytochromu c z błoną jak i z miejscem transportu elektronów rządzi zasada prostej równowagi. Zgodnie z tym, model dyfuzji dwuwymiarowej dotyczyłby w szczególności przeniesienia elektronów między dwoma miejscami na błonie, podczas gdy model dyfuzji trójwymiarowej miałby zastosowanie w przypadku cytochromu c reagującego z enzymami rozpuszczonymi w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej.

Mając te informacje na temat reaktywnej domeny cytochromu c i mechanizmu jego oddziaływania, możemy obecnie poszukiwać komplementarnych miejsc oddziaływania w cząsteczkach różnych partnerów cytochromu c. Można oczekiwać, że miejsca takie powinny być ujemnie naładowane, aby neutralizować dodatni ładunek elektryczny cytochromu c, i zawierać centralnie położony rejon hydrofobowy komplementarny wobec centralnego rejonu hydrofobowego reaktywnej domeny cytochromu c. I rzeczywiście, porównując przestrzenne struktury obu białek stwierdzono taką zgodność w obrębie domeny oksydazy cytochromowej zawierającej cztery reszty kwasu asparaginowego, odpowiadające resztom lizyn 13, 27, 72, 86 i 87 cytochromu c. Zgodność tę potwierdziły częściowo badania metodą kowalencyjnego sieciowania (Ryc. 5).

Dalsze mapowanie domen interakcji pomiędzy białkami i — ogólnie biorąc — badanie zależności między strukturą a funkcją cytochromu c wymagać będzie zastosowania wymiany reszt aminokwasowych innych niż



Ryc. 5. Hipotetyczna struktura kontaktu między cząsteczkami cytochromu c (z lewej strony) i peroksydazy cytochromu c (z prawej strony). Schemat uwidacznia wiązania jonowe między resztami lizyny 13, 27, 72, 86 i 87 cytochromu c a resztami kwasu asparaginowego 34, 37, 79 i 216 peroksydazy. Model ten skonstruowano w oparciu o znaną z badań rentgenograficznych strukturę peroksydazy i cytochromu c (Poulos i Kraut, 1980) i o wyniki chemicznej modyfikacji reszt lizyny i kwasu asparaginowego (Bechtold i Bosshard, 1983).

te, które łatwo poddają się modyfikacji chemicznej, jak to ma miejsce w przypadku badanych dotychczas reszt lizyny. Być może, osiągniemy to na drodze rekombinacji DNA, stosując ukierunkowaną mutagenezę, aby otrzymać cytochromy c mające odpowiednio do naszych zamierzeń badawczych zmienioną sekwencję aminokwasów. Nie można jednak przy tym zapominać, że ostatecznym celem jest wyjaśnienie mechanizmu działania i roli struktur w tym działaniu zaangażowanych. Dlatego nie wystarczy rozporządzać ogromną nawet gamą sztucznych mutantów cytochromu c, jeśli nie będziemy w stanie dogłębnie badać skutków, jakie podstawienie odpowiednich reszt wywierać będzie na funkcję otrzymanej struktury. Gdy technologia mutagenyzy stanie się rutynową metodą badawczą, przyjdzie nam jeszcze wrócić na wydeptane, ale w dalszym ciągu nie w pełni zrozumiane ścieżki wcześniejszych badań nad funkcją cytochromów.

PISMIENICTWO

1. Koppenol W. H., Margoliash E., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4426—4437.
2. Margoliash E., Bosshard H. R., (1983), *Trends in Biochem. Sci.*, **8**, 316—320.
3. Rieder R., Bosshard H. R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6045—6053.
4. Rieder R., Bosshard H. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4732—4739.
5. Speck S. H., Ferguson-Miller S., Osheroff N., Margoliash E., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 155—159.
6. Waldmeyer B., Bechtold R., Bosshard H. R., Poulos T. L., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6073—6076.

ARTYKUŁY

ZYGMUNT MACHOY *)

Regulacja aktywności oksydazy cytochromowej

Regulation of cytochrome oxidase activity

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Struktura i funkcja oksydazy cytochromowej
- III. Czynniki regulujące aktywność enzymu
 - III-1. Wpływ stężenia tlenu
 - III-2. Poziom równoważników redukujących
 - III-2. Znaczenie potencjału fosforylacyjnego
- IV. Wpływ zmian środowiska na aktywność enzymu
 - IV-1. Wpływ pH
 - IV-2. Oddziaływanie elektrostatyczne
 - IV-3. Znaczenie siły jonowej
- V. Inhibitory
- VI. Rola środowiska lipidowego
- VII. Allosteryczna interakcja między centrami katalitycznymi enzymu
- VIII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Structure and function of cytochrome oxidase
- III. Factors regulating the enzyme activity
 - III-1. Effect of oxygen concentration
 - III-2. Reductant levels
 - III-3. Significance of the phosphorylation potential
- IV. Influence of environmental changes on the enzyme activity
 - IV-1. Effect of pH
 - IV-2. Electrostatic action
 - IV-3. Importance of ionic strength
- V. Inhibitors
- VI. Role of lipid environment
- VII. Allosteric interaction between catalytic centers of enzyme
- VIII. Concluding remarks

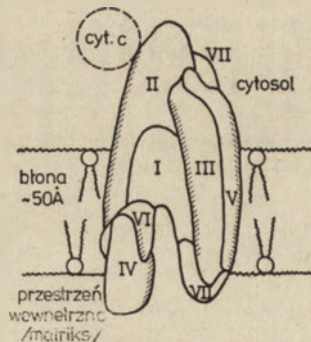
*) Doc. dr, Zakład Chemii Fizjologicznej, Katedra Biochemii Pomorskiej Akademii Medycznej, Al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-106 Szczecin

I. Wprowadzenie

Oksydaza cytochromowa (EC.1.9.3.1) zajmuje unikalną pozycję w układzie przenoszącym elektrony. Występuje ona asymetrycznie w wewnętrznej błonie mitochondrionu i katalizuje przenoszenie elektronów ze zredukowanego cytochromu *c* na tlen molekularny (1). Wytworzona w tej reakcji energia elektrochemiczna jest wykorzystana do transportu jonów lub do syntezy ATP (2). Zdolność enzymu do translokacji protonu (H^+) poprzez wewnętrzną błonę mitochondrialną posłużyła do wprowadzenia przez Wikströma i współpracowników (3) pojęcia pompy protonowej działającej na zasadzie sprzężenia z reakcją oksydoredukcji. 90% tlenu wykorzystywanego w procesach biologicznych jest zużytkowane przy współdziałaniu oksydazy cytochromowej (4). Dlatego zrozumiałe jest powszechne występowanie tego enzymu. Nawet w tkankach kostnych i chrząstkach wykazano jego aktywność (5).

II. Budowa i funkcja oksydazy cytochromowej

Budowa i funkcja oksydazy cytochromowej zostały opisane w wielu publikacjach, w tym także w „Postęпах biochemii” (6). Enzym ten zawiera dwa hemy (*a* i *a₃*) i dwa atomy miedzi, Cu_A i Cu_B , jako grupy prostetyczne w kompleksie składającym się od 7 do 9 różnych podjednostek polipeptydowych (7). Ryc. 1. Cytochromy *a* i *a₃* zawierają identyczne grupy hemowe, ale tylko *a₃* reaguje z tlenem i inhibitorami (CO , CN^- , HN_3). Cytochrom *a* jest utleniany przez *a₃*, natomiast cytochrom *a₃* jest utleniany przez tlen molekularny (8). W warunkach aerobowych cytochrom *a₃* pozostaje całkowicie utleniony, podczas gdy cytochrom *a* wykazuje zmien-



Ryc. 1. Oksydaza cytochromowa związana z wewnętrzną błoną mitochondrialną (wg 4). Cyfry rzymskie oznaczają poszczególne podjednostki enzymu, a cyfry arabskie w nawiasach określają masę cząsteczkową podjednostek w kilodaltonach. I (36), II (23), III (21), IV (17), V (12), VI (8), VII (4).

ny zakres zredukowania od 0 do 20⁰/o (9). Substratem oksydazy cytochromowej jest cytochrom c. Cytochrom c jest także substratem innych enzymów (10).

Oksydazy cytochromowe otrzymane z różnych gatunków stały się przedmiotem licznych prac porównawczych (11, 12). Okazało się, że liczba podjednostek peptydowych w tych enzymach jest zmienna. Ilość podjednostek zależy nie tylko od sposobu ich izolowania lecz także od rodzaju badanego materiału (13, 14, 15). Ogólnie przyjmuje się, że oksydazy z prokariotów, w odróżnieniu od enzymu z eukariotów, charakteryzują się mniejszą liczbą podjednostek (12, 16). Przykładowo, oksydaza z *Paracoccus denitrificans* składa się tylko z dwóch podjednostek, wykazując przy tym pełną sprawność katalityczną w przenoszeniu elektronów ze zredukowanego cytochromu c na tlen molekularny. Fakty te nasunęły pytanie, jaka minimalna liczba podjednostek jest konieczna dla sprawnego działania enzymu (17). Stwierdzenie różnej liczby podjednostek w oksydazach cytochromowych u różnych gatunków zapoczątkowało badania dotyczące rozmieszczenia hemów i atomów miedzi w enzymie. Przyczyniło się to do określenia zależności między strukturą i funkcją enzymu (19, 20). Duże znaczenie przypisuje się niektórym resztom aminokwasowym (lizyna, cysteina), które biorą udział w tworzeniu kompleksu substrat — enzym (19, 20, 21).

Mimo licznych publikacji i stosowania różnych metod badawczych mechanizm działania oksydazy cytochromowej nie jest w pełni zrozumiały (1, 8, 20, 22). Obecnie znamy szereg czynników, które regulują aktywność oksydazy. W niniejszym artykule przedstawiono przede wszystkim te z nich, które dotyczą oksydazy ssaków. Większość badań dotyczących kontroli aktywności została wykonana przy użyciu enzymu izolowanego z mitochondriów. Jak wiadomo, oksydaza cytochromowa jest enzymem błonowym. Enzymy takie wykazują pewne charakterystyczne właściwości wynikające stąd, że znajdują się wewnątrz struktur lipoproteidowych lub na granicy faz. Ogranicza to dostęp substratów. Ponadto, lokalnie na powierzchni błony mogą występować nieco odmiennie warunki fizykochemiczne niż w pozostałym obszarze komórki (23). Dlatego na funkcję enzymów błonowych mogą wpływać: ładunek powierzchniowy błon, zmiany konformacyjne nośników, ruch białek i lipidów błonowych oraz zmiany płynności błon, jak i potencjał transmembranowy (24). Toteż coraz częściej prowadzone są badania porównawcze właściwości enzymów w postaci rozpuszczonej, lub pod postacią liposomów i w formie związanej z błoną.

Analizując zachowanie się oksydazy związanej z błoną mitochondrialną i oksydazy izolowanej (rozpuszczalnej) Nicholls (25) stwierdził, że niektóre z parametrów (V_{max} , K_m i inhibicja przez cyjanki i azydki) są takie same w przypadku obu badanych form. Stała też jest liczba dwóch miejsc wiążących w kompleksie enzymatycznym cytochrom c (26). W przeciwieństwie do tego znane są różnice w zachowaniu się różnych form oksy-

dazy cytochromowej. Dotyczą one aktywności enzymu, wartości pozornych stałych K_m oznaczanych metodami spektrofotometryczną i polarograficzną (27), dostępności do miejsc wiążących cytochrom *c* (26), jak też obserwowanych różnic w bezpośredniej redukcji cytochromu *a* przez różne związki chemiczne (28).

Do głównych mechanizmów regulujących szybkość procesów metabolicznych należą: regulacja zawartości i aktywności enzymu oraz kontrola transportu różnych substancji przez błony do komórki. Stosowanie inhibitorów pozwala także na badanie regulacji poszczególnych etapów dróg metabolicznych (29). W obecności inhibitora obserwuje się nagromadzenie pośredników występujących przed miejscem działania inhibitora oraz brak metabolitów, których synteza została zahamowana.

III. Czynniki regulujące aktywność enzymu

III-1. Wpływ stężenia tlenu

Oksydaza cytochromowa katalizuje reakcję: $4 c^{2+} + O_2 + 4 H^+ \rightarrow 4 c^{3+} + 2H_2O$, gdzie przez c^{2+} i c^{3+} oznaczono zredukowany i utleniony cytochrom *c*. Analizując powyższą reakcję należałoby rozpatrywać ją także w odniesieniu do stężenia tlenu jako drugiego substratu (30). Jest to o tyle uzasadnione, że oksydaza cytochromowa posiada dwa cytochromy, *a* i a_3 , z których jeden reaguje z cytochromem *c*, a drugi z tlenem. Dotychczas badano kinetykę reakcji cytochromu *c* z różnymi preparatami oksydazy cytochromowej (związanej z błoną mitochondrialną i rozpuszczoną). Natomiast prace z zakresu kinetyki reakcji enzymu z tlenem dotyczyły głównie badań z nieuszkodzonymi mitochondriami. W pracach, w których użyto izolowanego enzymu, wpływ tlenu na kinetykę reakcji, przy stosowaniu różnych stężeń cytochromu *c*, był z reguły pomijany. Dopiero Petersen i współpracownicy (30) określili wartość K_m dla reakcji oksydazy z tlenem jako równą $0,95 \mu M$, a stałą szybkości (reakcja II rzędu) dla reakcji między tlenem i oksydazą jako $9,5 \cdot 10^7 M^{-1} \cdot s^{-1}$. Wcześniej wyznaczone wartości stałej szybkości były niższe, choć tego samego rzędu (31, 32). W badaniach Petersena i współpracowników (30) wartość K_m dla cytochromu *c* jako substratu oksydazy wynosiła $20 \mu M$. Tlen reaguje z jednakową szybkością z częściowo zredukowanym ($a^{3+} - a_3^{2+}$) jak i z całkowicie zredukowanym enzymem (33). Przy wysokim stężeniu tlenu formą przeważającą w częściowo zredukowanym enzymie jest forma $a^{2+} - a_3^{3+}$, podczas gdy przy niskim stężeniu tlenu przeważa forma $a^{3+} - a_3^{2+}$ (34). Reakcję redukcji tlenu poprzedza dyfuzja cząsteczki tlenu do miejsca jego wiązania w enzymie ze stałą szybkości $10^8 M^{-1} \cdot s^{-1}$ (35). Zdania są podzielone, czy w warunkach aerobowych szybkość ogólnej reakcji zależy od stężenia tlenu (por. 36 i 49).

Przy wyjaśnianiu mechanizmu reakcji między tlenem a oksydazą cytochromową posłużono się założeniem analogicznym jak przy wiązaniu CO przez enzym (37). Miejscem aktywnym reakcji enzymu z tlenem jest cytochrom a_3 i atom miedzi Cu_B (38). Tlen tworzy mostkowe połączenie z cytochromem a_3 (ściślej z jego miedzią i żelazem) i jest redukowany w dwustopniowej reakcji przenoszenia elektronów tworząc stosunkowo trwałe połączenie nadtlenkowe ($Cu^{2+}-O_2^{2-}-a_3$). Połączenie to podlega dalszej redukcji z wytworzeniem wody. Ostatnio uważa się, że aktywne centrum enzymu może reagować z cząsteczką O_2 dopiero po przyjęciu dwóch elektronów, a dalsza redukcja odbywa się w kolejnych dwóch jednoelektronowych etapach (39, 40). Badania kinetyczne, zwłaszcza w niskich temperaturach, pozwoliły ustalić tworzenie się kilku pośrednich form przejściowych (41). Do zbilansowania kinetyki izolowanego układu: askorbinian — cytochrom c — oksydaza cytochromowa — tlen posłużono się proponowanym przez Minnaerta „modelem IV” (42), w wersji rozszerzonej następnie przez Petersena i współpracowników (30). Przedstawiony przez Petersena model pozwolił we względnie prosty sposób wyjaśnić empiryczne równanie szybkości, w odróżnieniu od innego modelu dyskutowanego w tej samej pracy zakładającego, że cytochrom c wiąże się z oksydazą jeszcze przed reakcją enzymu z tlenem. Na podstawie badań kinetycznych dla cytochromu c i tlenu, Petersen i współpracownicy (30) doszli do przekonania, że mechanizm reakcji jest raczej prosty i nie wymaga współdziałania obu substratów.

Wiele tkanek i komórek sprawnie funkcjonuje przy całkiem niskim stężeniu tlenu, rzędu kilku mikromoli. Dlatego nawet przy stosunkowo niskim pO_2 reakcja oksydazy z tlenem przebiega szybko w czasie $T_{1/2}$ wynoszącym 3 ms, przy czym cytochrom c nie jest wymagany dla tej reakcji (32). W nieuszkodzonych mitochondriach pozorną K_m dla tlenu jest zależna od energizacji błony. Pozorna K_m dla tlenu jest wyższa w stanie 4 niż w stanie 3. Znajduje to odbicie w liczbie obrotów enzymu, która jest wtedy wyższa dla stanu 3.

III-2. Poziom równoważników redukujących

Zmiany aktywności oksydazy cytochromowej zależą od poziomu równoważników redukcyjnych pochodzących z cyklu Krebsa. Sprawność tego cyklu jest jednym z czynników kontrolujących aktywność enzymu. Innym źródłem równoważników redukcyjnych mogą być procesy oksydoredukcyjne zachodzące w cytozolu. W tym przypadku równoważniki redukcyjne są transportowane z cytozolu do mitochondriów przy udziale układów wadłowych (29). Elektrony z NAD i FAD zostają skierowane na wspólny akceptor, koenzym Q, a następnie na serię cytochromów, trafiając w końcu na cytochrom c będący substratem oksydazy cytochromowej.

Procentowa redukcja cytochromu c determinuje liczbę obrotów enzymu w warunkach deenergizacji. *In vivo* stopień redukcji cytochromu c w komórkach wynosi od 10 do 30% (43). W większości badanych przypadków cytochrom c był bardziej zredukowany w całych komórkach niż w izolowanych mitochondriach. Kinetyka enzymatycznego utleniania zredukowanego cytochromu c przebiega według założeń Michaelisa-Menten. Utworzony stechiometrycznie kompleks między cytochromem c i enzymem wykazuje stosunek molowy cytochromu c do hemu jak 1:1 (44). Kompleks cytochromu c z oksydazą charakteryzuje się mniejszą dostępnością do redukcji askorbinianem (45). Po utworzeniu się kompleksu redukcja utlenionego cytochromu c dwutunionem jest wielokrotnie wolniejsza niż to wyliczono z reakcji dwutunionu z wolnym cytochromem c. Biorąc za punkt wyjścia stałą szybkości tej reakcji można uważać oksydazę za inhibitora reakcji między utlenionym cytochromem c i dwutunionem. Prawdopodobnie kompleks o takich właściwościach jest identyczny z tzw. miejscem wiązania o wysokim powinowactwie zdefiniowanym na podstawie steady-state kinetyki cytochromu c (44).

Enzym przyjmuje równoważniki redukujące w wyniku jednoelektrowej oksydoredukcji cytochromu c. Pierwszy z równoważników redukuje żelazo hemowe cytochromu a. Podczas równomiernego przebiegu reakcji w obecności cytochromu c i askorbinianu Cu_B pozostaje całkowicie utleniona. Przy porównywaniu szybkości redukcji między cytochromem a w warunkach anaerobowych i miedzią Cu_B ta ostatnia jest redukowana dużo wolniej. Zależność kinetyczna między cytochromem a i dwoma atomami miedzi w enzymie pozostaje jak dotychczas bliżej nieokreślona (46).

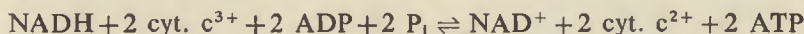
Mechanizm przenoszenia elektronów przez różne typy cytochromu c był badany z użyciem fizjologicznych i niefizjologicznych reduktorów. Wyróżnia się czynniki sprzyjające tworzeniu się kompleksu enzymatycznego zdolnego do transferu elektronów oraz czynniki kontrolujące szybkość transferu elektronów po utworzeniu kompleksu. Na tworzenie kompleksu wpływają między innymi: oddziaływania elektrostatyczne i niepolarne, ograniczenia steryczne, przekształcenia towarzyszące rozpuszczaniu, zmiany konformacyjne oraz ruchliwość białek. Czynniki kontrolujące szybkość przenoszenia elektronów mogłyby pociągać zmiany odległości między reagentami i odległości zachodzących na siebie orbitali, różnice potencjałów oksydoredukcyjnych i przekształcenia związane z rozpuszczaniem (47).

III-3. Znaczenie potencjału fosforylacyjnego $[ATP]/[ADP] [P_1]$

Proces utleniania substratów łańcucha oddechowego jest głównym źródłem energii dla układu fosforylacji oksydacyjnej. Stan równowagi przenośników w łańcuchu oddechowym jest subtelnie dostrojony do stężeń i stosunku ADP i ATP w ten sposób, że w obecności nadmiaru ADP prze-

nośniki stają się bardziej utlenione i transport elektronów ulega przyspieszeniu. Przy niskich stężeniach ADP transport elektronów ulega zwolnieniu, a przenośniki stają się bardziej zredukowane.

Zależność między poziomem równoważników redukujących (NAD^+/NADH), transportem elektronów (stopień redukcji cytochromu c) i syntezą ATP przedstawili Wilson i współpracownicy (48,49). Zależność tę można przedstawić wzorem:



Występujący w równaniu cytochrom c jest substratem oksydazy cytochromowej, która nie występuje w przedstawionym równaniu równowagi, ponieważ katalizuje reakcję nieodwracalną. Stała równowagi powyższej reakcji przedstawia się następująco:

$$K = \frac{[\text{NAD}^+]}{[\text{NADH}]} \cdot \frac{[\text{c}^{2+}]^2}{[\text{c}^{3+}]^3} \cdot \frac{[\text{ATP}]^2}{[\text{ADP}]^2 [\text{P}_i]^2}$$

Komponenty układu są w bliskiej równowadze termodynamicznej. Szybkość reakcji katalizowanej przez oksydazę (czyli szybkość oddychania) zależy bezpośrednio od stopnia redukcji cytochromu c, a czynnikiem regulującym jest potencjał fosforylacyjny.

Dane eksperymentalne potwierdziły, że przy niskiej wartości ilorazu $[\text{ATP}]/[\text{ADP}] [\text{P}_i]$ (gdy mitochondria są traktowane oligomycyną i rozprzegaczem) szybkość oddychania była proporcjonalna do redukcji cytochromu c. Po ekstrapolacji redukcji cytochromu c do 100% liczba obrotów dla cytochromu c była rzędu 70 s^{-1} , a dla cytochromu a, odpowiednio 140 s^{-1} . Przy wysokiej wartości ilorazu $[\text{ATP}]/[\text{ADP}] [\text{P}_i]$ (gdy dodano do zawiesiny mitochondrów 3 mM ATP) szybkość oddychania była hamowana przy wszystkich poziomach redukcji cytochromu c, lecz w większym stopniu, gdy cytochrom c był bardziej utleniony. W komórkach (*in vivo*) obserwuje się około 10% redukcji cytochromu c i wtedy liczba obrotów waha się od 7 s^{-1} dla niskiej wartości $[\text{ATP}]/[\text{ADP}] [\text{P}_i]$ do mniej niż 1 s^{-1} dla wysokich wartości $[\text{ATP}]/[\text{ADP}] [\text{P}_i]$. W przypadku fosforylujących mitochondriów (wysoki stosunek $[\text{ATP}]/[\text{ADP}] [\text{P}_i]$), przy 10% redukcji cytochromu c, liczba obrotów wynosi od 0,3 do $0,7 \text{ s}^{-1}$, co daje zmiany wartości stałej szybkości od 10 do 20 razy dla utlenienia zredukowanego cytochromu c.

Oprócz wpływu nukleotydów adeninowych na redukcję cytochromu c znane są także bezpośrednie oddziaływania tych nukleotydów na samą oksydazę cytochromową. ATP wpływa na pozorne potencjały oksydacyjno-redukcyjne oksydazy. Szereg autorów wykazało obniżenie wielkości tych potencjałów po dodaniu ligandów (inhibitorów, rozprzegaczy) oraz po dodaniu ATP (50, 51). Trudno powiedzieć, czy istnieje zależność między kompleksem cytochromowym c-a-a₃ i kompleksami syntetazy ATP. W myśl teorii chemiosmotycznej zależność taka nie powinna istnieć. Y ong

i King (52) postulowali kontrolę solubilizowanej oksydazy cytochromowej przez ADP. Podejmowano także próby badania właściwości liposomów zawierających oksydazę i syntetazę ATP, co mogłoby w szerszym zakresie przyczynić się do wyjaśnienia omawianego zagadnienia (53).

Mechanizm regulacji oddychania, proponowany przez Wilsona (48, 49) mimo niewątpliwych zalet, jest także krytykowany dlatego, że w niewystarczający sposób opisuje regulację związaną z funkcjonowaniem łańcucha oddechowego. Rola, jaką Wilson przypisywał oksydazie cytochromowej, nie okazała się aż tak istotna w porównaniu z innymi czynnikami kontrolnymi. Szczegóły tego zagadnienia zostały omówione w artykule Duszyńskiego (54). Określenie wpływu szeregu parametrów na oddychanie mitochondriów jako całości (55) stanowi obecnie jeden z głównych problemów badawczych w bioenergetyce. Przyjmując za jedność sumę wszystkich sił kontrolujących oddychanie Groen i współpracownicy (56) przypisali oksydazie cytochromowej wielkość wynoszącą 0,17. Wielkość ta jest dopiero trzecią co do wielkości w zestawieniu z pozostałymi wartościami sił kontrolowania.

IV. Wpływ zmian środowiska na aktywność enzymu

IV-1. Wpływ pH

Zmiany pH środowiska powodują zmiany ładunku powierzchniowego błony. Teoretyczne rozważania na powyższy temat można znaleźć w pracach przeglądowych opublikowanych między innymi w „Postęпах Biochemii” (24, 54). Zmiany pH mogą także pojawiać się lokalnie *in vivo* w pobliżu błon, w szczególności w wyniku przebiegu reakcji oksydoredukcyjnych i transportu jonów. Jest to możliwe tym więcej, że oksydaza cytochromowa spełnia rolę pompy protonowej związanej z transportem elektronów (3, 22, 57). Wykorzystanie znanych metod pomiaru ładunku i potencjału na powierzchni błon pozwoliło rozpatrywać możliwości wpływu tych parametrów fizycznych na funkcję błon, a tym samym na aktywność enzymów błonowych, do których należy oksydaza cytochromowa.

W 1976 roku doniesiono o współzależności między pH, siłą jonową (zmienne stężenia dodawanego KCl) i aktywnością oksydazy cytochromowej w błonie mitochondrialnej (58). Także badania Wilsona wykazały proporcjonalność między szybkością oddychania, redukcją cytochromu c i pH. Przy niskim stosunku $[ATP]/[ADP] [P_i]$ w wyniku dodania oligomycyny i rozprzegaczy wzrost redukcji cytochromu c był niezależny od pH w granicach 6,5—8,0. Przy wysokiej wartości stosunku $[ATP]/[ADP] [P_i]$ obserwowano wyraźną zależność szybkości oddychania od pH. Przy każdej wartości pH, niezależnie od poziomu zredukowanego cytochromu c, dodanie ATP hamowało szybkość oddychania i inhibicja ta wzrastała stop-

niowo równolegle ze wzrostem pH. Kilku autorów zajmowało się zależnością między aktywnością izolowanej oksydazy cytochromowej i pH (59, 60). Liczba obrotów enzymu i K_m wzrastają, gdy pH maleje w granicach od 8,6 do 4,6 (60). Aktywność enzymu jest niezależna od pH przy stosowaniu Tween 20 i fosfolipidów o zerowym ładunku. Natomiast polianiony, stosowane w szczególności przy niskiej sile jonowej, przesuwają optimum pH w kierunku alkalicznym (61). Obserwowano około dwukrotny wzrost utleniania przypadającego na obniżenie pH o jednostkę między pH 8 i pH 6. Względne optimum pH enzymu obniża się ze wzrostem siły jonowej (50). Stopień redukcji cytochromu c także zależy od pH i maleje ze wzrostem pH (27).

Nie tylko zmiana pH, ale także inne czynniki (detergenty, jony, fosforylacja białek błonowych) zmieniają potencjał na powierzchni błony hamując lub stymulując aktywność enzymu (24). Odbiciem tych procesów są mierzone zmiany wartości pozornych K_m . Zmiany ładunku wywołane przez fosfolipidy oraz wpływ siły jonowej i polikationów zostaną omówione w dalszej części artykułu.

IV-2. Oddziaływanie elektrostatyczne

Poznanie szeregu podstawowych właściwości cytochromu c (bierze udział w transferze elektronów łańcucha oddechowego, posiada określony skład aminokwasowy poznany bardzo wcześnie jako trzecie z kolei białko, wyosobniony w postaci krystalicznej) odwróciły niejako uwagę od jego możliwości oddziaływań elektrostatycznych i znaczenia tych oddziaływań (62).

Cytochrom c posiada na swej powierzchni 19 dobrze rozpoznanych reszt lizylowych. Zmodyfikowane cząsteczki cytochromu c, w szczególności preparaty zawierające jednopodstawione grupy lizylowe były używane jako substraty oksydazy cytochromowej (63—67). Udział zmodyfikowanych cytochromów c w transferze elektronów był bardzo zróżnicowany. Ciekawe wyniki otrzymano również, gdy porównano zachowanie się zmodyfikowanych cytochromów c w kompleksach z ich membranowymi partnerami, w tym z oksydazą cytochromową. Okazało się, że wymiana elektronów w cytochromie c ma miejsce przy krawędzi hemu albo w jego bliskości i przepływ elektronów z innej części powierzchni białka jest mało prawdopodobny (68). Wszystkie pochodne cytochromu c o podstawionych resztach lizylowych obniżają aktywność enzymatyczną. Obliczony moment dipolowy tych białek był duży (ponad 300 debey), a dodatni odcinek osi dipola przecinał przednią powierzchnię białka dokładnie w obszarze transferu elektronów (69). Mitochondrialni partnerzy cytochromu c wykazują ładunek ujemny i przez to są prawidłowo ukierunkowani względem cytochromu c przez działające siły elektrostatyczne w procesie

transferu elektronów. Natomiast zmodyfikowane chemicznie cytochromy *c* mają dipole ustawione nieprawidłowo. Dipole ustawione nieprawidłowo wykazują zmienną siłę oddziaływania. Orientacja przestrzenna jaką zmodyfikowane cytochromy *c* przyjmują po zbliżeniu się do partnera jest też nieprawidłowa. Potrzeba wówczas dodatkowej pracy do obrotu zmodyfikowanej cząsteczki cytochromu *c* w polu elektrycznym o taki kąt, aby możliwy był sprawny przepływ elektronów. Ta dodatkowa praca podwyższa energię aktywacji enzymu i obniża jego aktywność (69). Pochodne uzyskane w wyniku modyfikacji wewnętrznego obszaru cząsteczki cytochromu *c* bardziej hamowały przepływ elektronów niż te cząsteczki zmodyfikowanego cytochromu *c*, które traciły aktywność jedynie w wyniku zmiany orientacji dipola.

Oksydaza cytochromowa reaguje w sposób zróżnicowany ze związkami chemicznymi o różnych ładunkach. O znaczeniu praktycznym takich badań świadczą prace z grupą leków anestetyków (36). Niejonowe anestetyki nie wykazywały w badanych warunkach wpływu na aktywność oksydazy, podczas gdy kationowe anestetyki wykazywały inhibicję mieszanego typu. W innych badaniach, stosując nefizjologiczne reduktanty wykazano, że nieenzymatyczna redukcja oksydazy cytochromowej przebiega inaczej ze związkami posiadającymi ładunek ujemny niż ze związkami niejonowymi. I tak ujemne jony podsiarczynu (dwutlionianu) wykazują w procesie redukcji enzymu większą dostępność do cytochromu a_3 . Zredukowana 5,10-dwuhydro-5-metylofenazyna, nie wykazująca ładunku, reaguje szybciej z cytochromem *a* niż z cytochromem a_3 (70). Wyniki te są w pewnej sprzeczności z badaniami innych autorów (71, 72, 73). Ogólnie przyjmuje się, że w obecności reduktantów cytochrom *a* jest redukowany jako pierwszy, przed cytochromem a_3 . Nie wyklucza się udziału w tej reakcji Cu_A jako pierwszego reagenta oksydazy cytochromowej w procesie redukcji (1). Cu_A i cytochrom *a* znajdują się względem siebie w równowadze oksydacyjno-redukcyjnej. Dla szeregu różnych białek, posiadający właściwości oksydacyjno-redukcyjne, stała szybkości w reakcji z jonami podsiarczynowymi jest drugiego rzędu (71).

IV-3. Znaczenie siły jonowej

Cytochrom *c* jest białkiem zasadowym wykazującym ładunek dodatni w środowisku obojętnym i w konsekwencji tego łatwo reaguje z anionami (74). Powinowactwo, stechiometrię wiązania jonów i przestrzenne rozmieszczenie ładunku badano różnymi technikami. W szczególności określono wpływ anionów na potencjał redukcyjny cytochromu *c* (75) i na interakcję natywnych oraz zmodyfikowanych cytochromów *c* z oksydazą cytochromową (21). Reszty lizylowe w białkach o kationowym charakterze części ich powierzchni biorą udział w procesie wiązania anionów (chlor-

ków, fosforanów, cytrynianów). O s h e r o f f i współpracownicy (76) wyróżniają w cytochromie *c* szereg miejsc wiążących różne aniony. W wiązaniu cytochromu *c* z oksydazą cytochromową uczestniczą reszty lizylowe: 8, 13, 72—73, 86 i 87. W przedstawionym obrazie przestrzennym cytochromu *c* reszty te usytuowane są w przedniej i górnej lewej części cząsteczki, a pozostałe w mniejszym stopniu lub wcale nie uczestniczą w tworzeniu kompleksu enzym — substrat (76).

Rodzaj buforu ma również wpływ na reakcję cytochromu *c* z reduktantami (77, 78). Znane są też wzajemne oddziaływania makrokationów i makroanionów na blokowanie aktywności oksydazy cytochromowej i na odwracanie tej inhibicji (80). Cytochrom *c* wiąże się także z różnymi jonami. Dlatego dokładnie badano szybkość utleniania cytochromu *c* w niewiążącym buforze *Tris* — kwas kakodylowy jak i wpływ siły jonowej na pozorną stałą równowagi (81, 82).

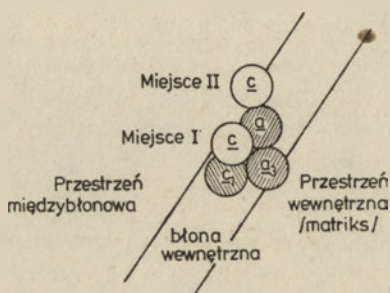
Podobnie jak zasadowy cytochrom *c* wiąże się łatwo z anionami, tak oksydaza cytochromowa, będąca białkiem kwaśnym, wiąże kationy. Polikationy stosowane w postaci polilizyn o różnych masach cząsteczkowych okazały się efektywnymi inhibitorami enzymu (83, 84). Polikationy konkurują z cytochromem *c* o ujemne elektrycznie miejsce wiązania w oksydazie cytochromowej i obniżają aktywność enzymu (85).

Nie tylko rodzaj jonów odgrywa rolę w interakcji cytochromu *c* z oksydazą cytochromową, ale także wartościowość i ilość jonów w roztworze. Dlatego od siły jonowej środowiska zależy przebieg szeregu procesów i ich końcowy efekt. Wszystkie reakcje oksydacyjno-redukcyjne są wrażliwe na zmiany siły jonowej (79). Wielkość siły jonowej wpływa na wartość parametrów fizycznych (potencjały) (75) i kinetycznych (86, 87, 88). Z obniżeniem siły jonowej rośnie stabilność kompleksu cytochromu *c* — oksydaza cytochromowa (89, 90). Duża zbieżność wyników badań nad enzymem związanym z błoną w tych samych warunkach siły jonowej pozwala wnioskować, że *in vivo* oksydaza jest umiejscowiona w polianionowych miejscach błony mitochondrialnej (60).

Stwierdzono, że od wielkości siły jonowej zależy możliwość wykazania dwóch miejsc wiązania cytochromu *c* przez oksydazę cytochromową. Przy niskiej sile jonowej określono parametry kinetyczne (K_m , V_{max}) obu miejsc charakteryzujące zróżnicowane powinowactwo oksydazy cytochromowej do cytochromu *c*. W tych warunkach uzyskane parametry kinetyczne, określone metodami spektrofotometrycznymi i polarograficznymi, różniły się od siebie (91). Natomiast zwiększenie siły jonowej buforu fosforanowego zacierало te różnice (20, 74). Zdaniem Nichollsa i współpracowników (26) oba miejsca w oksydazie wiążące cytochrom *c* znajdują się wyłącznie w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Ryc. 2). Cytochrom *c* związany w tzw. miejscu silnie wiążącym ma dostęp do obu centrów oksydazy cytochromowej czyli do cytochromu *a* i cytochromu a_3 ,

podczas gdy cytochrom *c* luźno związany z enzymem ma dostęp tylko do centrum katalitycznego cytochromu *a*.

Te i inne rozważania przyczyniły się do zaproponowania prostego modelu elektrostatycznego reakcji cytochromu *c* z oksydazą (62). Związana w błonie oksydaza cytochromowa wykazuje ładunek ujemny a cytochrom *c* ładunek dodatni. Ilościowy udział obu form cytochromu *c* (związanego z błoną i w formie rozpuszczalnej) zależy od siły jonowej. Przy niskiej sile jonowej postać związana z błoną będzie uprzywilejowana, a przy wysokiej



Ryc. 2. Przypuszczalne rozmieszczenie dwóch miejsc wiążących cytochrom *c* w oksydazie cytochromowej. Miejsce silnie wiążące (I) i luźno wiążące (II) (wg 26).

sile jonowej uprzywilejowana będzie postać rozpuszczalna. Przy każdej wartości siły jonowej zachodzi proporcjonalność między ilością cytochromu *c* związanego z błoną a jego ilością całkowitą w komórce. Cytochrom *c* związany z błoną wykazuje uprzywilejowaną orientację wobec transferu elektronów poprzez udział jego dipola. Związanie do enzymu pierwszej cząsteczki cytochromu *c* jest silniejsze niż związanie drugiej cząsteczki. Będzie ona zakłócać oraz obniżać pole elektrostatyczne układu. W następstwie tego obniżenia możliwość związania drugiej cząsteczki cytochromu *c* do miejsca aktywnego w enzymie jest odpowiednio zmniejszona (36, 62). Jedynym założeniem koniecznym w tym modelu jest to, że elektrostatyczne oddziaływanie jednej cząsteczki związanego cytochromu *c* wobec możliwości związania następnej winna się charakteryzować wystarczająco dużym obniżeniem wartości stałej miejsca wiązania.

V. Inhibitory

Stosowanie inhibitorów umożliwia szczegółową analizę regulacji poszczególnych etapów szlaków metabolicznych (29). Istnieją cztery kategorie inhibitorów oksydazy cytochromowej (50):

- 1) inhibitory kompetycyjne względem tlenu (CO i być może NO);
- 2) inhibitory wiążące się z hemem niekompetycyjnie wobec tlenu i cytochromu *c* (HCN, N₃H, hydroksylamina, H₂S, F⁻, mrówczan);
- 3) inhibitory niekompetycyjne nie oddziałujące na grupy hemowe

(jony fosforanowe, zasadowe wartości pH i być może związki grupy SH);
4) inhibitory kompetycyjne względem cytochromu c (kationy, polikationy).

Inhibitory ostatnich dwu kategorii omówiono w poprzednim rozdziale. Inhibitory dwu pierwszych kategorii zalicza się do tzw. ligandów hemowych. Dostarczają one najwięcej bezpośrednich informacji o mechanizmie reakcji katalizowanej przez oksydazę. Ponadto do inhibitorów oksydazy cytochromowej można zaliczyć jeszcze związki hamujące działanie oksydazy jako pompy protonowej (19,92).

Różne aspekty badań wpływu inhibitorów na oksydazę cytochromową (93-99) stanowią obszerną dziedzinę, która mogłaby być treścią osobnego opracowania. Różnorodne zastosowanie i wykorzystanie inhibitorów przyczyniło się do znacznego postępu w badaniach struktury i funkcji oksydazy cytochromowej. Faktem jest, że wszystkie wymienione inhibitory są związkami obcymi dla ustroju i wytworzonymi poza ustrojem. Jedynym wyjątkiem może być mrówczan, który hamuje aktywność oksydazy w mitochondriach, w cząstkach przenoszących elektrony oraz w rozpuszczalnej oksydazie (99). Nie wdając się w dyskusję nad mechanizmem tego działania, warto się zastanowić, czy mrówczan może działać jako fizjologiczny inhibitor oksydazy cytochromowej. Ze znanych ligandów mrówczan jest jedynym, którego ilość w ustroju może być zmienna, może ulegać znacznym wahaniom i przenika przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. W warunkach normalnych jest on metabolizowany do formyloczterohydrofolianu albo utleniany do CO_2 pośrednio przez bakterie lub peroksydacyjnie przez H_2O_2 i katalazę u niektórych ssaków. Katalaza, jak i oksydaza cytochromowa, należą do białek hemowych, a model inhibicji oksydazy cytochromowej przypomina inhibicję katalazy. Przypuszcza się, że mrówczan łączy się w postaci niezdysojowanego kwasu w szóstej pozycji koordynacyjnej żelaza cytochromu a_3 dając kompleks podobny jak z katalazą. Mrówczan, jako jedyny inhibitor w warunkach niepatologicznych, może pojawiać się w podwyższonym stężeniu w ustroju, lecz trudno sądzić, by znacznie związał enzym *in vivo*. Taki pogląd przyjęto na podstawie obserwacji wpływu mrówczanu na katalazę, w miarę jak pH wątroby obniżało się post mortem. Przy spadku pH zwiększa się inhibicja oksydazy przez mrówczan. Nie jest jednak prawdopodobne, aby mrówczan mógł osiągnąć stężenie milimolowe wymagane do związania enzymów zawierających żelazo, nie mówiąc już o tym, że dwudziestokrotnie wyższy poziom jest wymagany do blokowania w pełni aktywnego układu.

VI. Rola środowiska lipidowego

Znana jest od dawna regulacyjna rola fosfolipidów w oznaczaniu aktywności mitochondrialnych enzymów związanych z błoną (100, 101,

102). Równolegle z rozwojem wiedzy o funkcji i strukturze oksydazy cytochromowej wzrosła wiedza o wpływie fosfolipidów w regulacji aktywności tego enzymu. Powszechnie wiadomo, że po wyizolowaniu enzymu z błony mitochondrialnej dla przywrócenia jego aktywności w przenoszeniu elektronów konieczne są fosfolipidy (103) lub niedenaturujące detergenty (104, 105, 106). Tylko kilka ze znanych fosfolipidów jest silnie związanych z enzymem, a pozostałe łatwo podlegają wymianie. Enzym pozbawiony części fosfolipidów traci kilkadziesiąt procent swej aktywności (1, 107). Wysunięto różne poglądy na rolę, jaką spełniają lipidy i fosfolipidy w funkcjonowaniu enzymów łańcucha oddechowego (108). Fosfolipidy tworzą kompleksy z substratem oksydazy cytochromowej (109), oddziałują na środowisko (60), powodują zmiany płynności środowiska w zależności od rodzaju obecnych lub dodanych fosfolipidów (110), wpływają na właściwości fizyczne białek (111) i na podjednostki oksydazy (112), a także na wielkość ładunku (92).

Niespecyficzne działanie fosfolipidów na funkcjonowanie oksydazy cytochromowej wyjaśnia anionowy charakter fosfolipidów (fosfolipidy kwaśne) lub właściwości jonu obojnego (110). Zaobserwowano ostatnio zbieżność między aktywującym wpływem fosfolipidów na oksydazę i właściwościami spektroskopowymi enzymu. Wykazano, że fosfolipidy wpływają na równowagę różnych stanów konformacyjnych oksydazy cytochromowej (39, 60).

Obserwowany *in vitro* drastyczny wpływ fosfolipidów na zachowanie się oksydazy cytochromowej wątpliwy jest w badaniach *in vivo*. Dotychczas brak odpowiedzi na pytanie, czy w wewnętrznej błonie mitochondrialnej są obszary stymulujące lub hamujące funkcjonowanie enzymu.

VII. Allosteryczna interakcja między katalitycznymi centrami enzymu

Oksydaza cytochromowa może występować w więcej niż jednej konformacji (113). Dotychczas zostały opisane dwie konformacje utlenionego enzymu. Jedną z nich nazwano stanem spoczynkowym (*resting*) drugą — stanem pulsującym (*pulsed* albo *oxygenated*). Taki opis enzymu nazwano modelem Antoniniego (114). Brudvig i współpracownicy (115) są zdania, że enzym może też występować w trzeciej konformacji, oznaczonej jako „g 12”, a wykrytej przy zastosowaniu rezonansu paramagnetycznego (EPR). Każda z konformacji enzymu różni się właściwościami wiązania ligandów w miejscu $a_3 - Cu_B$ (115).

Dla uproszczenia opisu mechanizmu działania enzymu przyjmuje się jego występowanie w dwóch stanach: spoczynkowym i pulsującym. Enzym w obu wymienionych stanach można scharakteryzować przez różniące się parametry spektroskopowe, strukturalne i kinetyczne (4). Obie struktury enzymu zachowują katalityczne właściwości oksydazy. W wyniku pełnego

utlenienia cząsteczki enzym przybiera konformację spoczynkową. Konformację pulsującą zaś po ekspozycji na tlen molekularny uprzednio całkowicie zredukowanej cząsteczki białka oksydazy. Enzym w konformacji spoczynkowej reaguje z tlenem powoli, natomiast w konformacji pulsującej reaguje szybko i dlatego katalitycznie jest efektywniejszy. Efektywniejsze jej działanie znalazło odbicie w wartościach stałych szybkości reakcji. Napływające elektrony redukują enzym który może albo reagować z tlenem, albo przechodzić z formy spoczynkowej w pulsującą jeszcze przed reakcją z tlenem. Także w toku reakcji enzym przechodzić może z jednej konformacji w drugą, a dotyczy to tak oksydazy rozpuszczalnej jak i związanej z błoną. *In vivo* na ogół oksydaza występuje w stanie pulsującym. Wcześniejsze badania L e m b e r g a (116) dotyczące oksydazy spoczynkowej jak i badania innych autorów z użyciem inhibitorów (117, 118) sugerują, że oksydaza cytochromowa ma cechy układu allosterycznego. W spoczynkowym stanie enzymu utleniony cytochrom a_3 wolno reaguje z inhibitorami, chociaż jest to ten komponent, który wiąże ligandy. Powolny przebieg reakcji zależy od stanu oksydacyjno-redukcyjnego innych miejsc w enzymie. Podsiarczyny sodowy redukuje szybciej cytochrom a podczas gdy redukcja cytochromu a_3 postępuje wolniej. Powolna reakcja enzymu spoczynkowego z tlenem zależy prawdopodobnie od interakcji między cytochromem a_3 i Cu_B . Na podstawie danych doświadczalnych Nicholls i współpracownicy (34, 46) przedstawili hipotezę opisującą allosteryczną interakcję między centrami katalitycznymi enzymu. Według ich założeń oba cytochromy a i a_3 mają porównywalne powinowactwo do elektronów w enzymie spoczynkowym. Redukcja jednego z centrów prowadzi do zmiany strukturalnej drugiego centrum i obniża jego powinowactwo do elektronów. Dlatego w częściowo zredukowanym enzymie utlenione centrum wykazuje niższy potencjał niż w enzymie spoczynkowym, nie poddanym częściowej redukcji (110). W związku z proponowanym modelem allosterycznym nasuwa się pytanie, czy znane są odpowiednie efekторы allosteryczne. O ile są, to dotychczas nie zostały zidentyfikowane.

VIII. Uwagi końcowe

W niniejszym artykule omówiono główne czynniki mogące wpływać na aktywność oksydazy cytochromowej. Większość z nich została sprawdzona w badaniach *in vitro*. Ich znaczenie *in vivo* jest nieraz krytykowane. W omówieniu pominięto zagadnienia regulacji syntezy enzymu i jego pełnej sprawności. Sprawność ta wcale nie jest tak oczywista, jak milcząco zakładamy. Skutki nieprawidłowej struktury enzymu mogą być przyczyną nieprzewidzianych perturbacji związanych z wolniejszą i niecałkowitą redukcją cząsteczki tlenu. Przy niesprawnym działaniu enzymu może na-

stąpić uwolnienie częściowo tylko utlenionych pośredników (nadtlenków, ponadtlenków, rodników hydroksylowych). Wtedy zdolność układu utleniania nie będzie w pełni wykorzystana, a termodynamiczna wydajność oddychania obniżona. Z natury reaktywne pośredniki utleniania mogą stać się źródłem uszkodzenia komórki. Ma to znaczenie zwłaszcza u osobników starszych, u których system redukujący tlen jest z reguły mniej sprawny (39). niesprawny układ utleniania jest także mniej wydajny w utlenianiu obcych substancji chemicznych, często niepożądanych, pojawiających się w ustroju w wyniku narastającego zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Nie mniejsze znaczenie ma sprawny układ oksydacyjno-redukcyjny w metabolizowaniu leków (36).

Przedstawione parametry regulujące aktywność oksydazy cytochromowej dotyczyły w większości badań *in vitro*, a nie *in vivo*. Oksydaza cytochromowa będąca enzymem związanym z błoną ogranicza w pewnym sensie badania *in vivo*. Enzym ten odgrywa też ogólniejszą rolę regulacyjną membranowych układów oksydacyjno-redukcyjnych. Do jednych z czynników mogących mieć regulacyjny wpływ na aktywność enzymów wbudowanych w błony biologiczne należy oddziaływanie elektrostatyczne i związane z nim zmiany ładunku powierzchniowego błon (119, 120). Nicholls (99) uważa, że funkcjonowanie oksydazy *in vivo* zależy tylko od poziomu obu substratów, cytochromu c i tlenu, oraz od stanu energizacji błony mitochondrialnej. Jest to układ dynamiczny, zmieniający się w określonych granicach w zależności od zaistniałych warunków.

Zaakceptowano do druku 7.03.1984

PIŚMIENNICTWO

1. Azzì A., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **594**, 231—252.
2. Azzì A., Casey R. P., (1979), *Mol. Cel. Biochem.*, **28**, 169—184.
3. Wikström M., Krab K., Saraste M., (1981), *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 623—655.
4. Brunori M., Wilson M. T., (1982), *Trends in Biochemical Sciences*, **7**, 295—299.
5. Bely M., Tanka D., (1982), *Act. Morph. H.*, **30**, 261—269.
6. Laskowska-Klita T., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 261—278.
7. Darley-Usmar V. M., Capaldi R. A., Wilson M. T., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **4**, **103**, 1223—1230.
8. Nicholls P., Kimelberg H. K., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **162**, 11—21.
9. Nicholls P., (1974), w *Dynamics of Energy-Transducing Membranes*, wyd. Ernster L., Estabrook R., Slater E. C., 39—50, Elsevier Amsterdam.
10. Rieder R., Bosshard H. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4732—4739.
11. Ludwig B., Gibson Q. H., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10092—10098.
12. Ludwig B., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **594**, 177—189.
13. Merle P., Kadenbach B., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **105**, 499—507.

14. Kadenbach B., Jarasch J., Hartmann R., Merle P., (1983), *Anal. Chem.*, **129**, 517—521.
15. Harmon H. J., Hall J. D., Crane F. L., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **344**, 119—255.
16. Kadenbach B., Merle P., (1981), *FEBS Letters*, **135**, 1—11.
17. Saraste M., Penttilä T., Wikström M., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **115**, 261—268.
18. Winter D. W., Bruyninckx W. J., Foulke F. G., Grinich N. P., Mason H. S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11408—11414.
19. Prochaska L. J., Bisson R., Capaldi R. A., Steffens G. C. M., Buse G., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **637**, 360—373.
20. Bisson R., Steffens G. C. M., Capaldi R. A., Buse G., (1982), *FEBS Letters*, **144**, 359—363.
21. Ferguson-Miller S., Brautigan D. L., Margoliash E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 149—159.
22. Casey R. P., Broger C., Azzi A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **638**, 86—93.
23. Koj A., (1973), *Wszechświat*, **3**, 57—61.
24. Nałęcz M. J., Wojtczak L., (1983), *Post. Biochem.*, **28**, 191—225.
25. Nicholls P., (1972), w *Biochemistry and Biophysics of Mitochondrial Membranes*, str. 17—32, Academic Press, Inc., New York and London.
26. Nicholls P., Hildebrandt V., Hill B. C., Nicholls F., Wrigglesworth J. M., (1980), *Can. J. Biochem.*, **58**, 967—977.
27. Davies H. C., Smith L., Nava M. E., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **210**, 49—55.
28. Machoy Z., Gałka G., (1978), *12th FEBS Meeting*, Dresden, Abstracts No 1715.
29. Bryła J., (1981), *Regulacja metabolizmu komórki*, PWN Warszawa str. 1—596.
30. Petersen L. C., Nicholls P., Degn H., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 59—65.
31. Greenwood C., Gibson Q. H., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1782—1787.
32. Gilmour M., Lemberg R., Chance B., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 37—51.
33. Greenwood C., Wilson M. T., Brunori M., (1974), *Biochem. J.*, **137**, 205—215.
34. Nicholls P., Petersen L. C., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **357**, 462—467.
35. Gibson Q. H., Greenwood C., (1963), *Biochem. J.*, **86**, 541—554.
36. Signer M. A., (1980), *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 2651—2655.
37. Lindsay J. G., Owen C. S., Wilson D. F., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 492—505.
38. Erecińska M., Wilson D. F., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **188**, 1—14.
39. Malmström Bo G., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 281—303.
40. Malmström Bo G., (1983), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364**, 198—199.
41. Chance B., Saronio C., Leigh J. S. Jr., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9226—9237.
42. Minnaert K., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 23—34.
43. Wilson D. F., Stubbs M., Veech R. L., Erecińska M., Krebs H. A., (1974), *Biochem. J.*, **140**, 57—64.
44. Nicholls P., (1964), *Arch. Biochem. Biophys.*, **106**, 25—48.
45. Petersen L. C., Cox R. P., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **105**, 321—327.
46. Nicholls P., Chanady G. A., (1982), *Biochem. J.*, **203**, 541—549.
47. Cusanovich M. A., (1978), *Front. Biol. Energ.*, red. Dutton P. L., Leigh J. S., Scarpa A., Academic Press, New York.

48. Wilson D. F., Stubbs M., Oshino N., Erecińska M. (1974), *Biochemistry*, **13**, 5305—5311.
49. Wilson D. F., Owen C. S., Holian A., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 749—762.
50. Nicholls P., Chance B., (1974), *Molecular Mechanism of Oxygen Activation*, 479—534, Academic Press, INC.
51. Wilson D. F., Dutton P. L., (1970), *Arch. Biochem., Biophys.*, **136**, 583—585.
52. Yong F. C., King T. E., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **47**, 310.
53. Jasaitis A. A., Nemecek I. B., Severina I. I., Skulachev V. P., Smirnova S. M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 485—490.
54. Duszyński J., (1983), *Post. Biochem.*, **29**, 17—32.
55. Jacobus W. E., Moreadith R. W., Vandegaer K. L., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2397—2402.
56. Groen A. K., Wanders R. J. A., Westerhoff H. V., van der Meert R., Tager J. M., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2754—2757.
57. Sigel E., Carafoli E., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **89**, 119—123.
58. Douzou P., Maurel P., (1976), *C. R. Acad. Sc. Paris, Série D*, **282**, 2107—2110.
59. Yonetani T., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 1680—1688.
60. Wilms J., Van Rijn J. L. M. L., Van Gelder B. F., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **593**, 17—23.
61. Maurel P., Douzou P., Waldmann J., Yonetani T., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **525**, 314—324.
62. Margoliash E., Bosshard H. R., (1983), — w przygotowaniu.
63. Brautigan D. L., Ferguson-Miller S., Margoliash E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 130—139; 140—148; 149—159.
64. Smith H. T., Staudenmayer N., Millett F., (1977), *Biochemistry*, **16**, 4971—4974.
65. Smith M. B., Stonehuerner J., Ahmed A. J., Staudenmayer N., Millett F., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **592**, 303—313.
66. Osheroff N., Brautigan D. L., Margoliash E., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8245—8251.
67. Boon P. J., Van Raay A. J. M., Tesser G. I., Nivard R. J. F., (1979), *FEBS Letters*, **108**, 131—135.
68. Takano T., Kallai O. B., Swanson R., Dickerson R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5234—5255.
69. Koppenol W. H., Margoliash E., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4426—4437.
70. Halaka F. G., Babcock G. T., Dye J. L., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1084—1087.
71. Jones G. D., Jones M. G., Wilson M. T., Brunori M., Colosimo A., Sarti P., (1983), *Biochem. J.*, **209**, 175—182.
72. Yonetani T., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 3138—3143.
73. Machoy Z., Gałka G., Ogoński T., Stępińska A., (1980), First European Bioenergetics Conference Urbino, Italy, 381—382.
74. Nicholls P., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **346**, 261—310.
75. Margalit R., Schlejter A., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **32**, 492—499.
76. Osheroff N., Brautigan D. L., Margoliash E., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 4439—4443.
77. Brooks S. P. J., Chanady G. A., Nicholls P., (1982), *Can. J. Biochem.*, w druku.
78. Brooks S. P. J., (1980), rozprawa doktorska, Brock University, St. Catharines, Ontario, Canada.
79. Brooks S. P. J., Nicholls P., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **680**, 33—43.

80. Person F., Mora P., Fine A., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 4103—4107.
81. Peterman B. F., Morton R. A., (1977), *Can. J. Biochem.*, **55**, 796—803.
82. Schejter A., Morgalit R., (1970), *FEBS Letters*, **10**, 179—181.
83. Mochan B. S., Elliott W. B., Nicholls P., (1973), *Bioenergetics*, **4**, 321—345.
84. Davies H. C., Smith L., Wasserman A. R., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 238—246.
85. Smith L., Minnaert K., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **105**, 1—14.
86. Petersen L. C., Cox R. P., (1980), *Biochem. J.*, **192**, 687—693.
87. Smith H. T., Ahmed A. J., Millett F., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 4984—4990.
88. Yamazaki I., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 224—229.
89. Ferguson-Miller S., Brautigan D. L., Margoliash E., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1104—1115.
90. Wilms J., Veerman E. C. I., König B. W., Dekker H. L., Van Gelder B. F., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **635**, 13—24.
91. Smith L., Davies H. C., Nava M. E., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3140—3146.
92. Casey R. P., Thelen M., Azzi A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3994—4000.
93. Van Buuren K. J. H., Nicholls P., Van Gelder B. F., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **256**, 258—276.
94. Nicholls P., Van Buuren K. J. H., Van Gelder B. F., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 279—287.
95. Nicholls P., Hildebrandt V., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **504**, 457—460.
96. Nicholls P., (1979), *Biochem. J.*, **183**, 519—529.
97. Machoy Z., (1981), *Post. Biochem.*, **27**, 327—337.
98. Nicholls P., Kim J. K., (1982), *Can. J. Biochem.*, **60**, 613—623.
99. Nicholls P., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **430**, 13—29.
100. Fleischer S., Brierly G., Klouwen H., Slaterback D. B., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 3264—3272.
101. Tzagoloff A., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5020—5026.
102. Nohl H., (1979), *Z. Gerontologie*, **12**, 9—18.
103. Robinson N. C., Strey F., Talbert L., (1980), *Biochemistry*, **19**, 3656—3661.
104. Rosevear P., Van Aken T., Baxter J., Ferguson-Miller S., (1980), *Biochemistry*, **19**, 4108—4115.
105. Robinson N. C., Capaldi R. A., (1977), *Biochemistry*, **16**, 375—380.
106. Wojtczak L., Załuska H., Wroniszewska A., Wojtczak A., (1972), *Acta Biochem. Pol.*, **19**, 227—234.
107. Yu C., Yu L., King T. E., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1383—1392.
108. Lenaz G., (1979), w *Subcellular Biochemistry*, wyd. Roodyn D. B., Vol. 6, 233—343, Plenum Publishing Corp., New York.
109. Reich M., Wainio W. W., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 3058—3061.
110. De Cuyper M., Joniau M., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 397—405.
111. Montecucco C., Smith G. A., Dabbeni-sala F., Johannsson A., Galante Y. M., Bisson R., (1982), *FEBS Letters*, **144**, 145—148.
112. Bisson R., Montecucco C., Gutweniger H., Azzi A., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9962—9965.
113. Muijsers A. O., Tiesjema R. H., Van Gelder B. F., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **234**, 481—492.
114. Antonini E., Brunori M., Colosimo A., Greenwood C., Wilson M. T., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 3128—3132.

115. Brudvig G. W., Stevens T. H., Morse R. H., Chan S. I., (1981), *Biochemistry*, **20**, 3912—3921.
116. Lemberg M. R., (1969), *Physiol. Rev.*, **49**, 48—121.
117. Nicholls P., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **396**, 24—35.
118. Nicholls P., Petersen L. C., Miller M., Hansen F. B., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 188—196.
119. Wojtczak L., Nałęcz M. J., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **94**, 99—107.
120. Wojtczak L., Famulski K. S., Nałęcz M. J., Zborowski J., (1982), *FEBS Letters*, **139**, 221—224.

JULIAN ŚWIERCZYŃSKI *)

Rola enzymu jabłczanowego w metabolizmie mięśni szkieletowych

Role of malic enzyme in skeletal muscle metabolism

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Subkomórkowe występowanie enzymu jabłczanowego w tkankach zwierzęcych**
- III. Fizjologiczna rola enzymu jabłczanowego**
- IV. Enzym jabłczanowy z mięśni szkieletowych**
 - IV-1. Rozmieszczenie subkomórkowe**
 - IV-2. Właściwości cytoplazmatycznego i mitochondrialnego enzymu jabłczanowego**
 - IV-3. Rola cytoplazmatycznego enzymu jabłczanowego w resyntezie glikogenu z mleczanu w mięśniu szkieletowym**
 - IV-4. Anaplerotyczne działanie cytoplazmatycznego enzymu jabłczanowego**
 - IV-5. Rola mitochondrialnego enzymu jabłczanowego w produkcji pirogronianu z jabłczanu**
 - IV-6. Rola mitochondrialnego enzymu jabłczanowego w przemianie szkieletu węglowego niektórych aminokwasów do alaniny**
- V. Podsumowanie**

Contents

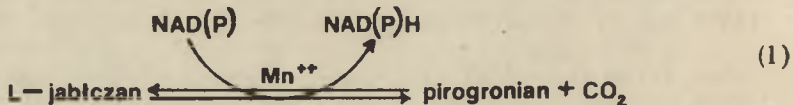
- I. Introduction**
- II. Intracellular distribution of malic enzyme in animal tissues**
- III. Physiological functions of malic enzyme**
- IV. Malic enzyme in skeletal muscle**
 - IV-1. Intracellular distribution**
 - IV-2. Properties of cytoplasmic and mitochondrial malic enzyme**
 - IV-3. Cytoplasmic malic enzyme and the synthesis of glycogen from lactate in skeletal muscle**
 - IV-4. Anaplerotic function of cytoplasmic malic enzyme**
 - IV-5. Role of mitochondrial malic enzyme in the production of pyruvate from malate**
 - IV-6. Role of mitochondrial malic enzyme in the conversion of the carbon skeleton of some amino acids to alanine**
- V. Summary**

*) Dr, Zakład Biochemii, IBM, Akademia Medyczna, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
Autor uczestniczy w realizacji Problemu MR II.1.2.4 koordynowanego przez
Polską Akademię Nauk

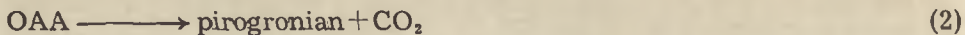
Wykaz skrótów i objaśnienia: PEP-fosfoenolopirogronian, OAA-szczawiooctan, CCCP-karbonylocyjanekchlorofenylohydrazonu, Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa (EC. 4.11.32 karboksylaza GTP:szczawiooctan (transfosforylująca)), Syntaza cytrynianowa (EC. 4.1.3.7 szczawiooctan-liaza cytrynianu (acetylująca CoA)), Dehydrogenaza jabłczanowa (EC. 1.1.1.37 oksydoreduktaza L-jabłczan:NAD), Karboksylaza pirogronianowa (EC. 6.4.1.1. ligaza pirogronian:dwutlenek (ADP)), Liaza adenylobursztynianowa (EC. 4.3.2.2. AMP-liaza adenylobursztynianu), Aminotransferaza alaniinowa (EC. 2.6.1.2 aminotransferaza L-alanina:2-oksoglutaran), Dehydrogenaza glutaminianowa (EC. 1.4.1.2 oksydoreduktaza L-glutaminian:NAD (dezaminująca))

I. Wstęp

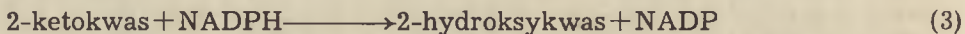
Ochoa i współpracownicy (1) opisali w roku 1947 enzymatyczną dekarboksylację L-jabłczanu do pirogronianu i CO_2 katalizowaną przez ekstrakty wątroby gołębia. Enzym katalizujący tę reakcję nazwano enzymem jabłczanowym (*malic enzyme*). Określenie to jest obecnie szeroko stosowane, chociaż w piśmiennictwie spotyka się inne nazwy jak: zależna od NADP dehydrogenaza jabłczanowa lub dehydrogenaza jabłczanowa dekarboksylująca. Reakcję katalizowaną przez enzym jabłczanowy można zapisać następująco (Reakcja 1):



Najbardziej efektywnym aktywatorem tej reakcji są jony manganawe (2—6), które mogą być zastąpione przez: Co^{++} , Mg^{++} , Ni^{++} , Cd^{++} (2, 4—6). Krystaliczny enzym jabłczanowy otrzymany z wątroby gołębia (7, 8) oprócz reakcji dekarboksylacji jabłczanu do pirogronianu i CO_2 , katalizuje dekarboksylację szczawiooctanu zgodnie z równaniem (Reakcja 2):



oraz redukcję 2-ketokwasów w obecności NADPH według równania (Reakcja 3):

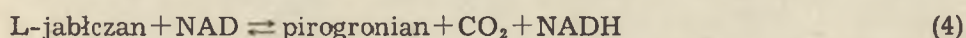


Enzym jabłczanowy otrzymany z wielu tkanek zwierzęcych dekarboksyluje jabłczan przy udziale NADP (2—13), natomiast enzym izolowany z bakterii zarówno przy udziale NADP jak i NAD (14,15). Kilka lat temu stwierdzono aktywność zależnego od NAD enzymu jabłczanowego w mitochondriach izolowanych z serca królika (6, 16) i kory nadnerczy (17—19). Obecnie wiadomo, że ta forma enzymu jabłczanowego występuje także w innych tkankach zwierzęcych (20, 21) oraz ludzkich (22). Ponadto wykazano, że zależny od NADP enzym jabłczanowy izolowany z mitochondriów (23) oraz cytoplazmy mięśni szkieletowych szczura katalizuje w od-

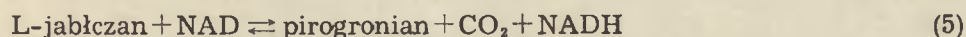
powiednich warunkach oksydacyjną dekarboksylację jabłczanu w obecności NAD.

Z przytoczonych danych wynika, że enzym jabłczanowy może katalizować kilka reakcji. W związku z tym, Międzynarodowa Unia Biochemiczna zaleciła stosowanie następujących oznaczeń (25):

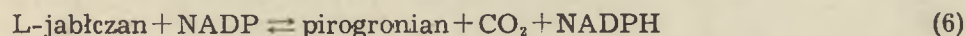
EC 1.1.1.38 Dehydrogenaza jabłczanowa (dekarboksylująca szczawiooctan) na oznaczenie enzymu katalizującego reakcję (Reakcja 4):



EC 1.1.1.39 Dehydrogenaza jabłczanowa (dekarboksylująca) na oznaczenie enzymu katalizującego reakcję (Reakcja 5):



EC 1.1.1.40 Dehydrogenaza jabłczanowa (dekarboksylująca) (NADP) na oznaczenie enzymu katalizującego reakcję (Reakcja 6):



Enzym oznaczony EC 1.1.1.38 w odróżnieniu od enzymu EC 1.1.1.39 katalizuje dekarboksylację szczawiooctanu.

II. Subkomórkowe występowanie enzymu jabłczanowego w tkankach zwierzęcych

Doświadczenia O c h o a i współpracowników (1) pozwoliły na zlokalizowanie enzymu jabłczanowego we frakcji cytoplazmatycznej wątroby gołębia. Późniejsze prace innych autorów w pełni potwierdziły te obserwacje (26). Doświadczenia publikowane kilka lat później przemawiały za możliwością występowania enzymu jabłczanowego również w mitochondriach serca (27-29). Simpson i Estabrook (30-32) stwierdzili obecność tego enzymu zarówno w cytoplazmie jak i mitochondriach otrzymanych z kory nadnerczy wołu. Ponadto wykazali, że enzym izolowany z mitochondriów różni się właściwościami fizykochemicznymi i katalitycznymi od enzymu cytoplazmatycznego. Podobne wyniki otrzymano izolując enzym jabłczanowy z serca wołu (33-35), wieprza (36), szczura (37), mózgu wołu (38, 39) oraz mięśni szkieletowych szczura (2, 3, 40). Ze względu na jego subkomórkowe rozmieszczenie można wyróżnić dwie grupy tkanek lub narządów: takie, w których enzym ten znaleziono głównie w cytoplazmie i takie, w których występuje zarówno w cytoplazmie jak i mitochondriach. Do pierwszej grupy można zaliczyć wątrobę (13, 26) oraz białą (13) i brunatną (10) tkankę tłuszczową, a do drugiej serce (33-35), nadnercza (30-32), mózg (38, 39), nerkę (13) i mięśnie szkieletowe (2, 3, 40).

III. Fizjologiczna rola enzymu jabłczanowego

Według Ochoa i współpracowników (1) enzym jabłczanowy miał odgrywać istotną rolę w procesie biosyntezy jabłczanu w tkankach zwierzęcych. Przez wiele lat panował pogląd, że jest to ważny proces na drodze przemiany pirogronianu i jego prekursorów do glukozy w wątrobie. Jednakże odkrycie aktywności karboksylazy pirogronianowej w mitochondriach wątroby szczura spowodowało zmianę poglądów na temat roli enzymu jabłczanowego w procesie glukoneogenezy. Obecnie uważa się, że zasadniczą rolę w przemianie pirogronianu i jego prekursorów do glukozy w wątrobie odgrywa karboksylacja pirogronianu katalizowana przez karboksylazę pirogronianową.

Wzrost aktywności enzymu jabłczanowego oraz innych enzymów odpowiedzialnych za redukcję NADP pod wpływem czynników hormonalnych i dietetycznych pozwala sądzić, że jedną z ról tego enzymu jest produkcja równoważników redukcyjnych (41-47). Ścisła korelacja pomiędzy wzrostem aktywności enzymu jabłczanowego a procesem lipogenezy w wątrobie sugeruje, że enzym ten może być odpowiedzialny za regenerację NADPH wykorzystywanego w procesie biosyntezy kwasów tłuszczowych (45, 46).

Udział enzymu jabłczanowego w reakcjach hydroksylacji zachodzących w procesie biosyntezy hormonów sterydowych w korze nadnerczy sugerowano opierając się na obserwacji stymulowania syntezy kortykosteronu z dezoksykortykosteronu przez jabłczan oraz na wysokiej aktywności mitochondrialnego i cytoplazmatycznego enzymu jabłczanowego w korze nadnerczy (30-32). Enzym cytoplazmatyczny katalizuje karboksylację pirogronianu do jabłczanu utleniając NADPH powstający w wyniku działania dehydrogenaz cyklu pentozowego. Powstały w ten sposób jabłczan przechodzi do mitochondriów, gdzie ulega oksydacyjnej dekarboksylacji pod wpływem mitochondrialnego enzymu jabłczanowego redukując jednocześnie mitochondrialny NADP. Z kolei mitochondrialny NADPH może być wykorzystany w procesach hydroksylacji zachodzących w mitochondriach.

Niewyjaśniona pozostaje rola enzymu jabłczanowego w tkankach innych niż wątroba i tkanki steroidogeniczne. Sugeruje się udział cytoplazmatycznego enzymu jabłczanowego z brunatnej tkanki tłuszczowej w procesie karboksylacji pirogronianu do jabłczanu (10). Ten ostatni może przechodzić do mitochondriów, gdzie ulega przemianie do szczawiooctanu, który z kolei jest akceptorem acetylo-CoA powstającym w procesie utleniania kwasów tłuszczowych. W ten sposób dzięki działaniu enzymu jabłczanowego możliwe jest intensywne utlenianie kwasów tłuszczowych w brunatnej tkance tłuszczowej. Podobną rolę przypisuje się też mitochon-

drialnemu enzymowi jabłczanowemu z serca (48). W tym przypadku sugestia ta wydaje się jednak mało prawdopodobna, ponieważ enzym mitochondrialny charakteryzuje niewielka zdolność do katalizowania reakcji karboksylacji pirogronianu (6). Według innych autorów (6, 16, 49) mitochondrialny enzym jabłczanowy reguluje stężenie metabolitów cyklu Krebsa a tym samym wpływa na metabolizm energetyczny mięśni.

Z tego krótkiego przeglądu wynika, że o roli jaką enzym jabłczanowy odgrywa w różnych tkankach decyduje jego rozmieszczenie subkomórkowe. Dane na ten temat są jednak bardzo fragmentaryczne i często niejednoznaczne.

IV. Enzym jabłczanowy z mięśni szkieletowych

IV-1. Rozmieszczenie subkomórkowe

W roku 1967 *O pie i Newsholme* (50) stwierdzili obecność enzymu jabłczanowego w ekstraktach mięśni szkieletowych kury, gołębia, żaby i królika. Kilka lat później wykazano, że enzym ten w mięśniach szkieletowych występuje w cytoplazmie i mitochondriach (48). Ilościowe rozmieszczenie tego enzymu w mięśniach szkieletowych pomiędzy cytoplazmą a mitochondriami zależy od rodzaju mięśni. W mięśniach czerwonych około 70% aktywności znajduje się w mitochondriach, podczas gdy w mięśniach białych mitochondrialny enzym stanowi około 30% całkowitej aktywności. Analizując rozmieszczenie enzymu jabłczanowego w mięśniach szkieletowych otrzymanych z tylnych kończyn 6-tygodniowego szczura stwierdzono, że mitochondrialny enzym stanowi około 50% całkowitej aktywności (51).

Tabela 1.

Porównanie właściwości kinetycznych enzymu jabłczanowego izolowanego z mitochondriów i cytoplazmy mięśni szkieletowych szczura (2,3,40)

	Enzym mitochondrialny	Enzym cytoplazmatyczny
Km (jabłczan)	0.33 mM	0.125 mM
Km (NADP)	6.8 μ M	11 μ M
Km (Mn^{++})	7.1 μ M	9.5 μ M
Km (pirogronian)	8.3 mM	4.0 mM
Km (NADPH)	19.6 μ M	6.6 μ M
Km ($KHCO_3$)	24.4 mM	24.0 mM
Wpływ na reakcję dekarboksylacji		
1. bursztynian i fumaran	stymulują	nie wpływają
2. acetylo-CoA	hamuje	nieznacznie hamuje

IV-2. Właściwości cytoplazmatycznego i mitochondrialnego enzymu jabłczanowego

W mięśniach szkieletowych enzymy jabłczanowe, cytoplazmatyczny i mitochondrialny różnią się rozpuszczalnością w siarczanie amonowym (2, 3), szybkością wędrówki na kolumnie z DEAE-celulozą oraz punktem izoelektrycznym (40). Obydwa enzymy są prawdopodobnie tetramerycznymi białkami o ciężarze cząsteczkowym zbliżonym do 260000 (3, 40). Podobieństwa i różnice właściwości kinetycznych obu form enzymu jabłczanowego przedstawiono w tabeli 1. Na szczególną uwagę zasługują różnice w stałych Michaelisa wobec pirogronianu: enzym mitochondrialny cechuje stała dwukrotnie wyższa. Istotną również cechą różniącą enzym mitochondrialny od cytoplazmatycznego jest zdolność katalizowana karboksylacji pirogronianu. W przypadku enzymu mitochondrialnego szybkość karboksylacji nie przekracza 20% szybkości dekarboksylacji (Tabela 2). Szybkość karboksylacji katalizowanej przez cytoplazmatyczny enzym osiąga około 80% szybkości dekarboksylacji (Tabela 2). Biorąc pod uwagę powyższe dane wydaje się, że *in vivo* karboksylacja pirogronianu katalizowana przez mitochondrialny enzym jabłczanowy nie odgrywa większej roli. W przypadku enzymu cytoplazmatycznego duża aktywność karboksylacji i znacznie niższa K_m wobec pirogronianu sugerują, że *in vivo* enzym ten może katalizować karboksylację pirogronianu do jabłczanu.

Tabela 2.

Karboksylacja pirogronianu katalizowana przez cytoplazmatyczny i mitochondrialny enzym jabłczanowy z mięśni szkieletowych szczura (2,3)

	Szybkość reakcji $\mu\text{mole} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ białka enzymatycznego	
	Enzym cytoplazmatyczny	Enzym mitochondrialny
Dekarboksylacja jabłczanu	25.2	20.6
Karboksylacja pirogronianu,	5 mM KHCO_3 5.3 (21%)	—
	10 mM KHCO_3 9.0 (36%)	—
	25 mM KHCO_3 15.5 (62%)	—
	50 mM KHCO_3 20.0 (79%)	3.2 (16%)

Wartości w nawiasach przedstawiają procent szybkości karboksylacji w stosunku do dekarboksylacji.

Interesującą właściwością mitochondrialnego enzymu jest stymulacja reakcji dekarboksylacji przez bursztynian i fumaran, obserwowana szczególnie przy niskich stężeniach jabłczanu (Tabela 3). W identycznych warunkach dekarboksylacja katalizowana przez enzym cytoplazmatyczny jest niewrażliwa na fumaran i bursztynian (Tabela 3). Biorąc pod uwagę dużą szybkość reakcji dekarboksylacji katalizowanej przez mitochondrial-

ny enzym jabłczanowy, niską wartość K_m wobec jabłczanu można przypuszczać, że zasadniczą rolą tego enzymu jest przemiana jabłczanu w pirogronian.

Tabela 3.

Wpływ bursztynianu i fumaranu na szybkość dekarboksylacji katalizowanej przez cytoplazmatyczny i mitochondrialny enzym jabłczanowy

	Szybkość reakcji $\mu\text{mole} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ białka enzymatycznego	
	Enzym cytoplazmatyczny	Enzym mitochondrialny
Jabłczan, 0.125 mM	5.5	0.8
+ Bursztynian, 10 mM	5.5	4.0
+ Fumarany, 10 mM	5.5	5.0

Wyniki opracowano na podstawie danych zawartych w piśmiennictwie (2,3).

W mitochondriach izolowanych z mięśnia sercowego królika, świnki morskiej i gołębia oraz w mitochondriach mięśni piersiowych gołębia stwierdzono aktywność enzymu jabłczanowego zależnego od NAD (6). Wysunięto przypuszczenie, że mitochondria mięśni szkieletowych szczura zawierają również aktywność tego enzymu (52, 53). Późniejsze badania wykazały jednak, że to zależny od NADP enzym jabłczanowy może w pewnych warunkach katalizować dekarboksylację jabłczanu w obecności NAD (23). Podobnymi właściwościami charakteryzuje się cytoplazmatyczny enzym mięśni szkieletowych szczura (24).

IV-3. Rola cytoplazmatycznego enzymu jabłczanowego w resyntezie glikogenu z mleczanu w mięśni szkieletowym

Jest sprawą powszechnie znaną, że krótkotrwały, intensywny wysiłek prowadzi do dużej produkcji kwasu mlekowego w pracującym mięśniu. Stężenie tego metabolitu w ludzkim mięśniu szkieletowym tuż po wysiłku może osiągać 25 mmoli na kg mokrej masy mięśnia (54, 55). Nasuwa się więc pytanie o dalsze losy powstającego w mięśniach szkieletowych mleczanu. Ogólnie rzecz biorąc, istnieją dwa przeciwstawne poglądy na ten temat. Dawne prace Meyerhofa i współpracowników (56, 57) oraz Hilla (58) sugerowały, że w mięśni szkieletowych żaby około 75% powstającego kwasu mlekowego ulega przemianie do glikogenu. Późniejsze prace wskazywały, że w mięśni szkieletowych królika (59) oraz człowieka (54) istnieje również możliwość resyntezy glikogenu z kwasu mlekowego po wysiłku. Jednakże znaczenie tych obserwacji było często podważane z następujących przyczyn:

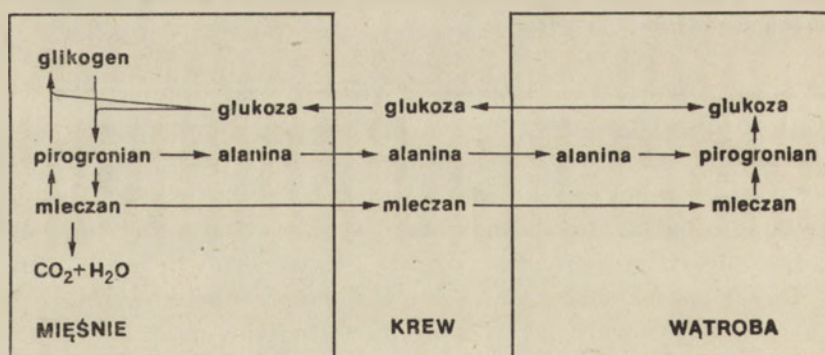
— szybkość syntezy glikogenu w izolowanych preparatach mięśniowych

była niewielka (około 0.08 mmola jednostek glukozy wbudowanych w glikogen w ciągu minuty na kg mokrej masy mięśnia (59));

- w badaniach *in vivo* nie kontrolowano zużycia glukozy (54), która mogła być bezpośrednim substratem w biosyntezie glikogenu;
- izolowany mięsień brzuchaty (*m. gastrocnemius*) psa z niewielką szybkością wbudowuje znakowany węglem ^{14}C mleczan do glikogenu (60);
- przepona szczura inkubowana w obecności mleczanu wbudowuje niewielkie ilości radioaktywnego CO_2 do glikogenu (61).

Dane te oraz doświadczenia K re b s a i W o o d f o r d a (62), którzy nie wykazali obecności kluczowych enzymów odpowiedzialnych za przekształcanie mleczanu w glikogen, w dużym stopniu podważały poglądy dotyczące przemiany mleczanu w glikogen w mięśniu szkieletowym. W związku z tym powszechnie panowało przekonanie, że powstający w pracującym mięśniu szkieletowym kwas mlekowy przedostaje się do krwi a następnie tą drogą do wątroby, gdzie ulega przemianie w glukozę. Ta z kolei poprzez krew dostaje się do mięśni, gdzie stanowi między innymi substrat w biosyntezie glikogenu.

Nowe światło na problem resyntezy glikogenu z mleczanu w mięśniu szkieletowym rzucają niedawno publikowane prace H e r m a n s e n a i V a a g e (55,63). Doświadczenia te wykazują, że po wysiłku dochodzi do szybkiego znikania kwasu mlekowego z mięśni. Około 10% tego metabolitu przedostaje się do krwi, a pozostała część jest metabolizowana w obrębie mięśni, z czego mniej niż 15% jest spalane do dwutlenku węgla i wody (Schemat 1). Wynika z tego, że pozostałe 75% mleczanu musi być metabolizowane inną drogą (lub innymi drogami). Autorzy sugerują, że drogą tą może być proces biosyntezy glikogenu (55, 63). Sugestia ta oparta jest na następujących danych doświadczalnych (55, 63):



Schemat 1. Metabolizm mleczanu w ustroju ludzkim po krótkotrwałym intensywnym wysiłku

Powstający w pracującym mięśniu szkieletowym mleczan jest spalany przez mięśnie czerwone do CO_2 i H_2O . W ten sposób metabolizowane jest około 15% powstającego mleczanu. Około 10% tego metabolitu (również w postaci powstającej z mleczanu alaniny) przedostaje się poprzez krew do wątroby, gdzie ulega przemianie do glukozy. Sugeruje się (55, 63), że pozostałe 75% mleczanu ulega przemianie do glikogenu w mięśniu szkieletowym.

- po wysiłku zachodzi intensywna biosynteza glikogenu w mięśniach szkieletowych;
- niewielka część glukozy pobierana z krwi jest wykorzystywana do biosyntezy glikogenu (aż 90% glikogenu jest syntetyzowane z innych prekursorów);
- istnieje zależność czasowa pomiędzy znikaniem mleczanu a biosyntezą glikogenu (w okresie 30 minut po wysiłku obserwuje się liniowy spadek stężenia mleczanu z przeciętną szybkością 0.66 mmola na minutę na kg masy mięśnia oraz liniowy wzrost ilości glikogenu z przeciętną szybkością 0.56 mmola jednostek glukozy wbudowanych do glikogenu na minutę na kg mokrej masy mięśnia);
- z pomiarów różnic tętniczo-żylnych stężeń alaniny wynika, że cykl alaninowy nie odgrywa większej roli w znikaniu mleczanu z mięśnia szkieletowego.

Brak lub niska aktywność karboksylazy pirogronianowej w mięśniach szkieletowych ssaków (50, 64) nasuwa pytanie, jaką inną drogą przebiega tam przemiana mleczanu w glikogen. Zdolność katalizowania karboksylacji pirogronianu przez cytoplazmatyczny enzym jabłczanowy z mięśni szkieletowych szczura wskazuje, że to on odgrywa zasadniczą rolę w tej przemianie.

Z pomiarów stężeń jabłczanu w ludzkim mięśniach szkieletowych wynika, że ilość tego metabolitu wzrasta około 10-krotnie po intensywnym wysiłku a następnie wyraźnie spada po wypoczynku (63). Tak więc kierunek zmian stężeń jabłczanu jest analogiczny jak mleczanu (Tabela 4). Jest

Tabela 4

Zawartość glikogenu, mleczanu i jabłczanu w ludzkim mięśniach szkieletowych

	W spoczynku	Po wysiłku	Po wypoczynku
Glikogen	87.7	49.6	66.4
Mleczan	1.1	26.4	6.6
Jabłczan	0.07	0.67	0.2

Wartości wyrażają ilość mmoli \times kg^{-1} mokrej masy mięśnia dla jabłczanu i mleczanu oraz mmole jednostek glukozy \times kg^{-1} mokrej masy mięśnia dla glikogenu. Wyniki opracowano na podstawie danych zawartych w piśmiennictwie (55, 63).

sprawą oczywistą, że wzrost stężenia mleczanu musi prowadzić do wzrostu stężenia pirogronianu, a tym samym zwiększać szybkość syntezy jabłczanu katalizowanej przez cytoplazmatyczny enzym jabłczanowy. Z doświadczeń Davis i współpracowników (53) wiadomo, że perfundowany mięsień szkieletowy szczura włącza radioaktywny CO_2 do jabłczanu w warunkach, kiedy jedynym substratem dodanym do płynu perfuzyjnego jest glukoza. Dodanie do płynu perfuzyjnego pirogronianu z mleczanem znacznie zwiększało wbudowywanie CO_2 do jabłczanu (Tabela 5). Natomiast

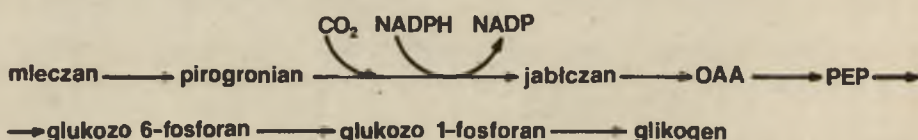
Tabela 5.

Włączenie CO₂ do jabłczanu w perfundowanym mięśniu szkieletowym szczura

	Radioaktywność całkowita cpm/g tkanki × 10 ⁻²	Specyficzna aktywność cpm/μmol × 10 ⁻²
Kontrola	18	118
+ pirogronian 0.15 mM	33	166
+ mleczan, 2.25 mM		
+ pirogronian, 1 mM	150	310
+ mleczan, 15 mM		

Mięsień perfundowano płynem Krebsa-Henseleita zawierającym 5 mM glukozę, 12.5 milijednostek insuliny i NaH¹⁴C₃O₃. Wyniki opracowano na podstawie danych zawartych w piśmiennictwie (53).

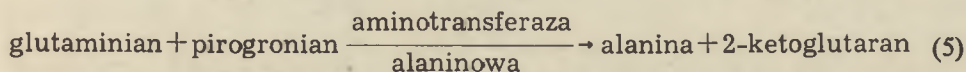
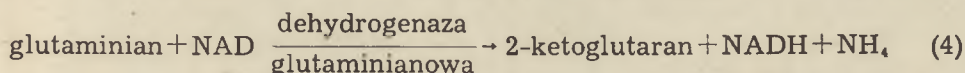
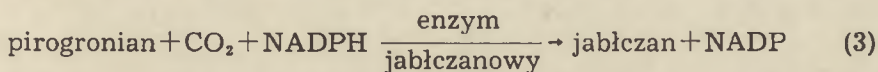
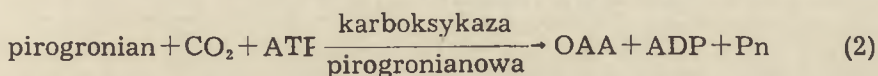
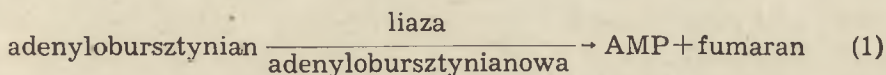
w izolowanym mięśniu szkieletowym żaby wzrost stężenia mleczanu w płynie perfuzyjnym z 1 do 8 mM powoduje około 3.5-krotny wzrost syntezy glikogenu (65). Ponadto szybkość syntezy glikogenu z mleczanu rośnie wraz ze wzrostem stężenia HCO₃⁻ w płynie inkubacyjnym (59). Na podstawie omówionych doświadczeń wydaje się, że w mięśniu szkieletowym możliwa jest przemiana mleczanu do jabłczanu, szczególnie wówczas, gdy stężenie mleczanu wzrasta wielokrotnie oraz, że istotną rolę w tym procesie odgrywa cytoplazmatyczny enzym jabłczanowy. Biorąc pod uwagę powyższe dane oraz hamowanie wbudowywania mleczanu w glikogen w mięśniu żaby (65) przez 3-merkaptopikolinian-inhibitor karboksykinazy fosfoenolpirogronianowej (66) można zaproponować następujący schemat biosyntezy glikogenu z mleczanu:



IV-4. Anaplerotyczne działanie cytoplazmatycznego enzymu jabłczanowego

Cykl kwasów trikarboksylowych (cykl Krebsa) ma w komórkach zwierzęcych istotne znaczenie dla wykorzystania produktów katabolizmu węglowodanów, tłuszczów i białek. Produkty te ulegają przemianom w cyklu Krebsa w celu wytworzenia energii oraz prekursorów dla procesów anabolicznych. Odpływ metabolitów, które stanowią substraty wyjściowe dla biosyntezy glukozy (OAA) lub kwasów tłuszczowych (cytrynian) wymaga dopływu metabolitów w celu zachowania równowagi pomiędzy związkami węglowymi ulegającymi przemianie w cyklu Krebsa a związkami wykorzystywanymi w procesach anabolicznych. Uzupełnianie puli pośredników cyklu Krebsa odbywa się dzięki pewnym reakcjom pomocniczym, które

określa się jako reakcje anaplerotyczne (67). Stwierdzono, że zarówno mięsień sercowy jak i szkieletowy cechuje zdolność zwiększania stężenia metabolitów cyklu Krebsa szczególnie podczas głodu i cukrzycy (68, 69) a także w czasie intensywnej pracy organizmu (70-72). Do akumulacji metabolitów cyklu Krebsa dochodzi również w sercu i mięśniu szkieletowym w wyniku perfuzji octanem oraz innymi prekursorami acetylo-CoA (52, 68, 73, 74). Nie wyjaśniony do tej pory pozostaje jednak mechanizm prowadzący do wzrostu stężenia pośredników cyklu Krebsa w mięśniu szkieletowym. Najczęściej rozważa się następujące reakcje, które teoretycznie mogą działać anaplerotycznie w mięśniu szkieletowym (3, 64, 71, 72, 75):



Najważniejszą według Lowensteina i współpracowników rolę w uzupełnianiu metabolitów cyklu Krebsa w mięśniu szkieletowym gra cykl nukleotydów purynowych a konkretnie reakcja katalizowana przez liazę adenylobursztynianową (Reakcja 1), podczas gdy pozostałe reakcje (Reakcje 2-5) nie mają odgrywać większej roli w tym procesie (71, 72). Według wyników doświadczeń Davisa i współpracowników (64) wydaje się, że karboksylaza pirogronianowa (Reakcja 2) może mieć w mięśniu działanie anaplerotyczne. Zarówno Davis (64) jak i Lowenstein (71) są zgodni, że enzym jabłczanowy nie może być odpowiedzialny za karboksylację pirogronianu do jabłczanu a tym samym zwiększać stężenie tego metabolitu w mięśniu. Opierają oni swoje przypuszczenie głównie na właściwościach kinetycznych enzymu izolowanego z mitochondriów serca (64, 71). Jak przedstawiono powyżej, enzym mitochondrialny z mięśni szkieletowych (podobnie jak i z mitochondriów innych tkanek) charakteryzuje się niewielką zdolnością katalizowania karboksylacji pirogronianu, wykazując przy tym wysoką K_m wobec pirogronianu. Biorąc jednak pod uwagę właściwości kinetyczne enzymu cytoplazmatycznego z mięśni szkieletowych, można przypuszczać, że katalizuje on karboksylację pirogronianu do jabłczanu także *in vivo*. Stosując układ doświadczalny zawierający mitochondria izolowane z mięśni szkieletowych, pirogronian, KHCO_3 , NADPH , MgSO_4 i cytoplazmatyczny enzym jabłczanowy stwierdzono stosunkowo

dukują pirogronian (Tabela 7). Teoretycznie synteza pirogronianu z jabłczanu w izolowanych mitochondriach może odbywać się trojako. Po pierwsze może zachodzić przy udziale mitochondrialnego enzymu jabłczanowego. Po drugie w wyniku przemiany jabłczanu do fosfoenolopirogronianu katalizowanej kolejno przez dehydrogenazę jabłczanową i karboksykinazę fosfoenolopirogronianową; fosfoenolopirogronian z kolei może być transportowany do środowiska inkubacyjnego, gdzie pod wpływem kinazy piro-

Tabela 7.

Produkcja pirogronianu z jabłczanu przez mitochondria izolowane z mięśni szkieletowych szczura (23)

Warunki doświadczenia	Produkcja pirogronianu nmole \times min ⁻¹ \times mg ⁻¹ białka mitochondrialnego
Jabłczan	7.4
Jabłczan + ADP	12.2
Jabłczan + ADP + Oligomycyna	6.6
Jabłczan + Oligomycyna	6.6

Mitochondria inkubowano w środowisku zawierającym: 20 mM KCl; 50 mM Tris-HCl pH 7.2; 2 mM bufor fosforanowy pH 7.2; 2 mM MgCl₂; 2 mM EDTA, 0.2% BSA; 4 mM NaAsO₂; 20 mM jabłczan; 1 mM ADP, 5 μ g oligomycyny.

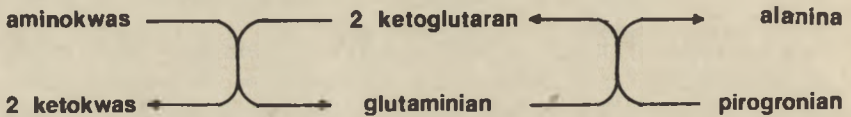
gronianowej zaadsorbowanej na powierzchni mitochondriów może ulegać przemianie do pirogronianu. Po trzecie w wyniku bezpośredniej dekarboksylacji (katalizowanej przez dekarboksylazę szczawiooctanu) powstającego z jabłczanu szczawiooctanu.

Dane doświadczalne wskazują, że jedyną drogą biosyntezy pirogronianu z jabłczanu w izolowanych z mięśni szkieletowych mitochondriach jest reakcja katalizowana przez enzym jabłczanowy, bowiem dwie pozostałe drogi nie mogą odgrywać żadnej roli ze względu na brak aktywności dekarboksylazy szczawiooctanu z mitochondriach mięśni szkieletowych (89) oraz brak syntezy fosfoenolopirogronianu w warunkach doświadczalnych opisanych w tabeli 7. Należy również podkreślić, że biosyntezy fosfoenolopirogronianu nie stwierdzono stosując warunki doświadczalne optymalne dla produkcji tego metabolitu w mitochondriach izolowanych z innych tkanek (23). Ilość produkowanego pirogronianu wzrasta około dwukrotnie po dodaniu ADP do środowiska inkubacyjnego (Tabela 7). Inhibitory fosforylacji oksydacyjnej znoszą całkowicie wpływ ADP na produkcję pirogronianu. Wskazuje to, że przemiana jabłczanu w pirogronian jest ściśle sprzężona z procesem fosforylacji oksydacyjnej. Co z kolei sugeruje, że NADPH powstający w reakcji katalizowanej przez enzym jabłczanowy jest utleniany przez mitochondria. W mitochondriach mięśni szkieletowych NADPH jest utleniany bezpośrednio przez łańcuch oddechowy lub

też pośrednio przy udziale niezależnej od energii transhydrogenazy, która katalizuje redukcję NAD w obecności NADPH (23). Powstający w ten sposób NADH jest następnie utleniany przez łańcuch oddechowy.

IV-6. Rola mitochondrialnego enzymu jabłczanowego w przemianie szkieletu węglowego niektórych aminokwasów do alaniny

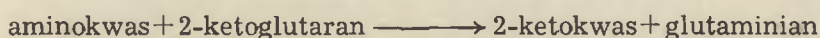
Alanina jest jednym z głównych substratów glukoneogenezy zachodzącej w wątrobie i korze nerki. Zasadniczym jej źródłem są mięśnie szkieletowe. Stwierdzono, że ilość alaniny uwalnianej przez mięśnie szkieletowe w czasie głodzenia przekracza znacznie ilość tego aminokwasu, jaka występuje w białkach mięśniowych (76). Sugeruje to, że alanina jest w mięśniach szkieletowych syntetyzowana przez transaminację pirogronianu. Jedynym bezpośrednim donatorem grupy aminowej w tym procesie może być glutaminian (77). Asparaginian, leucyna, izoleucyna i walina mogą być również donatorami grupy aminowej dla transaminacji 2-ketoglutaranu w wyniku czego powstaje glutaminian. Tak więc synteza alaniny poprzez transaminację pirogronianu zachodzi według schematu:



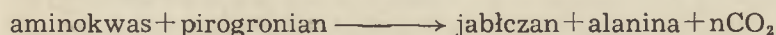
Za taką drogę syntezy alaniny przemawia szereg danych doświadczalnych. Stwierdzono bowiem, że znane inhibitory aminotransferaz (aminooksyoctan i cykloseryna) hamują uwalnianie alaniny zarówno *in vivo* (78) jak i *in vitro* (79-81). Dalsze badania wykazały, że perfuzja mięśnia (79) oraz inkubacja preparatów mięśniowych (80-82) z glutaminianem (lub innymi aminokwasami których metabolizm prowadzi do wzrostu stężenia glutaminianu) powoduje stymulację uwalniania alaniny. Stwierdzono również, że zwiększenie dostępności pirogronianu powoduje zwiększone uwalnianie alaniny i odwrotnie obniżenie dostępności pirogronianu powoduje spadek uwalniania alaniny przez mięśnie szkieletowe (78, 81).

Glutaminian oraz inne aminokwasy wykorzystywane w procesie biosyntezy alaniny powstają w wyniku proteolizy białek mięśniowych (77), źródłem zaś pirogronianu może być glukoza, może on również powstawać w wyniku katabolizmu niektórych aminokwasów. Według pierwszych doniesień dotyczących uwalniania alaniny z mięśni szkieletowych głównym źródłem szkieletu węglowego alaniny miał być szkielet węglowy pirogronianu, pochodzący z przemiany glukozy (76, 84). Zaproponowano cykl zwany alaninowo-glukozowym (76, 84, 85): glukoza pobierana przez mięśnie szkieletowe z krwi ulega przemianie do pirogronianu, który po transaminacji do alaniny przechodzi do krwi i tą drogą dostaje się do wątroby. W wątrobie grupa aminowa alaniny jest wykorzystywana w procesie bio-

syntezy mocznika a szkielet węglowy służy do biosyntezy glukozy. Powstała glukoza dostarczana jest z krwią do mięśni, gdzie ponownie ulega przemianie do pirogronianu a następnie do alaniny. Zasadniczą więc rolą tego cyklu jest transport azotu z mięśni do wątroby bez wzrostu stężenia amoniaku we krwi. Należy zauważyć, że cykl alaninowo-glukozowy nie wytwarza netto glukozy, nie dostarcza więc jej również w okresie głodzenia. Badania Cahila (86) wykazały, że podczas krótkotrwałego głodu energetyczne zapotrzebowanie mózgu jest pokrywane przez glukozę syntetyzowaną ze szkieletu węglowego aminokwasów powstających w procesie proteolizy białek mięśniowych. Należy więc sądzić, że atomy węgla alaniny uwalnianej z mięśni szkieletowych mogą pochodzić nie tylko z glukozy ale również z aminokwasów mięśniowych. Z badań *in vitro* wynika, że 20-50% alaniny może powstawać ze źródeł niewęglowodanowych (82, 87, 88). Głównym źródłem niewęglowodanowych atomów węgla alaniny są: asparaginian, glutaminian, walina i izoleucyna (77). Według Davisa i współpracowników (74) aminokwasy te transaminują z 2-ketoglutaranem w wyniku czego powstaje odpowiedni 2-ketokwas i glutaminian. Powstający w ten sposób 2-ketokwas ulega przemianie do pośredników cyklu Krebsa. 2-ketoglutaran konieczny do transaminacji jest regenerowany w reakcji katalizowanej przez aminotransferazę alaninową. Schematycznie można to zapisać następująco:



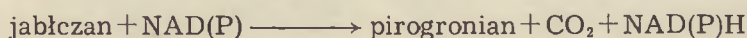
Sumarycznie:



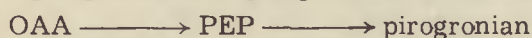
W ten sposób grupa aminowa niektórych aminokwasów zostaje wbudowana w alaninę, a ich szkielet węglowy ulega przemianie do jabłczanu (lub innych pośredników cyklu Krebsa). Powstający w ten sposób jabłczan może dalej ulegać przemianie do pirogronianu, bezpośredniego prekursora uwalnianej z mięśni szkieletowych alaniny.

Nasuwa się jednak pytanie w jaki sposób jabłczan (lub inne pośredniki cyklu Krebsa) ulega przemianie do pirogronianu. Teoretycznie można rozważyć trzy niezależne drogi:

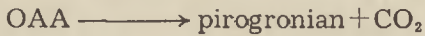
— bezpośrednią przemianę jabłczanu w pirogronian katalizowaną przez mitochondrialny enzym jabłczanowy:



— przemianę szczawiooctanu w fosfoenolpirogronian pod wpływem karboksykinazy fosfoenolpirogronianowej z następną przemianą fosfoenolpirogronianu do pirogronianu z udziałem kinazy pirogronianowej:



— dekarboksylację szczawiooctanu pod wpływem dekarboksylazy szczawiooctanu:



Wydaje się jednak, że tę ostatnią drogę można wykluczyć z rozważań ze względu na brak aktywności dekarboksylazy szczawiooctanu w mięśniach szkieletowych (89).

Mięśnie izolowane ze szczurów głodzonych i inkubowane w środowisku zawierającym walinę uwalniają znacznie więcej alaniny niż mięśnie otrzymane ze szczurów karmionych (90). Głodzenie powoduje również wyraźny wzrost aktywności karboksykinazy fosfoenolpirogonianowej w różnych typach mięśni szkieletowych (90). Zależność pomiędzy wzrostem aktywności karboksykinazy fosfoenolpirogonianowej a zwiększoną ilością uwalnianej alaniny może sugerować, że droga z udziałem tego enzymu odgrywa zasadniczą rolę w przemianie pośredników cyklu Krebsa do pirogonianu. Przemawiają również za tym wyniki doświadczeń z 3-merkaptopikolinianem (inhibitorem karboksykinazy fosfoenolpirogonianowej) i 3-aminopikolinianem (aktywatorem tego enzymu) a mianowicie inkubacja z merkaptopikolinianem mięśni otrzymanych ze szczurów głodzonych powoduje zahamowanie uwalniania alaniny, natomiast z aminopikolinianem powoduje stymulację uwalniania tego aminokwasu (91). Jednak badania z perfundowanym mięśniem szkieletowym nie wykazały istotnego wpływu inhibitora karboksykinazy fosfoenolpirogonianowej na produkcję alaniny, pirogonianu i mleczanu (53). Dlatego też Davis i współpracownicy (53) stoją na stanowisku, że enzym jabłczanowy musi katalizować przemianę pośredników cyklu Krebsa do pirogonianu. Początkowo sądzono, że szczególną rolę w tym procesie odgrywa zależna od NAD forma enzymu jabłczanowego (53). Późniejsze badania nie wykazały jednak obecności zależnej od NAD formy enzymu jabłczanowego w mitochondriach mięśni szkieletowych (23), stwierdziły natomiast, że w pewnych warunkach (duże stężenie jabłczanu i NAD oraz niskie pH środowiska inkubacyjnego) zależny od NADP enzym jabłczanowy może katalizować przemianę jabłczanu do pirogonianu z udziałem NAD (23). Wydaje się jednak, że dekarboksylacja jabłczanu w obecności NAD nie odgrywa większej roli w metabolizmie mięśni szkieletowych ze względu na niską aktywność oraz wysoką K_m wobec jabłczanu i NAD. Natomiast zasadniczą rolę w przemianie jabłczanu do pirogonianu może odgrywać zależny od NADP mitochondrialny enzym jabłczanowy. Przemawiają za tym właściwości kinetyczne tego enzymu oraz zdolność izolowanych mitochondriów do produkcji pirogonianu z jabłczanu. Stymulowanie enzymu jabłczanowego przez bursztynian i fumaran, metabolity, które powstają między innymi w wyniku katabolizmu waliny i izoleucyny może stanowić dodatkowy mechanizm regulacyjny w przemianie fragmentu węglowego tych aminokwasów do alaniny (Schemat 2). Należy również zwrócić uwagę na hamo-

octanu z mitochondriów do cytoplazmy. Wiadomo, że transport szczawiooctanu z mitochondriów do cytoplazmy odbywa się głównie w formie asparaginianu. Z badań L a N o u e (92, 93) wynika, że transport asparaginianu z mitochondriów do cytoplazmy jest procesem zależnym od energii. Na tej podstawie można by sądzić, że droga z udziałem karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej jest możliwa tylko w warunkach wysokiego stanu energetycznego mitochondriów, natomiast w innych warunkach może przeważać droga z udziałem zależnego od NADP enzymu jabłczanowego.

V. Podsumowanie

W mięśniach szkieletowych występuje cytoplazmatyczny i mitochondrialny enzym jabłczanowy. Enzymy te różnią się niektórymi właściwościami fizykochemicznymi i kinetycznymi. Mitochondrialny enzym katalizuje karboksylację pirogronianu z szybkością nie przekraczającą 20% szybkości dekarboksylacji jabłczanu, natomiast enzym cytoplazmatyczny katalizuje karboksylację pirogronianu z szybkością 80% reakcji dekarboksylacji jabłczanu. Ponadto mitochondrialny enzym jest stymulowany przez bursztynian i fumaran oraz hamowany przez acetylo-CoA, podczas gdy cytoplazmatyczny enzym jest niewrażliwy na bursztynian i fumaran a tylko nieznacznie hamowany przez acetylo-CoA. Jak się sugeruje, mitochondrialny enzym jabłczanowy katalizuje *in vivo* głównie reakcję dekarboksylacji jabłczanu, co może być istotne dla przemiany szkieletu węglowego niektórych aminokwasów do alaniny. Cytoplazmatyczny enzym może katalizować zarówno reakcję karboksylacji pirogronianu jak i dekarboksylacji jabłczanu. W mięśniach szkieletowych ważną rolę odgrywa reakcja karboksylacji pirogronianu w przemianie mleczanu w glikogen oraz w uzupełnianiu puli pośredników cyklu Krebsa. Precyzyjna regulacja stężenia pośredników cyklu Krebsa w mięśniu szkieletowym ma szczególne znaczenie, jest to bowiem narząd, w którym różnica natężenia procesów metabolicznych pomiędzy spoczynkiem a pracą może być tysiąckrotna.

Autor wyraża wdzięczność prof. dr Mariuszowi Żydowo i prof. dr Leonowi Żelewskiemu za cenne uwagi oraz życzliwą zachętę w trakcie przygotowywania niniejszego artykułu.

Zaakceptowano do druku 7.03.1984

PIŚMIENNICTWO

1. Ochoa S., Mehler A., Kornberg A., (1947), *J. Biol. Chem.*, **167**, 871—872.
2. Świerczyński J., Stankiewicz A., Ścisłowski P., Aleksandrowicz Z., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **612**, 1—10.

3. Świerczyński J., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **616**, 10—21.
4. Skorkowski E. F., Świerczyński J., Aleksandrowicz Z., (1977), *Comp. Biochem. Physiol.*, **58B**, 297—301.
5. Hsu R. Y., Lardy H. A., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 520—526.
6. Lin R. C., Davis E. J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3867—3875.
7. Hsu R. Y., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6675—6682.
8. Tang C. L., Hsu R. Y., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 287—291.
9. Skorkowski E. F., Biegniewska A., Aleksandrowicz Z., Świerczyński J., (1980), *Comp. Biochem. Physiol.*, **65B**, 559—562.
10. Świerczyński J., Ścisłowski P. W. D., Aleksandrowicz Z., Żydowo M., (1981), *Int. J. Biochem.*, **13**, 365—372.
11. Świerczyński J., Ścisłowski P. W. D., Skorkowski E. F., (1980), *Comp. Biochem. Physiol.*, **67B**, 49—55.
12. Skorkowski E. F., Świerczyński J., (1982), *Comp. Biochem. Physiol.*, **72B**, 647—650.
13. Brdiczka D., Pette D., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **19**, 546—551.
14. London J., Meyer L. Y., (1969), *J. Bacteriol.*, **98**, 705—711.
15. Korkes S., del Campillo A., Ochoa S., (1950), *J. Biol. Chem.*, **187**, 891—902.
16. Davis E. J., Lin R. C., Chao D., (1972) w *Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria* (Mehlman M. A., Hanson R. W. ed) 211—238, Academic Press New York.
17. Sauer L. A., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 524—531
18. Sauer L. A., (1973), *FEBS-Letters*, **33**, 251—255.
19. Mandella R. D., Sauer L. A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5877—5884.
20. Nagel W. O., Dauchy R. T., Sauer L. A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3849—3854.
21. Sauer L. A., Dauchy R. T., (1978), *Cancer Res.*, **38**, 1751—1756.
22. Świerczyński J., Ścisłowski P., Aleksandrowicz Z., Żelewski L., (1982), *Biochem. Med.*, **28**, 247—255.
23. Świerczyński J., (1981), *An. Acad. Med. Gedan.*, **11**, 11—29.
24. Świerczyński J., Davis E. J., (1981), *Biochem. International* **2**, 517—523.
25. Florin M., Stotz E. H., (1973), *Comprehensive Biochemistry* vol 13, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, London, New York.
26. Ruter W. J., Lardy H. A., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 374—382.
27. Hülsman W. C., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **62**, 620—627.
28. Gertler M. M., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **99**, 13—21.
29. Henderson N. S., (1966), *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 28—33.
30. Simpson E. R., Estabrook R. W., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 977—978.
31. Simpson E. R., Estabrook R. W., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**, 384—395.
32. Simpson E. R., Estabrook R. W., (1969), *Advan. Enzyme Regul.*, **7**, 259—279.
33. Frenkel R., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3069—3074.
34. Frenkel R., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 931—937.
35. Frenkel R., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5569—5572.
36. Bartholome K., Brdiczka D., Pette D., (1972), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 1487—1495.
37. Isohashi F., Shibayama E., Maruyama E., Aoki Y., Wada F., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **250**, 14—24.
38. Frenkel R., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 136—143.

39. Frenkel R., Cobo-Frenkel A., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 323—330.
40. Świerczyński J., (1981), *Int. J. Biochem.*, **13**, 843—850.
41. Goodridge A. G., (1968), *Biochem. J.*, **108**, 663—666.
42. Goodridge A. G., (1968), *Biochem. J.*, **108**, 667—673.
43. Bartley S. C., Abraham S., Chaikoff I. L., (1966), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **123**, 670—675.
44. Boll M., Bruckner E., Berndt J., (1982), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **363**, 103—106.
45. Wise E. M., Ball E. G., (1964), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **52**, 1255—1263.
46. Young J. W., Shrago E., Lardy H. A., (1964), *Biochemistry*, **3**, 1687—1692.
47. Żelewski M., Świerczyński J., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **758**, 152—157.
48. Nolte J., Brdiczka D., Pette D., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **284**, 497—507.
49. Hiltunen J. K., Davis E. J., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **678**, 115—121.
50. Opie L. H., Newsholme E. A., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 391—399.
51. Żelewski M., Świerczyński J., *Int. J. Biochem.* (1985), w druku.
52. Spydevold O., Davis E. J., Bremer J., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **71**, 155—165.
53. Lee S.-H., Davis E. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 420—430.
54. Karlsson J., (1971), *Acta Physiol. Scand., Suppl.*, **358**.
55. Hermansen L., Vaage O., (1977), *Am. J. Physiol.*, **233**, E422—429.
56. Meyerhof O., (1920), *Pfluegers Arch.*, **182**, 284—317.
57. Meyerhof O., Lohman K., Meier R., (1925), *Biochem. Z.*, **157**, 459—491.
58. Hill A. V., (1924), *Science*, **60**, 505—514.
59. Bendal J. R., Taylor A. A., (1970), *Biochem. J.*, **118**, 887—893.
60. Omachi A., Lifson N., (1956), *Am. J. Physiol.*, **185**, 35—40.
61. Hiatt H. H., Goldstein M., Lareu J., Horecker B., (1958), *J. Biol. Chem.*, **231**, 303—307.
62. Krebs H. A., Woodford M., (1965), *Biochem. J.*, **94**, 436—445.
63. Hermansen L., Vaage O., (1979), *Acta Physiol. Pol. Suppl.*, **18**, 63—79.
64. Davis E. J., Spydevold O., Bremer J., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **110**, 255—262.
65. Connett R., (1979), *Am. J. Physiol.*, **237**, C231—236.
66. Robinson B. H., Oei J., (1975), *FEBS-Letters*, **58**, 12—15.
67. Kornberg H. L., (1966), *Assays Biochem.*, **2**, 1—31.
68. Garland P. B., Randle P. J., (1964), *Biochem. J.*, **93**, 678—687.
69. Kraupp O., Adler-Kastner L., Niessner H., Pianck B., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **2**, 197—214.
70. Goodman M. N., Lowenstein J. M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5054—5060.
71. Aragon J. J., Lowenstein J. M., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **110**, 371—377.
72. Aragon J. J., Tornheim K., Goodman M. N., Lowenstein J. M., (1981), w *Current Topics in Cellular Regulation* vol. 18, (R. W. Estabrook, P. Srere) Academic Press New York, London, Toronto, Sydney.
73. Williamson J. R., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2308—2321.
74. Davis E. J., Bremer J., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **38**, 86—97.
75. Ścisłowski P. W. D., Aleksandrowicz Z., Świerczyński J., (1982), *Experientia*, **38**, 1034—1037.
76. Felig P., Pozefsky T., Marliss S., Cahil G. F., (1970), *Science*, **167**, 1003—1004.

77. Snell K., (1979), *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 124—128.
78. Blackshear P. J., Holloway P. A. M., Alberti K. G. M., (1975), *Biochem. J.*, **150**, 379—387.
79. Ruderman N. B., Berger M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5500—5506.
80. Garber A. J., Karl J. E., Kipnis D. M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 826—835.
81. Snell K., Duff D. A., (1977), *Biochem. J.*, **162**, 399—403.
82. Odessey R., Khairallah E. A., Goldberg A. L., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7623—7629.
83. Pozefsky T., Tancredi R. G., (1972), *J. Clin. Invest.*, **51**, 2359—2369.
84. Mallette L. E., Exton J. H., Park C. R., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5713—5723.
85. Felig P., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 933—955.
86. Cahil G. F., (1970), *N. Engl. J. Med.*, **282**, 668—675.
87. Goldstein L., Newsholme E. A., (1976), *Biochem. J.*, **154**, 555—558.
88. Chang T. W., Goldberg A. L., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3677—3684.
89. Wojtczak A. B., Wałajtys E., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **347**, 168—182.
90. Snell K., Duff D. A., (1979), *Int. J. Biochem.*, **10**, 423—426.
91. Snell K., Duff D. A., (1981) w *Metabolism and Clinical Implications of Branched Chain Amino and Ketoacid* (M. Walser, J. R. Williamson) 251—256 Elsevier/North Holand, New York.
92. LaNoue K. F., Bryła J., Basset D. J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7514—7521.
93. LaNoue K. F., Schoolwerth A. C., (1979), *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 871—922.

Regulacja nerkowego wydalania fosforanów. Zastosowanie izolowanych pęcherzyków błon luminalnych do badania transportu

Renal regulation of phosphate excretion. The use of isolated brush border membrane vesicles for the study of phosphate transport.

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Rola błony luminalnej komórek kanalików proksymalnych nerek w regulacji transcellularnego transportu fosforanów**
- III. Hormonalna regulacja transportu fosforanów przez błonę luminalną**
 - III-1. Parathormon**
 - III-2. Glukokortykoidy**
 - III-3. Hormon wzrostowy**
- IV. Niedobór fosforanów w diecie**
- V. Współzależność pomiędzy metabolizmem a transportem fosforanów w nerce**
- VI. Zależność nerkowego wydalania fosforanów od pH, stężenia wodorowęglanów i prężności dwutlenku węgla**
 - VI-1. Badania klirensowe**
 - VI-2. Badania mikropunkcyjne i mikroperfuzyjne**
 - VI-3. Zależność transportu fosforanów do pęcherzyków błon luminalnych od pH**
- VII. Fosfaturia wywołana maleinianem**

Contents

- I. Introduction**
- II. A role for luminal membrane of renal proximal tubules in the regulation of transcellular phosphate transport**
- III. Hormonal regulation of phosphate transport by luminal membrane**
 - III-1. Parathormon**
 - III-2. Glucocorticoides**
 - III-3. Growth hormon**
- IV. Phosphate depletion**
- V. Relationship between metabolism and phosphate transport in kidney**
- VI. Effect of pH, bicarbonate and $p\text{CO}_2$ on renal phosphate transport**
 - VI-1. Clirens study**
 - VI-2. Micropuncture and microperphusion studies**
 - VI-3. Effect of pH on phosphate transport by isolated brush border membrane vesicles**
- VII. Phosphaturia induced by maleate**

*) Dr, Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna, ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk

I. Wstęp

W trakcie ewolucji udział fosforanów w metabolizmie komórkowym ciągle się zwiększał, a już szczytowym wyrazem wszechobecności fosforanów, obok wapnia, w organizmie kregowców jest ich znaczenie w tworzeniu tkanki kostnej. Równolegle wytwarzały się elementy układu homeostaticznego warunkującego adaptację organizmu do zmieniającej się podaży fosforanów w pokarmie. Zróżnicowane zapotrzebowanie na fosforan przez poszczególne narządy, zmieniające się w zależności od fazy wzrostu lub ogólnie biorąc od stanu fizjologicznego organizmu, wywierało niemały wpływ na doskonalenie się układu homeostazy. Niewątpliwie nerka jest głównym ogniwem tego systemu, w niej bowiem rozwinęły się mechanizmy zapewniające adaptację transportu kanalikowego fosforanów do potrzeb organizmu jako całości. Wystarczy przypomnieć, że przy niedoborze fosforanów w pokarmie ich wydalanie z moczem maleje do zera. Fosforany należą do tych substancji obok wody, sodu i wapnia, których wydalanie przez nerki podlega kontroli hormonalnej. Dotychczas nie mamy pełnego obrazu współzależności poszczególnych elementów systemu homeostazy warunkującej adaptację transportu kanalikowego do potrzeb organizmu. Jeszcze teraz poszukuje się hormonu, który by zapobiegał wydalaniu fosforanów z moczem przy zmniejszonej ich podaży z pokarmem. Ostatnio doniesiono, że epinefryna jest hormonem hypofosfatemicznym u człowieka (1). Dopiero teraz identyfikuje się miejsca, w których odbywa się transport fosforanów, natomiast niewiele wiemy o czynnikach regulujących resorpcję fosforanów w poszczególnych odcinkach nefronu (2, 3, 4). Do niedawna przypuszczano, że transport fosforanów ma miejsce jedynie w początkowych odcinkach kanalika proksymalnego. Obecnie wiadomo, że tak nie jest, że odcinek dystalny kanalika proksymalnego, tzw. część prosta, odgrywa znaczącą rolę w regulacji transportu fosforanów, natomiast o roli dystalnego odcinka w tym względzie na razie nic nie wiemy. Wiele danych wskazuje na to, że nie w błonie antyluminalnej lecz luminalnej znajdują się elementy systemu regulującego transport fosforanów przez komórkę kanalikową (5, 6, 77).

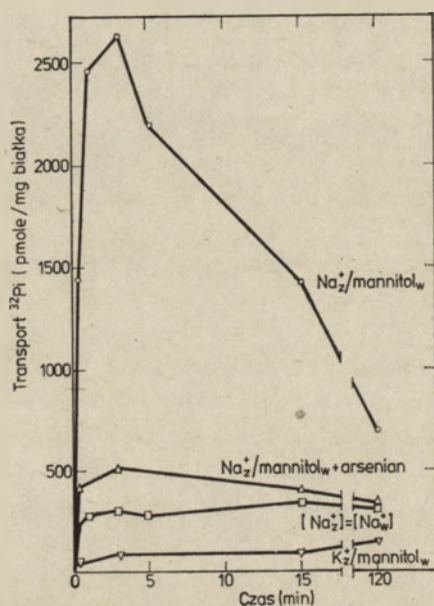
Transport fosforanów ze światła kanalika nerkowego odbywa się przez pojedynczą warstwę komórek nabłonkowych, które w obrębie kanalika proksymalnego połączone są pomiędzy sobą zvarciami o dużej przepuszczalności. Aniony zreabsorbowane z przestrzeni pozakomórkowej przemieszczają się do włóśniczek, które bezpośrednio przylegają do błony podstawowej. Odległość pomiędzy tą błoną a ścianą kapilary nie przekracza 20 μm . Dzięki kosmkom tworzącym tzw. rąbek szczoteczkowy powierzchnia błony luminalnej komórek nabłonkowych kanalika proksymalnego jest znacznie większa aniżeli błony przeciwległej (7). System elementów kurczliwych opasujących biegun luminalny komórek nabłonkowych wprawia w ruch znajdujące się tam kosmki, które mieszając przepływający przesącz

kłębkowy ułatwiają kontakt substancji ulegających absorpcji do miejsc ich wiązania na powierzchni błony luminalnej (8, 9). Transport fosforanów odbywa się transcelularnie i ma charakter aktywny. Z przesącza kłębkowego przemieszczają się one przez błonę luminalną do wnętrza komórki wbrew potencjałowi elektrycznemu, który wynosi około 60 mV (ujemny we wnętrzu komórki) a także wbrew gradientowi ich stężeń. W płynie przesącza stężenie fosforanów w warunkach prawidłowych nie przekracza 2.5 mM, a we wnętrzu komórki nerkowej wynosi około 5 mM. Przepływ fosforanów z komórki przez błonę antyluminalną do krwi odbywa się biernie zgodnie z gradientem potencjałów elektrochemicznych, podobnie jak anionów wodorowęglanowych. Natomiast transport fosforanów przez błonę luminalną jest sprzęgnięty z transportem jonów sodu, których stężenie (145 mM) w płynie kanalika proksymalnego na całej jego długości nie ulega zmianie (10), pomimo ciągłej resorpcji (bo aż 50% tam się wchłania). Stąd wielkość siły napędowej transportu fosforanów jaką stanowi różnica stężeń jonów sodu po obu stronach błony luminalnej, pozostaje niezmienną na całym przebiegu kanalika proksymalnego, oczywiście pod warunkiem, że nie ulega zmianie wewnątrzkomórkowe stężenie jonów sodu (40 mM). Bierny transport jonów sodu przez błonę luminalną do wnętrza komórki, a więc zgodny z gradientem elektrochemicznym jest więc siłą napędową przemieszczającą fosforany wbrew gradientowi elektrochemicznemu. Różnica potencjału elektrochemicznego Na^+ po obu stronach błony utrzymywana jest dzięki aktywności Na-K-ATPazy zlokalizowanej wyłącznie w błonie bazolateralnej. Zahamowanie aktywności pompy sodowej prowadzi do zahamowania transportu wszystkich substancji kotransportowanych z jonami sodu, m.in. i fosforanów (11). Jest to więc transport „aktywnie wtórny” w odróżnieniu od aktywnie pierwotnego, w którym transport danej substancji przez błonę wbrew gradientowi elektrochemicznemu jest sprzęgnięty bezpośrednio z reakcją egzoergiczną. Badania z użyciem izolowanych pęcherzyków rąbka szczoteczki błon luminalnych kory nerek jednoznacznie wykazały kotransport fosforanów z jonami sodu (12, 13).

II. Rola błony luminalnej komórek kanalików proksymalnych nerek w regulacji transcelularnego transportu fosforanów

Błona luminalna komórek kanalików proksymalnych nerki w przeciwieństwie do błony antyluminalnej prawdopodobnie nie zawiera pomp kationowych. Znajdują się w niej jednak swoiste wymiennicze i nośniki, m.in. anionowe, biorące udział w przemieszczaniu składników przesącza kłębkowego do wnętrza komórek i odwrotnie końcowych produktów przemiany z komórek do moczu. W błonie luminalnej wykazano m.in. obecność kilkunastu enzymów, których znaczenie fizjologiczne jak dotychczas nie

zostało wyjaśnione (14). Niektóre z nich są ektoenzymami, bowiem ich centra aktywne „patrzą” w kierunku światła kanalika np. pirofosfataza dinukleotydomowa, 5' nukleotydomaza (15). W trakcie izolacji błon luminalnych ich fragmenty zamykają się spontanicznie, utworzone pęcherzyki nadal zachowują pierwotną orientację przestrzenną, tzn. że strona zewnętrzna błony pęcherzyka jest skierowana ku środowisku zewnętrznemu (16). Pęcherzyki są bardzo trwałe i stanowią idealny model do badania procesów transportu szczególnie dlatego, że ich wnętrze jest pozbawione aparatu metabolizującego.



Ryc. 1. Transport fosforanów do izolowanych błon rąbka szczoteczki kory nerek królika. Środowisko wewnątrzpęcherzykowe zawierało 300 mM mannitol, 5 mM HEPES/Tris, pH 7.5, lub 100 mM NaCl (Na^+_{w}) w 100 mM mannitolu. Środowisko zewnątrzpęcherzykowe: 0.1 mM, $\text{K}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$, 100 mM NaCl (Na^+_{z}) lub 100 mM KCl (K^+_{z}) w 100 mM buforowanym mannitolu. Na_2AsO_4 był 5 mM. Według (13).

Ryc. 1 przedstawia krzywe ilustrujące przebieg akumulacji fosforanów w pęcherzykach. Jak widać, w obecności gradientu jonów sodu początkowy odcinek krzywej ma przebieg liniowy, po około 2 min obserwuje się maksimum akumulacji, następnie stężenie fosforanów maleje, osiągając stan równowagi po kilkunastu minutach. W nieobecności gradientu stężeń jonów sodu $\text{Na}^+_{\text{z}} = \text{Na}^+_{\text{w}}$ krzywa akumulacji fosforanów w pęcherzykach ma przebieg podobny do krzywej w obecności jonów potasu, rubidu, litu czy też choliny. Oznacza to, że siłą napędową transportu fosforanów jest różnica stężeń jonów sodu po obu stronach błony, a nie ich bezwzględne stężenia. Szybkość transportu fosforanów wykazuje zależność liniową od $\log [\text{Na}^+_{\text{z}}]/[\text{Na}^+_{\text{w}}]$. Przypuszczalnie system transportujący fosforan akceptuje

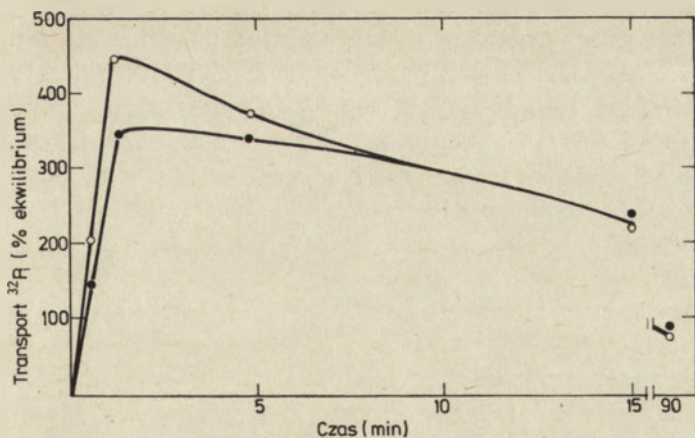
z tym samym powinowactwem zarówno pierwszo jak i drugorzędowy fosforan, chociaż ich transport zależy bardzo znacznie od pH środowiska badanego, co będzie przedmiotem rozważań w następnym rozdziale. Silnym kompetycyjnym inhibitorem transportu fosforanów jest arsenian, często stosowany do blokowania transportu.

III. Hormonalna regulacja transportu fosforanów przez błonę luminalną

III-1. Parathormon

Obecnie jesteśmy zgodni co do tego, że parathormon działa fosfaturycznie za pośrednictwem cAMP (17). Jednakże dopiero teraz zarysowuje się obraz jego działania (76). Parathormon, jak i cykliczny AMP nie tylko hamują resorpcję fosforanów w kanaliku proksymalnym, lecz prawie w 50% obniżają izotoniczną resorpcję płynu kanalikowego w proksymalnym odcinku nefronu (18, 19). Podczas gdy w dystalnych odcinkach nefronu jony sodowe i towarzyszące im aniony wodorowęglanowe ulegają resorpcji, to nie wchłonięty fosforan w kanalikach proksymalnych przechodzi do moczu ostatecznego (20). Jak już wspomniano sugeruje się możliwość udziału części prostej kanalika proksymalnego w nerkowej regulacji transportu fosforanów, niezależnej od układu parathormon-cykliczny AMP.

Ryc. 2 przedstawia zależność transportu fosforanów do izolowanych pęcherzyków błon rąbka szczoteczki kory nerek szczurów od parathormonu. Obserwuje się znaczną stymulację transportu fosforanów u szczurów pozbawionych endogennego parathormonu w porównaniu do szczurów potraktowanych parathormonem. Jak wykazano zwiększa się nie



Ryc. 2. Zależność transportu fosforanów do izolowanych pęcherzyków błon luminalnych kory nerek szczurów od parathormonu. Po usunięciu przytarczyc (●—●), po podaniu parathormonu (O—O). Według (21).

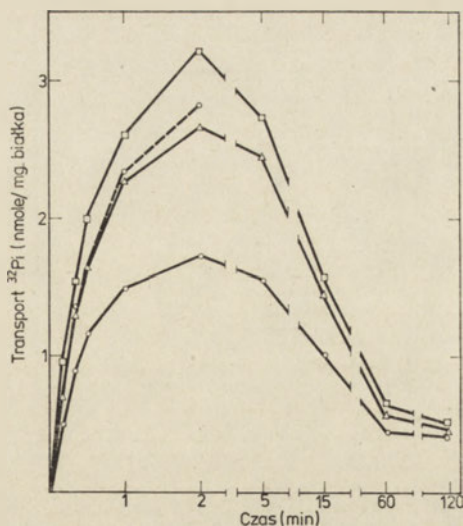
tylko szybkość maksymalna ale także tzw. szczytowa akumulacja fosforanów, chociaż wartość K_m dla fosforanów nie różni się w obu grupach zwierząt (22, 23). Nie zmienia się transport sodu ani też zależny od gradientu jonów sodu transport glukozy. Parathormon stymulując cyklazę adenilową prowadzi nie tylko do podwyższenia stężenia cAMP w nerce, lecz także do zwiększonego jego wydalania z moczem, które wyprzedza o kilka minut fosfaturię. Przypuszczano więc, że fosforylacja nośnika fosforanów błony luminalnej, za pośrednictwem kinazy białkowej stymulowanej przez cAMP, byłaby odpowiedzialną za inhibicję transportu fosforanów (24, 25, 26). Ostatnio wykazano, że w obecności cAMP ulegają fosforylacji dwa różne białka błon luminalnych, czemu towarzyszyło zahamowanie transportu fosforanów (27). Ostatnio jednakże Biber i wsp. (28) nie stwierdzili prostej korelacji między fosforylacją a transportem. Wykazali bowiem, że również w nieobecności cAMP dochodzi do fosforylacji tych białek. Chociaż doświadczenia te nie podważają roli PTH w regulacji transportu fosforanów w nerce, niemniej jednak narzucające się uogólnienie o ścisłej współzależności między fosforylacją białka nośnikowego fosforanów błony luminalnej a ich transportem oczekuje nadal na doświadczalne potwierdzenie.

III-2. Glukokortykoidy

Od dawna wiadomo, że glukokortykoidy wywołują fosfaturię (29). Nie działają one jednak za pośrednictwem parathormonu (30). Transport fosforanów do pęcherzyków błon luminalnych szczurów potraktowanych kortizonem jest wyraźnie zahamowany w porównaniu do grupy zwierząt kontrolnych (31), (Ryc. 3). Amiloryd, swoisty inhibitor wymiennicza $Na^+ \leftrightarrow H^+$ znosi działanie glukokortykoidów (32, 33). Amiloryd, znany diuretyk, stymuluje transport fosforanów do pęcherzyków, hamując bowiem wymianę $Na^+ \leftrightarrow H^+$ zwiększa gradient jonów sodu po obu stronach błony, przede wszystkim dlatego, że blokuje ich wejście do wnętrza pęcherzyków, a więc zwiększa siłę napędową transportu fosforanów. Wydaje się że stymulacja przez glukokortykoidy wymiennicza $Na^+ \leftrightarrow H^+$ jest prawdopodobnie głównym miejscem działania tego hormonu.

III-3. Hormon wzrostowy

Zwiększone zapotrzebowanie organizmu na fosforan w okresie wzrostu związane jest m.in. z działaniem hormonu wzrostowego, który podany w iniekcji działa hypofosfaturycznie (34). Znajduje to swoje odbicie również w transporcie fosforanów przez błony luminalne. Wykazano bowiem podwyższenie szybkości początkowej transportu fosforanów i zwiększoną ich



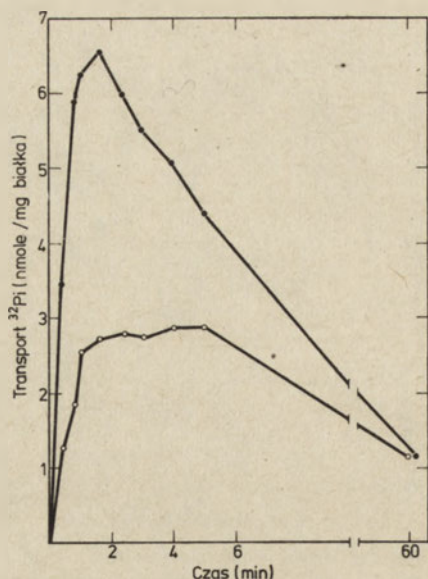
Ryc. 3. Zależność transportu fosforanów do izolowanych pęcherzyków błon luminalnych kory nerek szczurów od glukokortykoidów. Szczury normalne (\square — \square); po adrenalectomii (\triangle — \triangle), po podaniu deksametazonu (\circ — \circ). Transport fosforanów do pęcherzyków w obecności deksametazonu i amiloridu (\circ — --- — \circ). Według (32).

akumulację w pęcherzykach błon luminalnych kory nerek szczurów otrzymanych od szczurów potraktowanych hormonem wzrostowym (35).

IV. Niedobór fosforanów w diecie

Wiele uwagi, szczególnie w ostatnich latach, poświęcono wpływowi zawartości fosforanów w diecie na ich nerkowe wydalanie (36, 37). Niedobór fosforanów w pokarmie powoduje ich zwiększone wchłanianie w nerce prowadząc przy całkowitym niedoborze do ich eliminacji z moczem. Podobną hypofosfaturię obserwujemy w hypokapnii oraz po jednorazowej iniekcji litu (38, 39, 40).

Ryc. 4 ilustruje zależny od sodu transport fosforanów do pęcherzyków błon luminalnych kory nerek świń karmionych dietą o niskiej zawartości fosforanów (41). Zwiększa się nie tylko szybkość transportu ale także szczytowa akumulacja fosforanów w porównaniu ze stwierdzoną w grupie kontrolnej. W żadnym przypadku nie stwierdzono zmian w transporcie sodu i glukozy. Przy długotrwałym niedoborze fosforanów w pokarmie wykazano, obok stymulacji transportu fosforanów na koszt gradientu sodu również zahamowanie transportu glukozy i aminokwasów do wnętrza izolowanych pęcherzyków błon (41). Niemniej jednak, daje się wyraźnie różnicować specyficzny wpływ niedoboru fosforanów w czasie na ich transport przez błonę luminalną kory nerek.

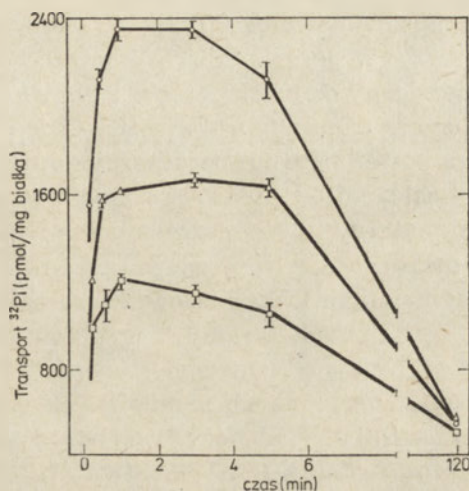


Ryc. 4. Transport fosforanów do izolowanych pęcherzyków błon luminalnych kory nerek świń na diecie niskofosforanowej (●—●) i na diecie normalnej (○—○). Według (41).

V. Współzależność pomiędzy metabolizmem a transportem fosforanów w nerce

W poszukiwaniu współzależności między transportem fosforanów a metabolizmem komórkowym zwracano ostatnio uwagę, że fosfaturii towarzyszy stymulacja procesu glukoneogenezy (42, 84). Parathormon, cAMP, glukokortykoidy, kwasica metaboliczna, głódzenie, wywołują zwiększone wydalanie fosforanów do moczu, a w warunkach *in vitro* stymulują glukoneogenezę w izolowanych komórkach kanalików nerkowych (43, 44). Z kolei, zasadowica oddechowa, podanie litu i niedobór fosforanów w diecie hamują glukoneogenezę, a jednocześnie działają hypofosfaturycznie (45, 46, 47). Ponadto ostatnio zwracano uwagę na ewentualną rolę fosfatazy alkalicznej w procesie transportu fosforanów przez błonę luminalną kanalików nerkowych (48, 49). Obserwacje te oraz fakt, że NAD jest stosunkowo silnym inhibitorem fosfatazy alkalicznej (50) doprowadziły do wniosku, że głównym wewnątrzkomórkowym mediatorem transportu fosforanów przez błonę luminalną są zmiany cytozolowego stężenia NAD, które są w pewnym stopniu odbiciem intensywności procesu glukoneogenezy, a to z kolei odpowiadałoby za zmianę NAD^+/NADH w cytoplazmie komórki (42). Przypuszczenia te nabrały siły przekonania kiedy Dousa i wsp. (42) wykazali, że NAD dodany do środowiska zawierającego izolowane pęcherzyki błon luminalnych silnie hamował transport ^{32}P na koszt gradientu Na^+ (42).

(Ryc. 5) NAD nie miał wpływu na transport jonów sodu ani też glukozy, co świadczyć miało o dużej swoistości NAD. Wprost spektrakularnym potwierdzeniem znaczenia NAD w nerkowej regulacji wydalania fosforanów było wykazanie, że jednorazowe podanie amidu kwasu nikotynowego powodowało nie tylko fosfaturię, ale jednocześnie zwiększało się prawie 3-krotnie stężenie NAD w nerce oraz zmniejszał się transport fosforanów do izolowanych pęcherzyków błon kory tych nerek (42). Amid kwasu nikotynowego nie zmieniał stężenia cAMP w nerce.



Ryc. 5. Transport fosforanów na rzecz gradientu Na^+ do izolowanych pęcherzyków błon luminalnych kory nerek szczurów inkubowanych z NAD. Kontrola (O—O), w obecności 0.030 mM NAD, Δ — Δ ; i 0.30 mM NAD (\square — \square). Według (42).

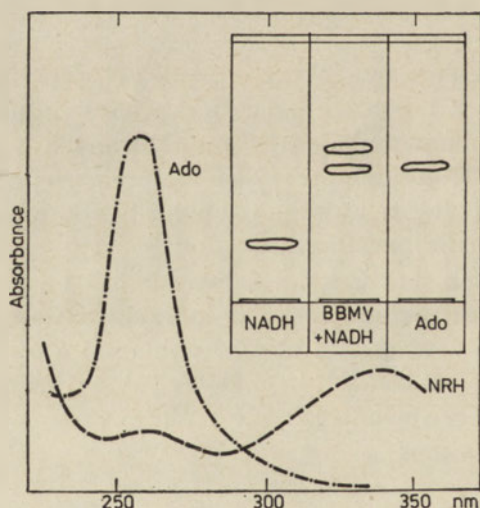
Pewnym zaskoczeniem był fakt, że również NADH hamował transport fosforanów. Zgodnie z hipotezą D o u s a i wsp. należało się spodziewać specyficzności działania, wynikającej z implikowanych współzależności pomiędzy transportem fosforanów przez błonę luminalną a procesem glukoneogenezy. Tym bardziej, że autorzy ci znaleźli dodatnią korelację pomiędzy stymulowaną przez parathormon glukoneogenezą a wzrostem NAD/ NADH w korze nerek (51). Z kolei dziwne było i to, że NAD dodawano wprost do środowiska zawierającego pęcherzyki a więc kontaktował się on jedynie ze stroną zewnętrzną błony luminalnej a nie wewnętrzną tak jak ma to miejsce w warunkach *in vivo*. A już dużym zaskoczeniem był fakt, że inhibicję obserwowano jedynie po kilkunastominutowej preinkubacji NAD z pęcherzykami.

Wkrótce po ogłoszeniu pracy przez D o u s e i wsp. (42) ukazały się prace nie tylko potwierdzające wyniki doświadczeń tych autorów lecz również wyjaśniające mechanizm molekularny działania NAD na błonę luminalną (52). Przy użyciu perfundowanych kanalików proksymalnych stwierdzono, że nie tylko NAD lecz również ATP, ADP i AMP hamowały

transcelularny transport ^{32}P i ze światła kanalika do płynu otaczającego (53). Wykazano ponadto, że ADP-ryboza hamuje transcelularny transport ^{32}P oraz akumulację ^{32}P do izolowanych pęcherzyków błon luminalnych kory nerek, stopień inhibicji był podobny do NAD.

H a m m e r m a n i w s p. (52) wykazali, że w obecności NAD dochodzi do mono ADP-rybozylacji białka błony luminalnej o masie cząsteczkowej 62 000. Nikotynamid, znany inhibitor ADP-rybozylacji hamował ten proces. Jak twierdzą ci autorzy, w wyniku ADP-rybozylacji błony luminalnej w obecności 100 μM NAD w ciągu 30 min w pH 8.0 dochodzi do równoległego z ADP-rybozylacją zahamowania transportu fosforanów do pęcherzyków tych błon rzędu 40% w porównaniu do kontroli. Według tych autorów miały to być niezależny od cAMP proces kowalencyjnej modyfikacji białka odpowiedzialnego za transport fosforanów, ADP-rybozylacja byłaby również inicjowana za pośrednictwem parathormonu, tylko w przeciwieństwie do fosforylacji zależnej od cAMP, prowadziłaby do efektów dłużej trwających. Jak piszą autorzy, wyższe stężenia PTH inicjowałyby ADP-rybozylację białek a niższe fosforylację zależną od cAMP (52).

Już poprzednio wymieniłem kilka faktów, które nakazywały z dużym sceptyzmem odnieść się do przedstawionych wyników doświadczeń i wynikających z nich dalszych ujęć. Niedawno stwierdziliśmy, że w wyniku inkubacji NAD (300 μM) w warunkach identycznych do tych jakie stosował Dousa i w s p. (42) uwalnia się adenozyzna, rybozyd amidu kwasu nikotynowego i nieorganiczny fosforan (Ryc. 6). Stwierdziliśmy, że izolowane pęcherzyki rąbka szczoteczkowego wykazują aktywność pirofosfatazy nukleotydowej oraz 5'nukleotyduazy; rozkładają one nie tylko NAD ale także



Ryc. 6. Produkty degradacji NADH po inkubacji z izolowanymi błonami rąbka szczoteczkowego kory nerek szczura. Adenozyzna Ado, błony rąbka szczoteczkowego BBMV, rybozyd amidu kwasu nikotynowego NRH. Krzywe przedstawiają widma izolowanych Ado i NRH po rozdziale na chromatografii cienkowarstwowej. (według 15).

NADH, NADP, NADPH, ATP, ADP, AMP, koenzym A (15). W obecności każdego z tych substratów uwalniał się nieograniczony fosforan, którego stężenie zależało od użytego substratu i jego końcowego stężenia (55). Przy użyciu metody mikrodyseksji pozwalającej na oznaczanie aktywności pyrofosfatazy dinukleotydu w przebiegu całego nefronu stwierdzono, że największą aktywność wykazują końcowe odcinki kanalika proksymalnego (Tabela 1). NADH jest lepszym od NAD substratem pyrofosfatazy,

Tabela 1.

Aktywność pyrofosfatazy dinukleotydu w poszczególnych odcinkach nefronu szczura

Fragmenty nefronu	Aktywność pirofosfatazowa (μ mole P/mg suchej tkanki/min)
Kłębki	3.4 \pm 1.47
Kanaliki proksymalne, odcinek bliższy	9.76 \pm 1.37
Kanaliki proksymalne, odcinek dalszy	14.09 \pm 3.74
Kanaliki proksymalne, odcinek prosty	32.27 \pm 3.06
Pętla Henlego wstępująca	1.11 \pm 0.24
Kanalik dystalny	2.28 \pm 1.25
Kanalik zbiorczy	2.71 \pm 1.22

Wartości przedstawiają średnie \pm SM. Według (55).

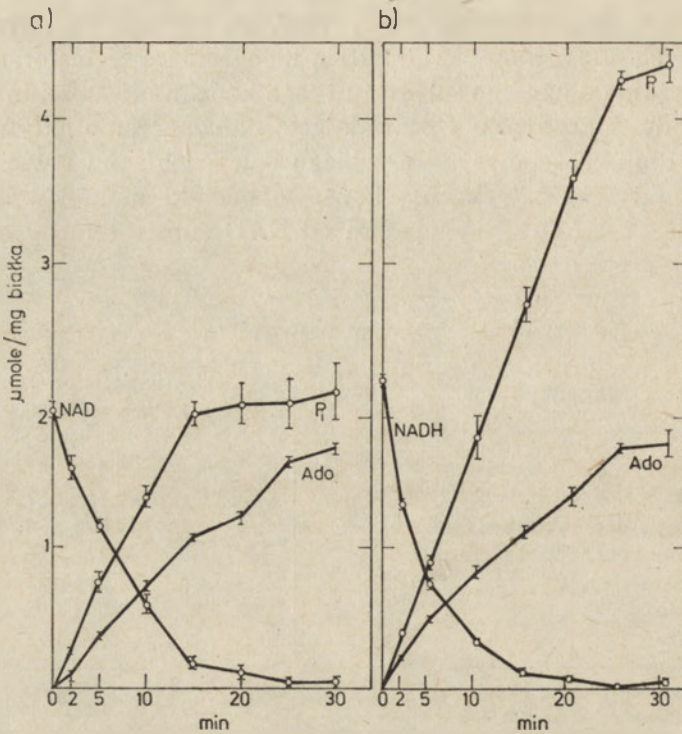
Wartości przedstawiają średnie \pm SM, n = 5

Poszczególne odcinki nefronów wyodrębniano z zamrożonych skrawków nerek szczura, po identyfikacji inkubowano w obecności NAD.

prawdopodobnie postać zredukowana mononukleotydu amidu kwasu nikotynowego ulega szybszemu rozkładowi, aniżeli postać utleniona (Ryc. 7). Doświadczenia te niedwuznacznie wykazują, że w trakcie inkubacji NAD z pęcherzykami błon luminalnych dochodzi do jego degradacji.

Jest więc wielce prawdopodobne, że w warunkach doświadczalnych stosowanych przez Douse i wsp. (42) powstający w trakcie preinkubacji z NAD a także ADP, AMP, ADP-rybozy nieradioaktywny fosforan rozcieńczał stosowany do badania transportu 32 Pi którego końcowe stężenie w badanych próbach na ogół nie przekraczało 0.1 mM, natomiast stosowane stężenia NAD były tego samego rzędu lub nawet wyższe. Rozcieńczenie 32 Pi przez nieradioaktywny fosforan było odczytywane jako efekt hamowania transportu fosforanów przez stosowane do badań nukleotydy. Należy tu zwrócić uwagę, że optimum pH dla pyrofosfatazy dinukleotydu wynosi 8.5—9.0. Nasze przypuszczenia znalazły również potwierdzenie w ogłoszonej ostatnio pracy (56).

Dla pełniejszego potwierdzenia naszej tezy o wątpliwym znaczeniu NAD w regulacji transportu fosforanów przez błonę luminalną w warunkach fizjologicznych tj. wtedy gdy znajduje się on we wnętrzu komórki i oddziałuje na wewnętrzną stronę błony luminalnej, przeprowadziliśmy badania transportu fosforanów po uprzednim naładowaniu pęcherzyków NAD stosując różne warunki inkubacji.



Ryc. 7. Degradacja NAD i NADH przez izolowane błony luminalne kory nerek szczura. Środowisko inkubacyjne zawierało: 1 mM NAD lub NADH, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0. Krzywe ilustrują zużycie NAD lub NADH oraz powstawanie Pi i adenozyiny (Ado) w czasie. Według (55).

Pęcherzyki ładowano NAD poddając je szokowi osmotycznemu w pH 7.2 lub 8.0 w obecności 10 mM NAD. Zewnątrzpęcherzykowy NAD usuwano przy użyciu Dowex 1×2 (Tabela 2). Nie stwierdzono żadnych różnic w transporcie ^{32}P i pomiędzy pęcherzykami, które zawierały zarówno NAD na zewnątrz jak i wewnątrz pęcherzyków, jeżeli uprzednio nie były one preinkubowane z NAD przez 30 min w pH 8.0 (Ryc. 8A). Natomiast pęcherzyki preinkubowane z NAD, nie traktowane jonitem Dowex, trans-

Tabela 2.

Zawartość NAD w pęcherzykach błon luminalnych

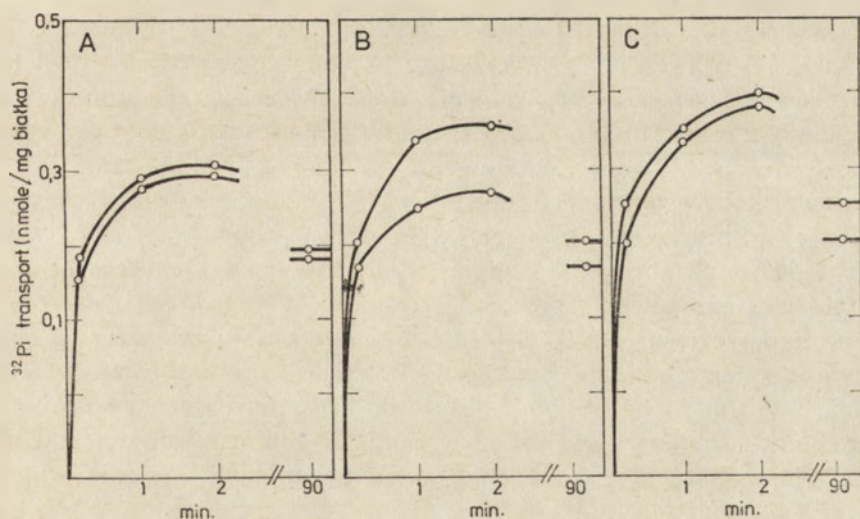
	NAD ($\mu\text{mole/mg}$ białka)
Szok osmotyczny w obecności 10 mM NAD po potraktowaniu jonitem Dowex 1×2	6.7
10 mM NAD dodany po szoku osmotycznym po potraktowaniu jonitem Dowex 1×2	0.2
Szok osmotyczny w obecności 10 mM NAD, nie traktowano jonitem Dowex	1330.0

Według (57)

portowały ^{32}P znacznie wolniej (Ryc. 8B). Szczytowa akumulacja ^{32}P była również obniżona w porównaniu do pęcherzyków potraktowanych jonitem Dowex, a więc w środowisku nie zawierającym NAD na zewnątrz lecz jedynie wewnątrz pęcherzyków. Nie stwierdzono też żadnego wpływu NAD na transport fosforanów, jeżeli pęcherzyki preinkubowano przez 30 min w pH 7.2 (Ryc. 8C).

Stwierdzono, że inkubacja pęcherzyków z ^{32}P -NAD prowadzi do szybkiej inkorporacji ^{32}P i do białek błon luminalnych, nie stwierdzono jednak żadnych różnic w inkorporacji ^{32}P i w trzech różnych doświadczeniach, tj. wtedy gdy pęcherzyki poddawano szokowi osmotycznemu, traktowano saponiną lub w warunkach, które zapobiegały przenikaniu NAD do wnętrza pęcherzyków. Nie wykazano również inkorporacji ^3H do białek błon rąbka szczoteczki wtedy gdy inkubowano je w obecności adenina-2,8- ^3H -NAD. Wyniki te wyraźnie wskazują, że ADP-rybozylacja błon w warunkach przez nas stosowanych jest mało prawdopodobna.

Powstaje pytanie, w jaki sposób wytłumaczyć fosfaturyczne działanie amidu kwasu nikotynowego, który jak już od dawna wiadomo, zwiększa syntezę i stężenie NAD w nerce. Wydaje mi się, że dodatnia korelacja między stężeniem NAD w nerce a fosfaturią jest przypadkowa. Amid kwasu nikotynowego nie tylko stymuluje syntezę NAD, lecz stosowany w tak dużych dawkach 1 g/kg ciężaru ciała, wywołuje szereg innych zmian metabolicznych, które być może w sposób pośredni hamują transcelularny transport fosforanów.



Ryc. 8. Transport fosforanów do izolowanych pęcherzyków błon luminalnych kory nerek szczura w obecności wewnątrzpęcherzykowego NAD. Wyjaśnienie w tekście. Według (57).

VI. Zależność nerkowego wydalania fosforanów od pH, stężenia wodorowęglanów i prężności dwutlenku węgla

VI-1. Badanie klirensowe

Z obserwacji klinicznych od dawna było wiadomo, że ostre zaburzenia oddechowe prowadzące do kwasicy lub zasadowicy oddechowej mają wpływ na gospodarkę fosforanową (58, 59). Zasadowica oddechowa wywołuje hypofosfaturię, której towarzyszy hypofosfatemia, odwrotnie kwasica oddechowa przebiega z hyperfosfatemią i hyperfosfaturią (60). Spostrzeżenia te potwierdzono w badaniach klirensowych na zwierzętach, z których wynika, że hyperkapnia w porównaniu do normokapnii nawet u zwierząt pozbawionych przytarczyc również wywołuje hyperfosfaturię, która nie zależy od towarzyszącej jej hyperfosfatemii. Wykazano ponadto, że w kwasicy oddechowej ani zmiany stężenia wodorowęglanów ani też zmiany pH krwi nie miały większego znaczenia na wydalanie fosforanów z moczem (61).

Doświadczenia przeprowadzone na zwierzętach z zasadowicą oddechową, którym usunięto przytarczycę, doprowadziły do wniosku, że obniżeniu prężności dwutlenku węgla ($p\text{CO}_2$) w krwi zwiększa resorpcję fosforanów w nerce (40). Stwierdzono ponadto, że w hypokapnii parathormon jak również cAMP nie mają żadnego wpływu na nerkowe wydalanie fosforanów nawet wtedy gdy skoryguje się pH krwi do wartości prawidłowych. Wynika stąd, że hypokapnia a nie zasadowica oddechowa powoduje, że komórki kanalików nerkowych są niewrażliwe na działanie parathormonu i cyklicznego AMP.

Podobny stan refrakcji nerek w stosunku do parathormonu i cAMP obserwuje się u zwierząt potraktowanych jednorazową dawką LiCl (39). U szczurów po podaniu litu spada pH krwi, obserwuje się umiarkowaną hypokapnię, kwasicę metaboliczną zewnątrzkomórkową, której prawdopodobnie towarzyszy zasadowica wewnątrzkomórkowa (38, 62, 63).

Bardziej kontrowersyjne są dane o wpływie kwasicy i zasadowicy metabolicznej na przemiany fosforanów. Kwasica metaboliczna, którą w warunkach doświadczalnych najczęściej wywołuje się dożołądkowym podaniem chlorku amonowego, powoduje hyperfosfatemię, której towarzyszy znaczna hyperfosfaturia (64). Ostatnio wykazano, że u szczurów po podaniu kwasu solnego bądź mlekowego dochodzi do fosfaturii lecz o znacznie łagodniejszym przebiegu w porównaniu do tej, jaką obserwowano po podaniu chlorku amonowego, chociaż acidemia w obu grupach zwierząt była podobna (65). Dane te wskazują na znaczenie amoniaku oprócz acidemii w nerkowym wydalaniu fosforanów.

Zarówno jony amonowe jak i jony wodorowe modyfikują fosfaturyczne działanie parathormonu (38, 66, 67, 68, 69). W tym względzie stwierdzono duże różnice gatunkowe (68). Wykazano bowiem, że w warunkach nor-

malnych chomiki syryjskie nie odpowiadają fosfaturią na parathormon, czynnikiem uwrażliwiającym nerkę na parathormon był chlorek amonowy ale nie sama kwasica (70). Niemniej kontrowersyjne są dane o wpływie zasadowicy metabolicznej na metabolizm fosforanów. Infuzja wodorowęglanów powoduje fosfaturię chociaż nie wyklucza się możliwości, że jest ona wynikiem wzrostu prężności dwutlenku węgla, który towarzyszy temu zaburzeniu (61, 71, 72).

VI-2. Badania mikropunkcyjne i mikroperfuzyjne

Przytoczone dane niedwuznacznie wskazują na znaczenie pH i pCO_2 jako czynników modyfikujących transport fosforanów w nerce, niezależnie od wpływu parathormonu na ten proces. Nasuwa się pytanie, czy obserwowane zmiany w transporcie fosforanów dotyczą całego nefronu, czy też istnieje swoista wrażliwość poszczególnych odcinków nefronu, transportujących fosforan, na działanie wymienionych czynników. Doświadczenia przeprowadzone przy użyciu techniki mikropunkcji i mikroperfuzji zdają się wskazywać na słuszność tego ostatniego poglądu (73). Zanim jednak przejdę do ich omawiania, zwróćmy uwagę na dane Tabeli 3 ilustrujące

Tabela 3.

Transcelularny transport fosforanów w izolowanych kanalikach nerkowych

	Transport (pmole/mm · min)
Kanalik proksymalny część bliższa	10.6
Kanalik proksymalny część dalsza	3.4
Kanalik proksymalny część prosta	1.9
Kanaliki zbiorcze	0.46

Według (11)

transport fosforanów w poszczególnych odcinkach nefronu królika uzyskane na drodze mikroperfuzji (11). Transport netto fosforanów odbywa się tylko w kanaliku proksymalnym i kanalikach zbiorczych. Największą szybkość transportu fosforanów wykazują początkowe odcinki kanalika proksymalnego, a prawie pięciokrotnie mniejszą części końcowe tych kanalików. Nie mamy odpowiednich danych dla kanalików szczura a także psa, u których intensywność transportu fosforanów jest prawdopodobnie zbliżona do tej, którą się obserwuje u ludzi. Następujące zestawienie ilustruje istniejące różnice gatunkowe w nerkowym wydalaniu fosforanów. (Tab. 4.). Jak widać, szczur wydalą z moczem zaledwie niecały jeden procent ilości fosforanów przefiltrowanych, podczas gdy królik i chomik wchłaniają tylko około 80%, a aż 20% wydalają do moczu (74).

Tabela 4.

Różnice gatunkowe w nerkowym wydalaniu fosforanów

	FW _{Pi} %	KR _{Pi} $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg c.c.}$
Szczur	0.8	20
Królik	22	3.6
Chomik	16	12.3

FW_{Pi} % — frakcyjne wydalanie fosforanów w procentach przesączu kłębkowego, KR_{Pi} — kanalikowa resorpcja fosforanów

Według (74).

W badaniach wykonanych na szczurach pozbawionych przytarczyc Ullrich i wsp. stosując *in situ* perfuzję początkowego odcinka kanałika proksymalnego i otaczającej go włosniczki doszli do wniosku, że głównym czynnikiem regulującym transport fosforanów jest pH a nie pCO₂ (75). Perfundując kanalik proksymalny płynem izotonicznym zawierającym ³²Pi oraz bufor wodorowęglanowy o zmiennym pH, pCO₂ i stężeniu wodorowęglanów wykazali, że obniżenie pH płynu kanalikowego poniżej 6.7 hamuje transport fosforanów, natomiast zmiany w pCO₂ przy stałym pH perfundowanego roztworu nie miały wpływu na szybkość transportu ³²Pi. Również acetozolamid, silny inhibitor anhidrazy węglanowej, dodany do płynu kanalikowego hamował transport ³²Pi. Te i inne obserwacje skłoniły Ullricha i wsp. do wyciągnięcia wniosku, że jedynym czynnikiem modyfikującym transcelularny transport fosforanów jest zewnętrzne i wewnątrzkomórkowe pH. Obniżenie pH płynu kanalikowego i podwyższenie wewnątrzkomórkowego (którego bezpośrednio nie mierzono) hamowałoby, natomiast odwrotne zmiany pH stymulowałoby ten transport. Interpretacja tych doświadczeń nie jest pozbawiona zastrzeżeń. Autorzy nie badają transportu netto fosforanów stosując ³²Pi w płynie kanalikowym a odzyskując ³²P w płynie włosniczki okalającej badany odcinek kanałika, stwarzają możliwość rozcieńczenia badanego izotopu fosforanem pochodzącym z wnętrza komórki, którego stężenie może się zmieniać w zależności od stosowanych warunków doświadczenia. Gdyby jednak zgodzić się z ich interpretacją wtedy należałoby przyjąć, że obserwowane zmiany *in vivo* w wydalaniu fosforanów w kwasicy i zasadowicy oddechowej są odbiciem zmian w transporcie fosforanów, ale poza odcinkiem nefronu przez nich badanym (40). Jak już wspominałem, odcinkiem nefronu kandydującym do roli regulatora jest część prosta kanałika proksymalnego. Nie wchłonięte fosforany w tej części kanałika ulegałyby kompensacyjnej resorpcji w dalszych odcinkach nefronu. Jest to oczywiście hipoteza dająca się jednak zweryfikować dostępnymi obecnie metodami.

VI-3. Zależność transportu fosforanów do pęcherzyków błon luminalnych od pH

Podwyższenie stężenia jonów wodorowych hamuje transport fosforanów do pęcherzyków (79). Pierwotnie interpretowano to jako wyraz związk-

szego powinowactwa nośnika fosforanowego do dwuujemnego anionu fosforanowego HPO_4^{2-} . Gdyby jednak założyć, że nośnik fosforanowy preferencyjnie akceptuje określoną formę anionu fosforanowego, to należałoby się spodziewać, że różnica pH po obu stronach błony pęcherzyka powinna modyfikować szybkość i szczytową akumulację fosforanów. Obniżenie wewnątrzpęcherzykowego pH powinno stymulować transport, jeśli nośnik preferuje HPO_4^{2-} , natomiast podwyższenie pH wnętrza pęcherzyków powinno zwiększać pobieranie fosforanów, jeśli nośnik preferuje H_2PO_4^- . Murr i wsp. (80) wykazali, że zmiany wewnątrzpęcherzykowego pH nie mają żadnego wpływu na transport fosforanów. Ich wyniki stoją jednak w sprzeczności z danymi Sacktor'a i wsp. (81), którzy stwierdzili stymulację transportu fosforanów do pęcherzyków kory nerek królików na koszt gradientu pH ($\text{pH}_w = 5.5$ i $\text{pH}_z = 7.5$). Jak widać, zastosowano duży gradient pH odbiegający bardzo znacznie od wartości fizjologicznych. Ponadto obserwowana szybkość transportu na koszt gradientu pH nie przekraczała 10—15% szybkości uzyskanej przy zastosowaniu gradientu sodowego. Dlatego też jest mało prawdopodobne aby nośnik preferował jedną z form anionu fosforanowego. Analiza krzywych transportu fosforanów w zależności od stężenia jonów sodu przy różnych stężeniach jonów wodorowych środowiska zewnątrzpęcherzykowego wskazuje, że wzrost pH zwiększa powinowactwo jonów sodu do systemu transportującego fosforan. Odwrotnie, spadek pH zmniejsza to powinowactwo; większe stężenie jonów sodu wymagane jest do zaaktywowania nośnika. Dane te dowodzą, że system transportujący fosforan nie rozróżnia obu występujących form anionu fosforanowego. Ponadto wiadomo, że więcej aniżeli jeden jon sodowy sprzęga się z transportem fosforanów. Możemy więc postulować, że transport fosforanów przez błonę luminalną jest tylko wtedy elektroobojętny jeśli HPO_4^{2-} , a nie H_2PO_4^- ulega przemieszczeniu.

VII. Fosfaturia wywołana maleinianem

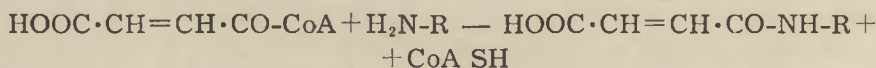
W poprzednim rozdziale przytoczyłem dane świadczące o dużej zgodności między nerkowym wydalaniem fosforanów modulowanych przez hormony a obserwowanymi zmianami w pobieraniu fosforanów przez izolowane pęcherzyki błon luminalnych kory nerek na koszt gradientu jonów sodu. Również wahania zawartości fosforanów w diecie znajdują swoje odbicie w transporcie luminalnym fosforanów. Podobne zbieżności zaobserwowano w przypadku kwasicy metabolicznej i transportu luminalnego fosforanów (83). Jednak nie zawsze stwierdzano zbieżność wyników badań *in vivo* i *in vitro*. Nie wykazano dodatniej zależności między hiperfosfaturycznym działaniem maleinianu (38, 40) a transportem fosforanów do pęcherzyków.

Maleinian podany szczurom w dawce przekraczającej 100 mg na kg ciężaru ciała powoduje zaburzenie funkcji nerek wyrażające się m.in. ke-

toacidurią, fosfaturią, aminoacidurią i glukozurią (85, 86). Dawka mniejsza maleinianu wywołuje ketoacidurię i fosfaturię podczas gdy wydalanie aminokwasów i glukozy z moczem nie odbiega od normy (87). Stwierdzono, że maleinian dodany do izolowanych pęcherzyków rąbka szczoteczkowego kory nerek nie wpływał na transport fosforanów do tych pęcherzyków. Natomiast pęcherzyki izolowane z nerek szczurów zatrutych maleinianem, bądź też otrzymane ze skrawków kory nerek preinkubowanych z maleinianem transportowały fosforan, na koszt gradientu jonów sodu, szybciej i szczytowa akumulacja była większa w porównaniu do pęcherzyków otrzymanych od zwierząt nie traktowanych maleinianem (88, 89). Ponadto wykazano, że jednoczesne podanie zwierzętom maleinianu i acetoctanu zapobiegało wystąpieniu fosfaturii (87). Nie stwierdzono też stymulacji transportu fosforanów do pęcherzyków, które otrzymano ze skrawków inkubowanych z maleinianem w obecności acetoctanu. Te i inne fakty (90, 91) wskazują, że czynnikiem toksycznym nie jest sam maleinian lecz bardzo reaktywny maleilo-CoA, produkt reakcji katalizowanej przez transferazę sukcyinylo-CoA, który może



reagować, nie tylko z grupami SH lecz także z grupami aminowymi aminokwasów i białek (92, 93).



Maleilacja białek rąbka szczoteczkowego może być jednym z głównych czynników prowadzących do zaburzeń transportu fosforanów na koszt gradientu jonów sodu. Ostatnio wykazano, że fluorodwunitrobenzen jest silnym inhibitorem transportu fosforanów przez błony rąbka szczoteczkowego kory nerek szczura (94). Nie można też wykluczyć możliwości pośredniego działania maleilo-CoA na drodze hamowania kinaz białkowych fosforylujących białka błon luminalnych, których fosforylację utożsamia się ze zmianami w luminalnym transporcie fosforanów. Niedawno zaobserwowano, że podanie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vivo* szczurom znacznie obniża fosfaturię wywołaną maleinianem (95). Ponieważ hormon ten nie zmienia stężenia ATP w nerce po podaniu maleinianu, można sugerować, że $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wpływa na przepuszczalność błony luminalnej dla fosforanów.

Przedstawiłem wpływ niektórych czynników endo i egzogennych modyfikujących nerkowe wydalanie fosforanów. W wielu sytuacjach stwierdzano dodatnią korelację między nerkowym wydalaniem fosforanów a ich transportem do izolowanych pęcherzyków błon rąbka szczoteczkowego kory nerek. Świadczy to o dużej przydatności tej metody pomiaru transportu fosforanów w badaniach nad rolą nerek w ogólnoustrojowej gospodarce fosforem.

Praca finansowana przez Polską Akademię Nauk, problem MR. 1.1.2.

Zaakceptowano do druku 8.03.1984

PIŚMIENICTWO

1. Body J. J., Cryer Ph. E., Offord K. P., Hath H., (1983), *J. Clin. Invest.*, **71**, 572—578.
2. Amiel C., (1980), Renal Handling of Phosphate, (Massry S. G., Fleisch H.,) wyd. Plenum Med. Book Company N.Y. London, str. 39—57.
3. Pastoriza-Munoz E., Mishler D. R., Lechene C., (1983), *Am. J. Physiol.*, **244**, F140—F149.
4. Haramati A., Haas J., Knox F. G., (1983), *Am. J. Physiol.*, **244**, F265—F269.
5. Murer H., Burckhardt G., (1983), *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **96**, 1—51.
6. Ullrich K. J., Proc. 8th Int. Congr. Nephrol., (1981) Athens 19—25.
7. Pfaller W., Rittinger M., (1980), *Int. J. Biochem.*, **12**, 17—22.
8. Keller T. C. S., Mooseker M. S., (1982), *J. Cell. Biol.*, **95**, 943—959.
9. Burgess D. R., (1982), *J. Cell. Biol.*, **95**, 853—863.
10. Jacobson H. R., (1982), *Kidney Int.*, **22**, 425—433.
11. Dennis V. W., Brazy P. C., (1982), *Kidn y Int.*, **22**, 498—506.
12. Hoffmann N., Thees M., Kinne R., (1976), *Pflugers Arch.*, **362**, 147—156.
13. Cheng L., Sacktor B., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1556—1564.
14. Kenny A. J., Booth A. G., (1978), *Essays Biochem.*, **14**, 1—44.
15. Angielski S., Zielkiewicz J., Dzierżko G., (1982), *Europ. J. Physiol.*, **395**, 159—161.
16. Haase W., Schafer A., Murer H., Kinne R., (1978), *Biochem. J.*, **172**, 57—62.
17. Lau K., Goldfarb S., Goldberg M., (1980), Renal Handling of Phosphate (Massry S. G., Fleisch H., wyd.) Plenum. Med. Book Company N.Y. London, 115—136.
18. Iino Y., Burg M. B., (1979), *Am. J. Physiol.*, **236**, F387—F391.
19. Mc Kinney T. D., Myers P., (1980), *Am. J. Physiol.*, **239**, F127—F134.
20. Mark K., Burg M., (1983), *Am. J. Physiol.*, **244**, F579—F589.
21. Hammerman M. R., Cohn D. E., Tamayo J., Martin K. J., (1983), *Arch. Biochem. Biophys.*, 91—97.
22. Evers C., Murer H., Kinne R., (1978), *Biochem. J.*, **172**, 49—56.
23. Hruska K., Hammerman M. R., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **645**, 351—356.
24. Aurbach G. D., Heath D. A., (1974), *Kidney Int.*, **6**, 331—336.
25. Ausiello D., Handler J., Orloff J., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **451**, 372—379.
26. Dousa T. P., Kempson S. A., (1982), *Mineral Electrolyte Metab.*, **7**, 113—121.
27. Hammerman M. R., Hruska K. A., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 992—999.
28. Biber J., Malmstrom K., Scalera V., Murer H., (1983), *Pflugers Arch.*, **398**, 221—226.
29. Anderson J., Forster J. B., (1959), *Clin. Sci.*, **18**, 437—442.
30. Laron Z., Crawford J. D., Klein R., (1957), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **96**, 649—661.
31. Turner S. T., Kiezbak G. M., Dousa T. P., (1982), *Am. J. Physiol.*, **243**, C227—C236.
32. Freiberg J. M., Kinsella J., Sacktor B., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4932—4936.
33. Dale B., (1982), *Am. J. Physiol.*, **242**, C131—C145.
34. Corvilain J., Abramow M., (1962), *J. Clin. Endocrinol.* **34**, 452—464.
35. Hammerman M. R., Karl J. E., Hruska K. A., (1980), *Biochim. Biophys.*

- Acta*, 603, 322—335.
36. Troehler U., Bonjour* J. P., Fleisch H., (1976), *J. Clin. Invest.*, 57, 264—273.
 37. Ullrich K. J., Rumrich G., Kloss S. (1977), *Pflugers Arch.* 372, 269—274.
 38. Angielski S., Szczepańska M., (1978), *Curr. Prob. Clin. Biochem.*, 8, 463—471.
 39. Angielski S., Pempkowiak L., Gmaj P., Hoppe A., Nowicka C., (1976), *Curr. Prob. Clin. Biochem.* 6, 142—152.
 40. Hoppe A., Metler M., Berndt T., Knox F. G., Angielski S., (1982), *Amer. J. Physiol.* 243, F471—F475.
 41. Barret P. Q., Gertner J. M., Rasmussen H., (1980), *Am. J. Physiol.* 239, F352—F359.
 42. Kempson S. A., Colon-Otero G., Lise Ou S-Y., Turner S. T., Dousa T. P. (1981) *J. Clin. Invest.*, 67, 1347—1360.
 43. Knox F. G., Hoppe A., Kempson S. A., Shah S. V., Dousa T. P., (1980), *Renal Handling of Phosphate* (Massry S. G., Fleisch H., wyd) Plenum Medical Book Company N. Y. London, 79—114.
 44. Angielski S., (1982), *Zarys Biochemii Klinicznej* (wyd. Angielski S., Rogulski J.) 109—147.
 45. Pawłowska D. (1983), *Praca doktorska*, Gdańsk. Akademia Medyczna.
 46. Stępiński J., Pawłowska D., Angielski S., (1984) *Acta Biochim. Polon.* 31, 229—240.
 47. Kreusser W. J., Descoeudres C., Oda Y., Massry S., Kurokawa K. (1980), *Mineral Electrolyte Metab.* 3, 312—323.
 48. Dousa T. P., Kempson S. A., (1982) *Mineral Electrolyte Metab.*, 7, 113—121.
 49. PetitClere C., Plante G. E., (1981), *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 59, 311—323.
 50. Ramasamy P., Butterworth P. J., (1973), *Biochem. J.* 131, 359—367.
 51. Ou S. Y. L., Kempson S. A., Dousa T. P., (1981), *Life Sci.* 29, 1195—1202.
 52. Hammerman M. R., Hansen V. A., Morrissey J., (1982), 257, 12380—12386.
 53. Lang R. P., Yanagawa N., Nord E. P., Sakhrani L., Lee S. H., Fine L. G. (1983), *Am. J. Physiol.* F263—F271.
 54. Yanagawa N., Lang, (1981), *Proc. Annu. Meeting Am. Soc. Nephrol.* 14, 15.
 55. Mikulski P., Dzierżko G., Le Hir M., Dubach U., Angielski S., dane nieopublikowane.
 56. Tennenhouse H. S., Chu Y. L., (1982), *Biochem. J.*, 204, 635—638.
 57. Gmaj P., Biber J., Angielski S., Stange G., Murer H., (1984) *Europ. J. Physiol.* 400, 60—65.
 58. Axelrod D. R., (1961), *J. Appl. Physiol.*, 16, 709—712.
 59. Mostellar M. E., Tuttle E. P., (1964), *J. Clin. Invest.* 43, 138—151.
 60. Barker E. W., Singer R. B., Elinkton J. R., Clark J. K., (1957), *J. Clin. Invest.* 36, 515—529.
 61. Webb R. K., Woodhall P. B., Tisher C. C., Glaubiger G., Neelon F. A., Robinson R. R., (1977), *J. Clin. Invest.* 60, 829—837.
 62. Angielski S., Drewnowska K., Rybczyńska A., Szczepańska M., (1982) *Acta Physiol. Polon.* 33, 463—474.
 63. Hoppe A., Metler M., Angielski S., (1978), *Diagn. Lab.* 15, 111—116.

64. Pitts R. F., Alexander R. S., (1944), *J. Clin. Invest.* 42, 648—662.
65. Guntupalli J., Eby B., Lau K., (1982), *Am. J. Physiol.* 242, F552—F560.
66. Beck N., Kim H. P., Kim K. S., (1975), *Am. J. Physiol.* 228, 1483—1488.
67. Harris C. A., Seely J. F., (1979), *Am. J. Physiol.*, 237, F715—F718.
68. Knox F. G., Preiss J., Kim J. K., Dousa T. P., (1977), *J. Clin. Invest.* 59, 675—683.
69. Bushinsky D. A., Favous M. J., Schneider A. B., Sen P. K., Sherwood L. M., Coe F. L., (1982), *Am. J. Physiol.*, 243, F570—F575.
70. Hoppe A., Destro M., Knox F. G., (1980), *Am. J. Physiol.* 239, E328—E332.
71. Mercado A., Slatopolsky E., Klahr S., (1975), *J. Clin. Invest.*, 56, 1386—1395.
72. Steele T. H. (1977). *Pflugers Arch.*, 370, 291—294.
73. Haas J. A., Berndt T. J., Haramati A., Knox F. G., (1984), *Am. J. Physiol.*
74. Kempson S. A., Berndt T., Turner S. T., Limmerman D., Knox F. G., Dousa T. P., (1983), *Am. J. Physiol.* 244, R216—R223.
75. Ullrich K. J., Rumrich G., Kloss S., (1978), *Pflugers Arch.* 377, 33—42.
76. Morel F., Imbert-Teboul M., Chabardes D., (1981), *Ann. Rev. Physiol.* 43, 569—581.
77. Stoll R., Kinne R., Murer H., Fleisch H., Bonjour J. P., (1979), *Pflugers Arch.* 380, 47—52.
78. Stoll R., Kinne R., Murer M., (1979), *Biochem. J.* 180, 465—470.
79. Berner W. R., Kinne R., Murer H., (1976), *Biochem. J.*, 160, 467—474.
80. Burckhardt G. Stern H., Murer H., (1981), *Pflugers Arch.*, 390, 191—197.
81. Sacktor B., Cheng L., (1981), *J. Biol. Chem.*, 256, 8080—8084.
82. Brown E. M., Aurbach G. D., (1980), *Vitamins and Hormones*, 38, 205—256.
83. Levine B. S., Ho K., Kraut J. A., Coburn J. W., Kurokawa K., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, 727, 7—12.
84. Kempson S. A., Kowalski J., C., Puschett J. B. (1983), *Biochem. Pharmacology*, 32, 1533—1537.
85. Angielski S., Rogulski J., (1975), *Biochemical Aspects of Renal Function* (wyd. Angielski S., Dubach U. C.) Huber Publisher, Bern, 86—99.
86. Angielski S., Niemirowicz R., Makarewicz W., Rogulski J., (1958), *Acta Biochim. Polon.* 5, 431—436.
87. Szczepańska M., Angielski S., (1980) *Am. J. Physiol.* 239, F50—F56.
88. Que N. T. H., Gmaj P., Angielski S. (1982), *Acta Biochim. Polon.*, 29, 275—287.
89. Que N. T. H., (1980), *Praca doktorska*, Akademia Medyczna, Gdańsk.
90. Pacanis A., Rogulski J., (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 13030—13034.
91. Pacanis A., Strzelecki T., Rogulski J. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 13035—13038.
92. Mohuczy-Dominiak D., Pacanis A., Rogulski J., Angielski S., (1983) *Acta Biochim. Polon.*, 30, 39—49.
93. Mohuczy-Dominiak D. (1984) *Praca Doktorska*, Akademia Medyczna, Gdańsk.
94. Kessler R. J., Vaughn D. A., Fanestill D. D., (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 14311—14317.

95. Angielski S., (1981) Organ-Directed Toxicity Chemical Indices and Mechanisms (wyd. Brown S., Davies D. S.) Pergamon Press Oxford, 109—114.

MARIUSZ MICHALIK *)

Zastosowanie izolowanych kanalików nerkowych w badaniach metabolicznych

Use of Isolated Kidney Tubules in Metabolic Studies

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Izolowanie i charakterystyka kanalików nerkowych
- III. Metabolizm izolowanych kanalików nerkowych
 - III-1. Metabolizm glukozy
 - III-2. Wytwarzanie amoniaku
 - III-3. Biosynteza triacylogliceroli
 - III-4. Degradacja białek i peptydów
 - III-5. Transport metabolitów i jonów przez błony komórkowe

Contents

- I. Introduction
- II. Isolation and characterization of kidney tubules
- III. Metabolic activities of isolated kidney tubules
 - III-1. Glucose metabolism
 - III-2. Ammonia formation
 - III-3. Triacylglycerol biosynthesis
 - III-4. Degradation of proteins and peptides
 - III-5. Membrane transport of metabolites and ions

I. Wstęp

Nerka ssaka jest organem wyspecjalizowanym, niejednorodnym zarówno pod względem strukturalnym, jak i funkcjonalnym (1—3). Podstawową jednostką morfologiczno-czynnościową nerki jest nefron, w którego skład wchodzi kolejno: ciało nerkowe złożone z kłębuszka naczyniowego, otoczonego torebką ciała nerkowego, kanalik bliższy (proksymalny) nefronu, pętla Henlego oraz kanalik dalszy (dystalny) uchodzący do kanalika zbiorczego. Ciało nerkowe oraz kanaliki: proksymalny i dystalny znaj-

*) Mgr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Al. Żwirki i Wigury 93, 02—089 Warszawa.

dują się w korze nerki, zaś pozostałe fragmenty nefronu występują w jej rdzeniu.

W populacji nefronów w nerce ssaka wyróżnia się: nefrony korowe, których ciała nerkowe leżą blisko powierzchni nerki, a pętle Henlego są długie, oraz głębiej położone nefrony przyrdzeniowe z krótkimi pętlami Henlego (1, 3, 4).

Poszczególne części nefronu różnią się pod względem przepuszczalności dla wody i jonów (1,5—7) oraz aktywności procesów metabolicznych (8—10). Jest to spowodowane różnym rozmieszczeniem kluczowych enzymów określonych szlaków metabolicznych (9—11, 12), różnicami w zawartości niektórych metabolitów (13) oraz odmiennymi mechanizmami ich transportu przez błony komórkowe (6, 14).

Ze względu na dużą strukturalną heterogenność nerki, zastosowanie w badaniach jej metabolizmu perfuzji (15—18) czy skrawków tkankowych (19—21) jest ograniczone. Dlatego też coraz częściej do badań używa się fragmenty nefronów izolowane z kory nerki — głównie kanaliki proksymalne i dystalne (22—25), zachowujące właściwe dla kory nerki procesy biosyntetyczne (26—30) oraz wrażliwość na działanie hormonów (31, 32). Dzięki zastosowaniu takich technik, jak rozdział elektroforetyczny (33), se-

Tabela 1.

Korzyści i utrudnienia wynikające z zastosowania jako materiału doświadczalnego w badaniach metabolizmu nerki perfundowanego narządu, skrawków tkankowych lub izolowanych kanalików nerkowych

Materiał badawczy	Korzyści	Utrudnienia	Piśmiennictwo
Perfundowana nerka	Zachowanie wielu funkcji metabolicznych organu. Możliwość stosowania fizjologicznych stężeń metabolitów.	Bariery przepuszczalności dla metabolitów. Ograniczone możliwości badania różnych parametrów w jednym doświadczeniu. Niejednorodność materiału.	15-18
Skrawki tkankowe	Możliwość badania wielu parametrów w jednym doświadczeniu.	Uwalnianie przez preparat niektórych enzymów i metabolitów. Konieczność stosowania bardzo cienkich skrawków.	19-21
Izolowane kanaliki nerkowe	Zachowanie funkcji metabolicznych i wrażliwości na działanie hormonów. Możliwość badania wielu zmiennych w jednym doświadczeniu.	Czasochłonne przygotowanie materiału doświadczalnego.	22-32, 41

dymencja w gradiencie fikolu (34), czy też mikrosekcja (35, 36) możliwe jest także badanie procesów metabolicznych w określonych fragmentach nefronu. Zasadnicze korzyści i utrudnienia wynikające z zastosowania w badaniach nerki różnego typu preparatów przedstawiono w Tabeli 1.

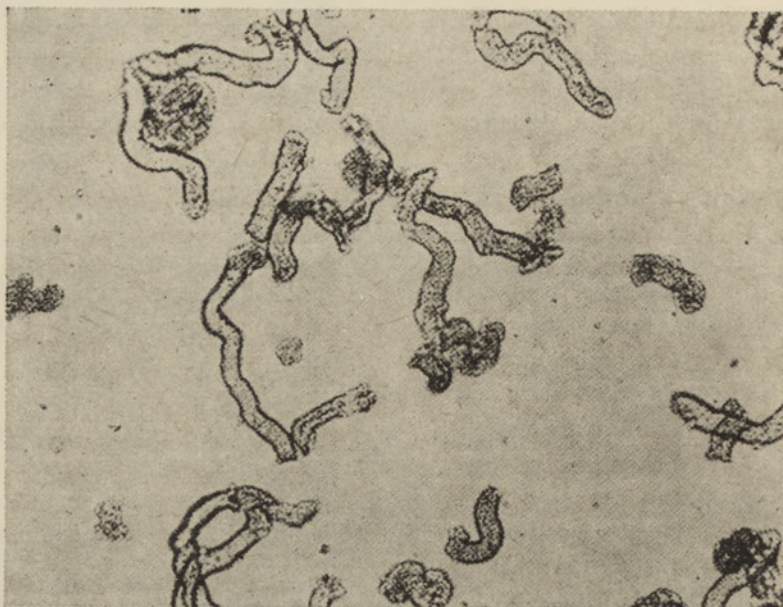
II. Izolowanie i charakterystyka kanalików nerkowych

Próbie otrzymania kanalików nerkowych podjęła po raz pierwszy w roku 1962 B o s a c k o v a (37), stosując delikatne trawienie trypsyną skrawków kory nerki. W efekcie uzyskała ona zawiesinę izolowanych komórek zdolnych do nagromadzania kwasu p-aminohipurowego oraz jonów potasu. Metoda ta została jednak zarzucona ze względu na niską wydajność i zanieczyszczenia preparatu składnikami subkomórkowymi (38). Z podobnych przyczyn szerszego zastosowania nie doczekała się także metoda polegająca na mechanicznym rozbijaniu tkanki zubożonej uprzednio w jony Ca^{2+} (39). Niewiele wiadomo o właściwościach takich preparatów poza ich zdolnością do pobierania tlenu ze stałą szybkością.

W tym samym roku B u r g i O r l o f f (22) po raz pierwszy opracowali metodę otrzymywania kanalików nerkowych z dużą wydajnością (około 500—700 mg z nerki królika). Autorzy ci po wyizolowaniu nerki ze zwierzęcia odpłukiwali z niej krew, wstrzykując tętnicą nerkową oziębioną sól fizjologiczną, a następnie roztwór kolagenazy do momentu przerwania torebki nerkowej i pojawienia się płynu na powierzchni nerki. Kolejny etap izolowania kanalików nerkowych polegał na oddzieleniu kory nerki od rdzenia oraz na mechanicznym rozdrobieniu tkanki. Otrzymaną zawiesinę inkubowano wówczas przez 45 minut w roztworze kolagenazy nasycanym mieszaniną 95% O_2 i 5% CO_2 . Reakcję enzymatyczną przerywano dodaniem w nadmiarze buforu używanego do inkubacji, a kanaliki nerkowe osadzano i przemywano kilkakrotnie świeżym buforem. Nieroztrawione fragmenty kory nerki usuwano filtrując preparat przez trzy warstwy gazy. Otrzymane tą metodą kanaliki przedstawiono na Ryc. 1.

Obecnie stosuje się liczne modyfikacje tej techniki, takie jak przeprowadzenie pierwszego etapu preparatyki *in situ*. Nerkę poddaje się perfuzji za pomocą oziębionego buforu Krebsa-Henseleita nie zawierającego jonów Ca^{2+} (26) lub dodatkowej kilkuminutowej perfuzji w układzie zamkniętym za pomocą roztworu kolagenazy w buforze Krebsa-Henseleita zawierającym jony Ca^{2+} (25), aktywator enzymu (40). Możliwe jest także stosowanie do preparatyki kanalików buforów o innym składzie (23, 24, 41) oraz, zamiast roztworu kolagenazy, mieszaniny kolagenazy i hialuronidazy (23) lub pronazy (42).

W celu usunięcia z preparatu znajdującej się w nim pewnej ilości pojedynczych martwych komórek stosowano wirowanie przez warstwę 25% roztworu fikolu (24). Uszkodzone komórki podlegały wówczas dalszej lizie przechodząc do osadu, podczas gdy osmotycznie aktywne żywe komórki



Ryc. 1. Zawiesina kanalików nerkowych królika izolowanych przy użyciu kolagenazy. Wg Burga M. B. i Orloff'a J. (22); dzięki uprzejmości autorów i American Physiological Society.

pozostawały w górnej warstwie roztworu. Co więcej, sedymentując kanaliki izolowane z kory nerki w nieciągłym gradiencie fikolu otrzymano zawiesinę zawierającą wyłącznie kanaliki dystalne lub proksymalne (34).

Stosowanie powyższych metod pozwoliło na uzyskanie preparatu składającego się głównie z krótkich fragmentów kanalików proksymalnych (około 90%) i dystalnych (około 7%) zanieczyszczonych jedynie pojedynczymi komórkami i kłębuszkami naczyniowymi (43, 44). Tak otrzymane kanaliki nerkowe nie zabarwiały się w izotonicznym roztworze błękitu trypanu — zachowywały one nienaruszone błony komórkowe (25). Na znikomy stopień uszkodzenia kanalików wskazywał także nie zmieniony w homogenacie kory nerki oraz w izolowanych kanalikach nerkowych stosunek aktywności dehydrogenazy mleczanowej do dehydrogenazy glutaminianowej (25), które są właściwymi dla cytosolu i mitochondriów enzymami znacznikowymi.

Metabolizm tlenowy nerki królika oraz izolowanych z tego narządu kanalików nerkowych porównano mierząc zawartość ATP, kinetykę zużycia tlenu oraz stopień zredukowania oksydazy cytochromowej w obu preparatach (24). W skrawkach tkankowych (0,3—0,5 mm grubości) znaleziono regiony wykazujące niedobór tlenu. Zjawisko to, spowodowane utrudnioną jego dyfuzją w głąb preparatu, nie występowało w przypadku izolowanych kanalików nerkowych. Za takim przypuszczeniem przemawiały następujące obserwacje:

— spadek szybkości zużycia tlenu przez skrawki tkankowe nerki wraz

z obniżeniem ciśnienia cząstkowego tlenu (pO_2) w naczynku inkubacyjnym, podczas gdy pobieranie tlenu przez kanaliki zachodziło ze stałą szybkością nawet przy spadku pO_2 ;

- mniejsza zawartość ATP w przeliczeniu na miligram białka w skrawkach niż w zawieszynie izolowanych kanalików nerkowych;
- wzrost stopnia zredukowania oksydazy cytochromowej w skrawkach tkankowych nerki przy spadku pO_2 , co wskazuje na niedostateczny dostęp tlenu (45, 46).

W izolowanych kanalikach nerkowych inkubowanych w takich samych warunkach stopień zredukowania oksydazy był około ośmiokrotnie mniejszy niż w skrawkach i nie uległ zmianie przy spadku pO_2 nawet poniżej 10 mm Hg (24).

W Tabeli 2 zestawiono zawartość niektórych metabolitów w nerce *in vivo*, w skrawkach tkankowych oraz w izolowanych kanalikach nerkowych (23). Jak widać, w poszczególnych preparatach zawartość pośredników cyklu Krebsa oraz procesu glikolizy jest różna, prawdopodobnie na skutek odmiennych warunków pomiaru metabolitów oraz innych szybkości dyfundowania przez błony komórek nerki pośredników ufosforylowanych i nieufosforylowanych. Natomiast zawartość nukleotydów adeninowych w preparatach jest podobna. Według Burga i Orloff'a (22) zawartość kationów w izolowanych kanalikach nerkowych oraz *in vivo* jest również tego samego rzędu.

Duży postęp w dziedzinie badań metabolizmu pojedynczych kanalików

Tabela 2.

Zawartość niektórych metabolitów w szybko zamrożonej nerce, skrawkach tkankowych oraz izolowanych kanalikach nerkowych szczura mierzona w obecności glukozy i jabłczanu. Wg Nagaty N. i Rasmussen'a H. (23); dzięki uprzejmości autorów i Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Metabolit	nmole/mg białka		
	Nerka	Skrawki kory	Izolowane kanaliki
ATP	7,55 ± 0,21	6,05 ± 0,30	7,95 ± 0,16
ADP	2,54 ± 0,07	4,91 ± 0,06	2,16 ± 0,05
AMP	0,43 ± 0,02	2,18 ± 0,09	0,34 ± 0,03
Fosfoenolopirogronian	0,19 ± 0,03	0,45 ± 0,06	1,10 ± 0,11
Pirogronian	0,27 ± 0,05	1,74 ± 0,13	2,40 ± 0,05
Glukoza 6-fosforan	0,79 ± 0,06	0,25 ± 0,04	a
Fruktoza 6-fosforan	0,17 ± 0,03	0,04 ± 0,02	a
Aldehyd 3-fosfoglicerynowy	0,42 ± 0,04	0,04 ± 0,01	a
Cytrynian	2,41 ± 0,07	10,2 ± 0,2	50,3 ± 1,5
Izocytrynian	0,21 ± 0,03	0,62 ± 0,06	2,43 ± 0,06
2-oksoglutaran	2,10 ± 0,11	3,21 ± 0,06	69,7 ± 2,1
Jabłczan ^b	1,18 ± 0,07	1,56 ± 0,12	10,2 ± 0,8

a) ilości śladowe

b) mierzono tylko w obecności glukozy

nerkowych nastąpił po wprowadzeniu techniki mikrosekcji. Najczęściej jako materiał wyjściowy stosowano liofilizowane skrawki tkankowe (47—51), rzadziej świeżą tkankę (52—54). Cięcie nefronu na fragmenty ułatwione zostało przez trawienie tkanki za pomocą kolagenazy w pierwszym etapie preparatyki (35, 36). Izolowane pod kontrolą stereomikroskopu duże fragmenty cięto następnie na mniejsze, ściśle określone odcinki. Ich wielkość wahała się od 0,2 do 1,5 mm, zależnie od struktury nefronu, z której dany odcinek izolowano. Powyższa metoda pozwoliła między innymi na pomiar aktywności cyklazy adenylowej w poszczególnych fragmentach nefronu (35, 36), lokalizację kluczowych enzymów określonych szlaków metabolicznych (9, 11), ATP-azy zależnej od K^+ i Na^+ (55, 56), czy kinaz białkowych (57).

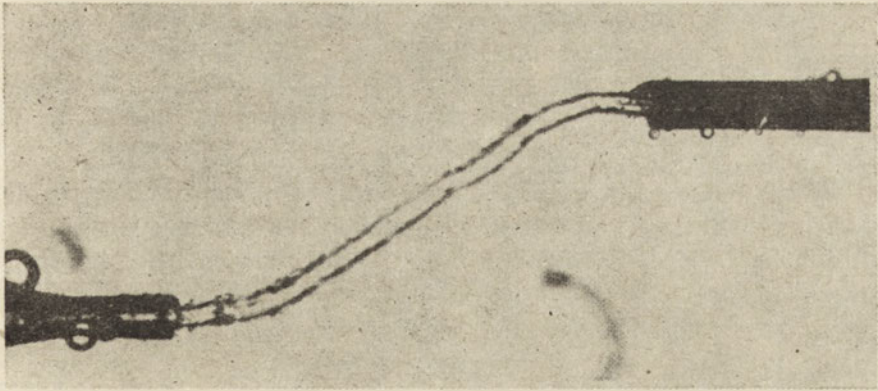
Duży postęp w dziedzinie badań nerki osiągnięto dzięki rozwojowi mikroanalizy chemicznej. Stosowanie mikropunkcji, polegającej na pobieraniu za pomocą cienkich mikropipet moczu kanalikowego z powierzchniowych odcinków nefronu (58—61), pozwoliło na określenie jego składu chemicznego. Techniki tej używano do umiejscowienia procesu transportu licznych substancji w różnych częściach nefronu. Szeroko wykorzystywano także mikroperfuzję *in situ*. Wybrane odcinki nefronu perfundowano płynem o określonym składzie, badając jego zmiany wywołane sekrecją lub wchłanianiem pewnych substancji. Perfundowany odcinek oddzielano od pozostałych części nefronu za pomocą kropli oleju mineralnego (60—62). Perfuzję można również prowadzić w sposób ciągły, przy użyciu specjalnej mikropompy (62, 65). Stosowano też perfuzję peritubularną, porównując skład płynu wprowadzonego do naczyń kapilarnych otaczających określony odcinek nefronu ze składem płynu pobieranego ze światła kanalika (66). Przy użyciu tego typu technik wykazano funkcjonalne zróżnicowanie poszczególnych części nefronu (5, 67—69).

Jednak badanie dowolnych, a nie tylko znajdujących się przy powierzchni nerki, odcinków nefronu stało się możliwe po wprowadzeniu przez Burga i wsp. (70, 71) technik mikroperfuzji *in vitro*. Określone fragmenty nefronu były ręcznie preparowane pod kontrolą stereomikroskopu, bez uprzedniego trawienia za pomocą kolagenazy. Kanaliki izolowane z kory nerki poddanej uprzednio działaniu tego enzymu pękały podczas perfuzji. Na Ryc. 2 przedstawiono perfuzję zbiorczego kanalika nerkowego przy użyciu dwóch szklanych mikropipet.

III. Metabolizm izolowanych kanalików nerkowych

III-1. Metabolizm glukozy

Jednym z najbardziej aktywnych procesów metabolicznych zachodzących w proksymalnej części kanalików nerkowych jest glukoneogeneza (9), stanowiąca źródło glukozy dla innych części nefronu (72), a prawdopo-



Ryc. 2. Perfuzja pojedynczego kanalika zbiorczego. Wg Burga M. i wsp. (70); dzięki uprzejmości autorów i American Physiological Society.

dobnie także dla innych tkanek organizmu (73). Ma ona szczególnie istotne znaczenie w warunkach, gdy zdolność wątroby do przeprowadzania tego procesu jest obniżona, np. w wyniku długotrwałego głodzenia (74), częściowego usunięcia wątroby (75, 76), lub podania związków chemicznych hamujących wybiórczo syntezę glukozy w wątrobie (77).

Ze względu na bardzo niską zawartość glikogenu (15, 21) oraz małą aktywność regulatorowych enzymów glikozy w korze nerki (12) proksymalne kanaliki nerkowe są materiałem użytecznym do badań procesu glukoneogenezy i jego kontroli metabolicznej.

Incubując zawiesinę kanalików nerkowych szczura w obecności różnych substratów wykazano, że glukoza jest w nich syntetyzowana z bursztynianu, fruktozy, fumaranu, glicerolu, jabłczanu, pirogronianu i niektórych aminokwasów (26). Szybkość syntezy zależy od gatunkowego pochodzenia tkanki i rodzaju substratu przy czym, jak widać z danych zamieszczonych w Tabeli 3, jest ona o 20—100% większa w izolowanych kanalikach nerkowych niż w skrawkach tkankowych (23).

Tabela 3.

Szybkość glukoneogenezy z różnych substratów w skrawkach kory nerki oraz w izolowanych kanalikach nerkowych szczura. Wg Nagaty N. i Rasmussena H. (23); dzięki uprzejmości autorów i Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Substrat	nmole/mg białka w ciągu godziny	
	Skrawki	Kanaliki
Pirogronian	151 ± 19	296 ± 10
Mleczan	173 ± 24	272 ± 11
Bursztynian	—	220 ± 8
2-oksoglutaran	141 ± 30	179 ± 9
Szczawiooctan	99 ± 15	198 ± 7
Jabłczan	—	181 ± 9
Dihydroksyaceton	360 ± 60	594 ± 26
Glicerol	—	151 ± 6

Izolowane kanaliki nerkowe zostały również wykorzystane w badaniach lokalizacji kluczowych enzymów glukoneogenezy (11) oraz wpływu na intensywność tego procesu takich czynników jak: jony nieorganiczne (23, 78—80), niektóre hormony (26, 44, 81—84) czy kwasy tłuszczowe (25, 85, 86).

Stosując metodę mikrosekcji kanalików nerkowych zbadano rozmieszczenie dwóch kluczowych enzymów metabolizmu glukozy wzdłuż nefronu królika (11). Badano rozmieszczenie heksokinazy, niezbędnej dla procesów syntezy glikogenu, cyklu fosfoglukonianowego i glikolizy oraz rozmieszczenie karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej, regulatorowego enzymu glukoneogenezy. Aktywność enzymów w określonych fragmentach nefronu przewyższała aktywność tych enzymów w homogenacie. Mimo obniżenia aktywności heksokinazy, będącego prawdopodobnie wynikiem proteolitycznego działania kolagenazy stwierdzono najniższą aktywność tego enzymu w części krętej kanalika proksymalnego. Rosła ona wzdłuż nefronu, osiągając maksimum w kanaliku zbiorczym. Natomiast aktywność karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej stwierdzono prawie wyłącznie w kanaliku proksymalnym. W Tabeli 4 przedstawiono umiejscowienie kluczowych enzymów metabolizmu glukozy wzdłuż nefronu. Jako materiał wyjściowy do mikrosekcji użyto liofilizowane skrawki tkankowe nerki szczura (47—49, 51, 87—89). Powyższe dane wskazują, że synteza i degradacja glukozy w nerce przebiega w różnych częściach nefronu.

Tabela 4.

Rozmieszczenie kluczowych enzymów metabolizmu glukozy wzdłuż nefronu szczura

Enzym	Aktywność enzymu w poszczególnych odcinkach nefronu							Literatura
	Ciało nerkowe	Odcinek kanalika proksymalnego		Odcinek wstępujący pętli Henlego	Odcinek kanalika dystalnego		Kanalik zbiorczy	
		kręty	prosty		prosty	kręty		
Karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa	0	+++	++	0	+	0	0	49, 87, 88
Fruktozo 1,6-bisfosfataza	0	+++	++	—	0	0	—	49
Glukoza 6-fosfataza	+	+++	+	—	0	0	—	49
Heksokinaza	+	+	+	+++	—	+++	—	48, 87
Fosfofruktokinaza	+	+	+	++	—	+++	+++	51, 87
Kinaza pirogronianowa	+	+	+	++	—	++	+++	51, 87
Dehydrogenaza 3-fosfoglicerynianowa	+	+++	++	++	—	+	—	87
Dehydrogenaza mleczanowa	+	++	+	+++	+++	+++	—	87, 89

Oznaczenia: + niska aktywność enzymu, ++ pośrednia aktywność enzymu, +++ wysoka aktywność enzymu, 0 brak aktywności enzymu, — brak danych.

Synteza glukozy, której poziom we krwi jest stały, w zdrowym organizmie musi podlegać ścisłej kontroli metabolicznej. Wiadomo, że hormony takie jak wazopresyna (84, 90), kalcytonina (83, 91), parathormon (81, 82, 92), czy adrenergiczny związek agonistyczny — izoproterenol (81, 83) wywierają swe metaboliczne działanie na nerkę za pośrednictwem cyklicznego adenylozomonofosforanu. Dane doświadczalne pochodzą z badań *in vitro*, w których oznaczono zawartość cyklicznego AMP w skrawkach tkankowych lub w zawiesinie kanalików, albo z pomiarów aktywności cyklazy adenylowej w homogenacie lub we frakcji oczyszczonych błon komórkowych. Jednak ze względu na zróżnicowanie funkcjonalne nefronu (1, 3) stosowanie takich preparatów nie pozwala na dokładne określenie, które komórki są wrażliwe na działanie hormonów. Przy użyciu izolowanych kanalików nerkowych szczura wykazano, że cykliczny AMP stymuluje proces glukoneogenezy w obecności takich substratów, których przemiany prowadzą do szczawiooctanu (26, 93). Dotyczy to zatem glutamianu, proliny, 2-oksoglutaranu, bursztynianu, jablczanu, pirogronianu, mleczanu i fumaranu. Nie stwierdzono natomiast stymulacji syntezy glukozy z fruktozy, dihydroksyacetonu lub glicerolu, co wskazywało na karboksykinazę jako na enzym wrażliwy na działanie cyklicznego nukleotydu.

W licznych badaniach *in vitro* stwierdzono, że cykliczny AMP odgrywa rolę pośrednika w stymulacji syntezy glukozy przez parathormon (31, 32, 92). Wyniki otrzymane przez Rasmussena i Nagatę (31) wskazują, że w izolowanych kanalikach nerkowych parathormon oddziałuje na proces glukoneogenezy zwiększając pobieranie przez komórki nefronów jonów wapnia, które aktywują karboksykinazę fosfoenolpirogronianową i jednocześnie hamują kinazę pirogronianową, enzym katalizujący reakcję przebiegającą w kierunku przeciwnym.

Hormony takie jak: wazopresyna, kalcytonina, glukagon, czy też izoproterenol o działaniu β -agonistycznym, zwiększające poziom cyklicznego AMP w izolowanych kanalikach nerkowych szczura (32, 83, 84, 91, 94) nie stymulowały glukoneogenezy *in vitro* (44, 95). Zjawisko to można wytłumaczyć różnym rozmieszczeniem komórek syntetyzujących glukozę oraz wrażliwych na działanie określonych hormonów wzdłuż nefronu (32). Dzięki zastosowaniu techniki mikrosekcji zbadano aktywność cyklazy adenylowej w 11 ściśle określonych odcinkach nefronu i potwierdzono, że cyklaza adenylowa wrażliwa na działanie parathormonu występuje wyłącznie w proksymalnej części kanalików nerkowych, gdzie przebiega synteza glukozy. Natomiast wazopresyna, kalcytonina i izoproterenol aktywują cyklazę adenylową w innych częściach nefronu (35, 36).

Katecholaminy stymulują syntezę glukozy za pośrednictwem mechanizmu α -adrenergicznego (96). W stężeniach powodujących stymulację glukoneogenezy katecholaminy obniżały indukowaną parathormonem syntezę cyklicznego AMP w izolowanych kanalikach nerkowych (97). Również an-

giotensyna zwiększa szybkość syntezy glukozy z wielu substratów *in vitro* (44, 98). Mechanizm jej działania jest prawdopodobnie niezależny od cyklicznego AMP oraz zmian stężenia jonów wapnia. W procesie tym wydają się natomiast pośredniczyć zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu jonów potasu (98).

Innym czynnikiem kontrolującym szybkość glukoneogenyzy w nerce jest poziom kwasów tłuszczowych (25, 85). Stymulują one syntezę glukozy w izolowanych kanalikach nerkowych (27, 82, 86), prawdopodobnie w wyniku wzrostu stężenia acetylo-CoA, aktywującego karboksylazę pirogronianową przy jednoczesnym hamowaniu dehydrogenazy pirogronianowej. Stwierdzono to w przypadku kanalików nerek szczura i psa, natomiast w izolowanych kanalikach nerkowych królika długołańcuchowe kwasy tłuszczowe hamowały syntezę glukozy w około 30—50% zależnie od rodzaju substratu i użytego kwasu, zwiększając jednocześnie syntezę ciał ketonowych i zużycie tlenu (25). Dokonano pomiaru zawartości pośredników glukoneogenyzy w kanalikach nerkowych królika oddzielonych od mieszaniny inkubacyjnej na drodze wirowania przez olej silikonowy. W komórkach kanalików stwierdzono znaczny spadek zawartości fosfoenolopirogronianu oraz wzrost stosunku 3-hydroksymaślan/acetylooctan, świadczący o wysokim poziomie zredukowania nukleotydów nikotynamidoadeninowych w mitochondriach. Mniejsza szybkość syntezy glukozy w obecności kwasów tłuszczowych mogła więc wynikać z zahamowania mitochondrialnej karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej, prawdopodobnie na skutek spadku zawartości szczawiooctanu w tych warunkach. Obserwacje te wskazują na różnice mechanizmów kontrolujących szybkość procesu glukoneogenyzy w nerce ssaków różnych gatunków.

Wywołanie u ssaków kwasicy metabolicznej, schorzenia przejawiającego się wzrostem stężenia jonów wodorowych we krwi, powoduje wzrost szybkości syntezy glukozy z różnych substratów w skrawkach kory nerki (99—101). Z porównania zawartości pośredników glukoneogenyzy w nerce zwierząt z kwasicą metaboliczną oraz zwierząt zdrowych wynika, że enzymem odpowiedzialnym za to zjawisko jest karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa (102, 103). Jej aktywność znacznie wzrastała w korze nerek zwierząt chorych (49, 104, 105). Stymulację glukoneogenyzy z mleczanu, pirogronianu i glutaminianu przez obniżenie pH buforu perfuzyjnego stwierdzono również w nerce perfundowanej *in vitro* (16). Wpływ jonów wodorowych na metabolizm glukozy badano także przy użyciu izolowanych kanalików nerkowych (23, 78, 79, 106). Obserwowano indukowaną przez jony H^+ stymulację glukoneogenyzy z glutaminy, cytrynianu, bursztynianu i 2-oksoglutaranu, lecz nie z jabłczanu, szczawiooctanu czy mleczanu. Natomiast wzrost pH (z pH 7,4 do 7,8) powodował inhibicję tego procesu ze wszystkich badanych substratów (78, 106). W przeciwieństwie do badań prowadzonych przy użyciu skrawków tkankowych pochodzących z nerek zwierząt z kwasicą metaboliczną, zwiększenie stężenia jonów H^+

w buforze inkubacyjnym (obniżenie pH z 7,4 do około 7,0) nie prowadziło do wzrostu aktywności karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej w kanalikach nerkowych (23, 106). Stymulacja glukoneogenezy była najprawdopodobniej spowodowana wzrostem aktywności mitochondrialnych enzymów: dehydrogenazy 2-oksogluutaranowej (106) lub dehydrogenaz bursztynianowej i izocytrynianowej (78, 79).

III-2. Wytwarzanie amoniaku

Badania nad amoniogenezą prowadzono głównie przy użyciu perfundowanych nerek (107), skrawków tkankowych (108—110) oraz mitochondriów izolowanych z kory nerki (111—113). Stwierdzono, że w nerce ssaków powstawanie amoniaku z glutaminy jest wynikiem działania dwóch szlaków (111, 114, 115). Przede wszystkim aminokwas ten może ulegać degradacji przy udziale glutaminazy I (aminohydrolaza L-glutaminy), występującej głównie w kanalikach proksymalnych (9). Powstaje wówczas amoniak i kwas glutaminowy, który z kolei może podlegać oksydacyjnej deaminacji w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową. Drugą drogę wytwarzania amoniaku zapoczątkowuje reakcja deaminacji glutaminy, przebiegająca przy udziale aminotransferazy L-glutamina: 2-oksokwas, potocznie zwanej glutaminazą II. Wyższą aktywność enzymów pierwszego z powyższych szlaków w procesie amoniogenezy stwierdzono w nerce psa i szczura (114, 116, 117). W nerce świnki morskiej (118, 119) i królika (118), gdzie wykazano bardzo niską aktywność glutaminazy I, głównym donorem amoniaku wydaje się być kwas glutaminowy.

Przy użyciu izolowanych kanalików nerkowych stwierdzono, że w nerce psa amoniak jest wytwarzany zarówno z aminowego, jak i z amidowego azotu glutaminy (117). Proces deamidacji tego aminokwasu przebiega głównie przy udziale glutaminazy I i jest hamowany w obecności egzogenego i endogenego kwasu glutaminowego, powstającego jako produkt tej reakcji.

Spostrzeżenie to potwierdza proponowany wcześniej przez Goldstein a i wsp. (120, 121) mechanizm regulacji procesu amoniogenezy poprzez zmiany stężenia kwasu glutaminowego w korze nerki. Usunięcie produktu deaminacji kwasu glutaminowego — 2-oksogluutaranu, przez wykorzystanie tego związku jako substratu w procesie syntezy glukozy, powodowało wzrost szybkości amoniogenezy (99, 122). W izolowanych kanalikach nerkowych psa stosując inhibitory glukoneogenezy nie wykazano jednak współzależności tych procesów (117). Jednocześnie zaproponowano, że czynnikiem kontrolującym syntezę amoniaku w nerce jest stosunek nukleotydów nikotynamidoadeninowych utlenionych do zredukowanych, zaś inhibicja glutaminazy I przez 2-oksogluutaran jest spowodowana obniżeniem stosunku NAD^+/NADH w wyniku utlenienia tego związku.

Nerki odgrywają dużą rolę w utrzymaniu stałego pH płynów ustrojowych. Odpowiedzią organizmu na kwasicę metaboliczną jest wzrost syntezy amoniaku (109, 123) oraz jego zwiększone wydzielanie do moczu (105, 123—126). Pozwala to na usunięcie nadmiaru kwasu z organizmu przy jednoczesnym zachowaniu stałego poziomu jonów sodu i potasu (125). Jednak nie udało się wykazać natychmiastowego wpływu jonów H^+ na syntezę amoniaku *in vitro* w skrawkach kory nerki zdrowych zwierząt (49, 126—130). Porównano wpływ jonów wodorowych na metabolizm skrawków kory nerki oraz izolowanych kanalików nerkowych (106). Synteza amoniaku z glutaminy w kanalikach nerkowych szczura wzrastała prawie dwukrotnie, podczas gdy w skrawkach tkankowych nie ulegała zmianie. Różnice te wynikały prawdopodobnie z istnienia barier przepuszczalności dla tego aminokwasu. Glutamina łatwiej przenikała do komórek kanalików nerkowych ze względu na ich większą powierzchnię kontaktu z buforem inkubacyjnym. Natomiast nie stwierdzono wpływu pH na syntezę amoniaku w kanalikach izolowanych z nerki psa (106).

III-3. Biosynteza triacylogliceroli

Głównym źródłem energii w korze nerki jest proces utleniania kwasów tłuszczowych (131). Stwierdzono mniejsze zużycie tlenu od wymaganego do całkowitej β -oksydacji pobranych kwasów tłuszczowych *in vivo* (132), co przy nikłej szybkości ketogenezy z długołańcuchowych kwasów tłuszczowych wskazuje na konieczność działania także innego procesu wykorzystującego te związki (133). Badania prowadzone przy użyciu izolowanych kanalików nerkowych szczura (29, 134) wykazały, że w nerce endogenne kwasy tłuszczowe mogą być wykorzystywane do syntezy triacylogliceroli. Szybkość tego procesu była proporcjonalna do stężenia substratów i zwiększała się w obecności niektórych pośredników glukoneogenezy, prawdopodobnie w wyniku wzrostu poziomu glicerolu. Zgodna z tym przypuszczeniem jest obserwacja, że podany ^{14}C -mleczan można było wykryć w lipidach nerki, ale nie było go w cząsteczkach kwasów tłuszczowych. Ze względu na występowanie karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej, enzymu niezbędnego do syntezy glicerofosforanu z prekursorów glukozy, w proksymalnych kanalikach nerkowych (49, 88) przypuszcza się, że synteza glicerolu zachodzi w tych samych odcinkach kanalików (29, 134). Stwierdzona w tej części nefronu bardzo niska aktywność kluczowych enzymów glikolizy (135) wyjaśnia brak stymulacji syntezy triacylogliceroli przez glukozę (29).

III-4. Degradacja białek i peptydów

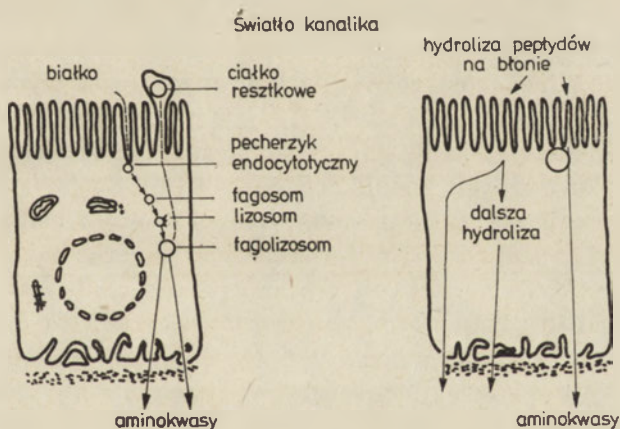
Nerki odgrywają ważną rolę w katabolizmie wielu białek, polipeptydów i niewielkich peptydów (136, 137), takich jak albumina osocza (138),

hormon wzrostowy (139), insulina (140, 141), glukagon (141), parathormon (142, 143), lizozym (144, 145), cytochrom c (146), czy angiotensyna I, bradykinina i oksytocyna (136). Absorpcja, transport i degradacja tych związków przebiegają wyłącznie w proksymalnych kanalikach nerkowych. Białka i duże polipeptydy, filtrowane w kłębuszkach naczyniowych, są absorbowane z płynu kanalików proksymalnych na drodze endocytozy i katabolizowane przy udziale lizosomów (136, 137). Produkty degradacji, głównie aminokwasy, dyfundują na zewnątrz komórek do krwi.

Procesy kataboliczne w nerce badano *in vivo* i *in vitro* po podaniu białek znakowanych radioaktywnym jodem, mierząc szybkość ich degradacji w nienaruszonej nerce (147, 148), izolowanej nerce poddanej perfuzji (139, 142, 143), przy użyciu skrawków tkankowych (146) lub izolowanych lizosomów (149). Natomiast w eksperymentach prowadzonych przez Carone i wsp. (136), wykorzystano technikę mikroinfuzji *in vivo* (62) oraz wprowadzoną przez Burga i wsp. (70) mikroperfuzję izolowanych fragmentów nefronu. Wykazano działanie mechanizmu odmiennego od przedstawionego powyżej w przypadku degradacji białek i dużych peptydów, na drodze którego w proksymalnych kanalikach nerkowych są katabolizowane niewielkie peptydy zawierające od 8 do 10 aminokwasów.

Oba mechanizmy przedstawiono schematycznie na Ryc. 3.

Niewielkie peptydy są prawdopodobnie degradowane na powierzchni



Ryc. 3. Porównanie występujących w kanalikach proksymalnych mechanizmów reabsorpcji i katabolizmu białek i dużych polipeptydów (schemat lewy) oraz małych liniowych peptydów (schemat prawy).

Białko jest wchłaniane przez komórkę z wytworzeniem pęcherzyka endocytotycznego, a następnie fagosomu, który łączy się z lizosomami właściwymi. W powstałym fagolizosomie następuje enzymatyczna hydroliza, a uwolnione aminokwasy, dyfundując do przestrzeni interstycjalnej, powracają do krążenia nerkowego. Natomiast niewielkie peptydy są hydrolizowane przez enzymy związane z rąbkem szczoteczkowym kanalików proksymalnych, a uwolnione aminokwasy aktywnie transportowane przez błonę do komórek nabłonkowych. Częściowo zhydrolizowane fragmenty peptydów mogą być reabsorbowane w niezmięnionej postaci i podlegać dalszej wewnątrzkomórkowej hydrolizie. Wg Carone F. A. i wsp. (136); dzięki uprzejmości autorów i International Society of Nephrology.

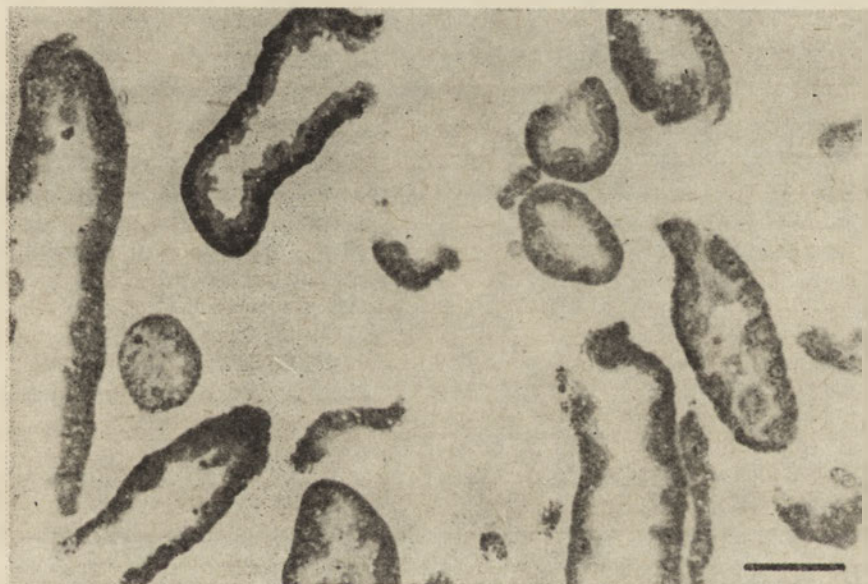
rażka szczoteczkowego kanalików proksymalnych, zawierającego wiele enzymów hydrolitycznych. Uwolnione aminokwasy są następnie aktywnie reabsorbowane przez komórki kanalików proksymalnych. Carone i wsp. (136) sugerują, że proces ten ma duże znaczenie biologiczne. Pozwala na zachowanie w organizmie aminokwasów oraz na inaktywację toksycznych peptydów. Wspomaga także regulację poziomu niewielkich hormonów peptydowych w osoczu. Bezpośrednie badania degradacji tych związków, niezależne od wewnątrzkomórkowych przemian metabolicznych, stały się możliwe dzięki rozwojowi technik izolowania pęcherzyków błonowych z tkanek nabłonkowych oraz metod badania aktywnego transportu (150—152). Badając przenikanie dipeptydów oraz aminokwasów do wnętrza pęcherzyków błonowych (153—155) zaproponowano mechanizm transportu peptydów przez błonę rąbka szczoteczkowego (153). Prawdopodobnie po zewnętrznej stronie tej błony znajduje się miejsce wiążące peptyd, odpowiedzialne za jego transport do wnętrza komórki. Przed uwolnieniem peptydu do cytoplazmy wchodzi on w kontakt z peptydazą umiejscowioną po wewnętrznej stronie błony rąbka szczoteczkowego. Zależnie od podatności peptydu na hydrolizę w komórce mogą się pojawić wolne aminokwasy, peptyd w niezmienionej formie, lub mieszanina tych związków.

III-5. Transport metabolitów i jonów przez błonę komórkową

Transport substancji organicznych w nerce jest niezbędny dla zatrzymania w organizmie substratów metabolicznych oraz wydalania końcowych produktów przemiany materii (156). Odzyskiwanie z przesączu kłębuszkowego większości istotnych metabolicznie składników odbywa się głównie w proksymalnych kanalikach nerkowych. Zachodzi w nich częściowa reabsorpcja chlorku sodu, wody, aminokwasów i białka oraz całkowita reabsorpcja glukozy (3, 59). Jednocześnie komórki nabłonkowe proksymalnych kanalików nerkowych wykazują zdolność pobierania składników odżywczych z płynu zewnątrzkomórkowego. Ma to duże znaczenie szczególnie w przypadku nabłonka dalszych części kanalików proksymalnych, gdzie stężenie aminokwasów w przesączu kłębuszkowym jest już niewielkie. Dla tych komórek transport aminokwasów przez ich błonę podstawną stanowi prawdopodobnie jedyną drogę uzyskiwania tych związków (157). Funkcje błony luminalnej (rąbka szczoteczkowego) i antyluminalnej (błony części podstawnej komórki kanalika nerkowego) są więc odmienne. Błony te różnią się także powierzchniowym ładunkiem elektrycznym oraz występowaniem niektórych enzymów (158).

Badania transportu metabolitów i jonów w nerce prowadzono początkowo głównie przy użyciu prostych technik takich jak perfuzja (18, 159—162). Wczesne badania przy użyciu izolowanych kanalików nerkowych wykazały, że preparat taki posiada zdolność nagromadzania kwasu p-ami-

nohipurowego oraz zachowuje gradient sodu i potasu (22, 163, 164). Porównując pobieranie glicyny przez preparaty otrzymane z dwóch nerek tego samego zwierzęcia wykazano, że zachodziło ono szybciej i prędkiej osiągało stan równowagi w zawiesinie kanalików nerkowych niż w przypadku skrawków tkankowych (165). Było to spowodowane większą powierzchnią kontaktu ze środowiskiem, w którym zawieszono kanaliki. Jednak dopiero zastosowanie wirowania przez warstwę fikolu pozwoliło na otrzymanie preparatu charakteryzującego się otwartymi światłami kanalików (widocznymi na Ryc. 4), zapewniając tym samym kontakt komórek z buforem inkubacyjnym za pośrednictwem błon luminalnych (24). Izolowane kanaliki nerkowe okazały się więc bardziej użyteczne niż skrawki tkankowe w badaniach transportu aminokwasów (165—169), cukrów (168, 170), mocznika (171), cyklicznego adenozymonofosforanu (172, 173) i jonów (24) oraz regulacji tych procesów.



Ryc. 4. Przekroje kanalików nerkowych królika izolowanych przy użyciu kolagenazy i wirowanych przez warstwę fikolu.

Cechą charakterystyczną preparatu składającego się głównie z kanalików proksymalnych są otwarte światła kanalików. Kreska w prawym dolnym rogu odpowiada 50 μm . Wg Bala-bana R. S. i wsp. (24); dzięki uprzejmości autorów i American Physiological Society.

W ostatnich latach materiałem do badań transportu metabolitów i jonów stały się pęcherzyki błonowe izolowane z komórek nabłonkowych. Otrzymywano je na drodze hipotonicznej lizy kanalików nerkowych i różnicowego wirowania preparatu (150, 174—177). W innej metodzie, polegającej na homogenizacji kory nerki zastosowano wirowanie różnicowe, w gradiencie gęstości oraz precypitację jonami Ca^{2+} (155, 178—184). Dzięki zastosowaniu specjalnych technik rozdziału frakcji błon komórkowych

otrzymano preparaty składające się bądź z błon rąbka szczoteczkowego (151, 152, 155, 175—177, 183—189), bądź z błon podstawnych i bocznych części komórek (187, 189—191). Pozwoliło to na wykazanie różnic we właściwościach tych błon. Korzyści wynikające ze stosowania pęcherzyków błonowych spowodowały coraz szersze wykorzystanie tego rodzaju preparatów w badaniach transportu różnych substancji w nerce.

Badania transportu jonów i metabolitów *in vitro* w dużej mierze przyczyniły się do poznania właściwych dla nerki procesów wydalania produktów przemiany materii i utrzymania odpowiedniego składu chemicznego krwi oraz płynów ustrojowych.

Składam serdeczne podziękowania Pani Prof. Jadwidze Bryle za krytyczne uwagi i pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy.

Część wyników zawartych w artykule pochodzi z badań Zakładu Regulacji Metabolizmu Instytutu Biochemii UW wykonanych w ramach problemu MR-II.1.1.7.

Zaakceptowano do druku 25.02.1984

PIŚMIENNICTWO

1. Vander A. J., (1975) w *Renal Physiology*, red. Jeffers J. D., First C., str. 1—34; McGraw-Hill, Inc.
2. Kaissling B., Kriz W., (1979) w *Structural Analysis of the Rabbit Kidney*, red. zbiorowa, str. 1—28; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
3. Jasiński A., Kilariski W., (1981) w *Atlas ultrastruktury komórek kręgowców*, red. Pachelska-Kaszczuk B., str. 207—233; Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
4. Lote Ch. J., (1982) w *Principles of Renal Physiology*; str. 30—39; Biddles Ltd., London.
5. Giebisch G., (1980), *Int. J. Biochem.*, **12**, 3—8.
6. Grantham J. J., Irish III J. M., Hall D. A., (1978), *Ann. Rev. Physiol.*, **40**, 249—277.
7. Lote Ch. J., (1982) w *Principles of Renal Physiology*, str. 51—78; Biddles Ltd., London.
8. Kean E. L., Adams P. H., Winters R. W., Davies R. E., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **54**, 474—478.
9. Maleque A., Endou H., Koseki C., Sakai I., (1980), *FEBS Lett.*, **116**, 154—156.
10. Cojocel C., Maita K., Pasino D. A., Kuo C.-H., Hook J. B., (1983), *Life Sci.*, **33**, 855—861.
11. Vandewalle A., Wirthensohn G., Heidrich H., Guder W. G., (1981), *Am. J. Physiol.*, **240**, F492—F500.
12. Schmidt U., Guder W. G. (1976), *Kidney Int.*, **9**, 233—242.
13. Needleman P., Passoneau J. V., Lowry O. H., (1968). *An. J. Physiol.*, **215**, 655—659.
14. Welling L. W., Welling D. J., (1980), *Curr. Top. Membr. Transp.*, **13**, 161—167.
15. Nishiitsutsuji-Uwo J. M., Ross B. D., Krebs H. A., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 852—862.

16. Bowman R. H., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1604—1612.
17. Bowman R. H., (1975), *Met. Enzymol.*, **39**, Part D, 3—11.
18. Simchon S., Chien S., (1982), *Am. J. Physiol.*, **242**, F86—F94.
19. Elliott K. A. C., (1955), *Met. Enzymol.*, **1**, 3—9.
20. Krebs H. A., Bennet A. H., DeGasquet P., Gascoyne T., Yoshida T., (1963), *Biochem. J.*, **86**, 22—27.
21. Klahr S., Nawar T., Schoolwerth A. C., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 161—168.
22. Burg M. B., Orloff J., (1962). *Am. J. Physiol.*, **203**, 327—330.
23. Nagata N., Rasmussen H., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **215**, 1—16.
24. Balaban R. S., Soltoff S. P., Storey J. M., Mandel L. M., (1980), *Am. J. Physiol.*, **238**, F50—F59.
25. Zabłocki K., Gemel J., Bryła J., (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **757**, 111—118.
26. Guder W. G., Wiesner W., Stukowski B., Wieland O., (1971), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1319—1328.
27. Guder W. G., Writhensohn G., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **99**, 577—584.
28. Vinay P., Lemieux G., Gougoux A., (1979), *Can. J. Biochem.*, **57**, 346—356.
29. Writhensohn G., Guder W. G., (1980), *Biochem. J.*, **186**, 317—324.
30. Watford M., Hod Y., Chiao I-B., Utter M. F., Hanson R. W., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10023—10027.
31. Rasmussen H., Nagata N., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **215**, 17—28.
32. Guder W. G., (1976) w *Renal Metabolism in Relation to Renal Function*, red. Schmidt U., Dubach U. C., str. 202—213; Hans Huber Publishers, Bern.
33. Heidrich H. G., Dew M. F., (1976) w *Renal Metabolism in Relation to Renal Function*, red. Schmidt U., Dubach U. C., str. 108—111; Hans Huber Publishers, Bern.
34. Scholer D. W., Edelman L. S., (1979), *Am. J. Physiol.* **237**, F350—F359.
35. Morel F., Imbert M., Chabardes D., (1976) w *Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies*, red. Tager J. M., Söling H. D., Williamson J. R., str. 375—378; North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
36. Morel F., Imbert M., Chabardes D., (1976) w *Renal Metabolism in Relation to Renal Function*, red. Schmidt U., Dubach U. C., str. 214—220; Hans Huber Publishers, Bern.
37. Bosackova J., (1962), *Physiol. Bohemoslov.*, **11**, 39—45.
38. Rorive G., Kleinzeller A., (1974) w *Methods in Enzymology*, red. Colowick S. P., Kaplan N. O., t. **32**, str. 658—664; Academic Press, New York.
39. Thimmappayya B., Ramachandra Reddy R., Bhagava P. M., (1970), *Exptl. Cell. Res.*, **66**, 333—340.
40. Harper E., Seifter S., Hospelhorn V. D., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 627—632.
41. Rasmussen H., (1975), *Met. Enzymol.* **39**, Part D, 11—20.
42. Kleinman J. G., Brown W. M., Ware R. A., Schwartz J. H., (1980), *Am. J. Physiol.*, **239**, F440—F444.
43. Pfeifer V., Guder W. G., (1975), *Virchows Arch.*, **17**, 51—67.
44. Guder W. G., Rupperecht A., (1976) w *Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies*, red. Tager J. M., Söling H. D., Williamson J. R., str. 379—388; North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

45. Chance B., (1957), *Fed. Proc.*, **16**, 671—680.
46. Tamura M., Oshino N., Chance B., Silver I. A., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **191**, 8—22.
47. Brannan T. S., Corder C. N., Rizk M., (1975), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **148**, 714—719.
48. Schmidt U., Marosvari I., Dubach U. C., (1975), *FEBS Lett.*, **53**, 26—28.
49. Burch H. B., Narins R. G., Chu C., Fagioli S., Choi S., McCarthy W., Lowry O. H., (1978), *Am. J. Physiol.*, **235**, F246—F253.
50. Chonko A. M., (1980), *Am. J. Physiol.*, **239**, F545—F551.
51. Schmid H., Mall A., Scholz M., Schmidt U., (1980), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**, 819—827.
52. Hohmann B., Zwiebel R., Yamagata A., Kirsch R., (1969), *Pflügers Arch.*, **312**, 110—125.
53. Schmidt U., Horster M., (1977), *Am. J. Physiol.*, **233**, F55—F60.
54. Hebert S. C., Andreoli T. E., (1980), *Am. J. Physiol.*, **238**, F470—F480.
55. Doucet A., Katz A. I., Morel F., (1979), *Am. J. Physiol.* **237**, F105—F113.
56. Doucet A., Morel F., Katz A. I., (1980), *Int. J. Biochem.*, **12**, 47—52.
57. Edwards R. M., Jackson B. A., Dousa T. P., (1980), *Am. J. Physiol.*, **238**, F269—F278.
58. Walker A. M., Oliver J., (1941), *Am. J. Physiol.*, **134**, 562—579.
59. Windhager E. E., Giebisch G., (1961), *Am. J. Physiol.*, **200**, 581—590.
60. Windhager E. E., (1968) w *Micropuncture Techniques and Nephron Function*, red. Bittar E. E., str. 1—41; Butterworths, London.
61. Windhager E. E., (1981) w *Renal Transport of Organic Substances*, red. Greger R., Lang F., Silbernagl S., str. 6—16, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
62. Sonnenberg H., Deetjen P., (1964), *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, **278**, 669—674.
63. Bank N., Aynedjian H. S., (1972), *Yale J. Biol. Med.*, **45**, 312—317.
64. Gertz K. H., (1972). *Yale J. Biol. Med.*, **45**, 262—268.
65. Deetjen P., Silbernagl S., (1972), *Yale J. Biol. Med.*, **45**, 301—306.
66. Spitzer A., Windhager E. E., (1970), *Am. J. Physiol.*, **218**, 1188—1193.
67. Jamison R. L., (1972), *Yale J. Biol. Med.*, **45**, 254—262.
68. Silbernagl S., (1980), *Int. J. Biochem.*, **12**, 9—16.
69. Ullrich K. J., Rumrich G., Kloss S., (1982), *Pflügers Arch.*, **395**, 212—219.
70. Burg M., Grantham J., Abramow M., Orloff J., (1966), *Am. J. Physiol.*, **210**, 1293—1298.
71. Burg M. B., (1972), *Yale J. Biol. Med.*, **45**, 321—326.
72. McCann W. P. J., (1962), *Am. J. Physiol.*, **203**, 572—576.
73. Kida K., Nakajo S., Kamiya F., Toyama Y., Nishio T., Nakagawa H., (1978), *J. Clin. Invest.*, **62**, 721—726.
74. Owen O. E., Felig P., Morgan A. P., Wahren J., Cahill G. F. Jr., (1969), *J. Clin. Invest.*, **48**, 574—583.
75. Niederland T. R., Dzuric R., Gregorova B. (1971), *Physiol. Bohemoslov.*, **20**, 589—593.
76. Katz N., Brinkmann A., Jungermann K., (1979), *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 51—57.

77. Lupianez J. A., Faus M. J., Munoz-Clares R., Sanchez-Medina F., (1976), *FEBS Lett.*, **161**, 277—281.
78. Kurokawa K., Rasmussen H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **313**, 71—31.
79. Kurokawa K., Rasmussen H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **313**, 42—58.
80. Kurokawa K., Rasmussen H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **313**, 59—71.
81. Melson G. L., Chase L. R., Aurbach G. D., (1970), *Endocrinology*, **86**, 511—518.
82. Guder W. G., Wieland O. H. (1972), *Eur. J. Biochem.*, **31**, 69—79.
83. Marx S. J., Fedak S. A., Aurbach G. D., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6913—6918.
84. Imbert M., Chabardes D., Montegut M., Clique H., Morel F., (1975), *Pflügers Arch.*, **357**, 173—189.
85. Friedrichs D., Schoner W., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **343**, 341—355.
86. Baveral G., Bonnard M., d'Armagnac de Costanet E., Pellet M., (1978), *Kidney Int.*, **14**, 567—578.
87. Hems D. A., (1976) w *Renal Metabolism in Relation to Renal Function*, red. Schmidt U., Dubach U. C., str. 26—39; Hans Huber Publishers, Bern.
88. Guder W. G., Schmidt U., (1974), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 273—278.
89. Burch H. B., Lowry O. H., Perry S. G., Fan L., Fagioli S., (1974), *Am. J. Physiol.*, **226**, 1227—1231.
90. Rajerison R., Marchetti J., Roy C., Bockaert J., Jard S., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 6390—6400.
91. Marx S. J., Woodard C. J., Aurbach G. D., (1972), *Science*, **178**, 999—1000.
92. Nagata N., Rasmussen H., (1970), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 368—374.
93. Guder W. G., Wieland O. H., (1971) w *Regulation of Gluconeogenesis*, red. Söling H. D., Willms B., str. 226—236, Thieme, Stuttgart and Academic Press, New York.
94. Bailly C., Imbert-Teboul M., Chabardes D., Hus-Citharel A., Montegut M., Clique A., Morel F., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3422—3424.
95. McDonald D. R. W., Saggerson E. D., (1977), *Biochem. J.* **168**, 33—42.
96. Guder W. G., Rupprecht A., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **52**, 283—290.
97. Guder W. G., Rupprecht A., (1975), *Pflügers Arch.*, **354**, 177—186.
98. Guder W. G., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **584**, 507—519.
99. Goodman A. D., Fuisz R. E., Cahill G. F. (1966), *J. Clin. Invest.*, **45**, 612—619.
100. Kamm D. E., Fuisz R. E., Goodman A. D., Cahill G. F., (1967), *J. Clin. Invest.*, **46**, 1172—1177.
101. Strzelecki T., Rogulski J., (1977), *Acta Biochim. Polon.*, **24**, 253—260.
102. Alleyne G. A. O., (1970), *J. Clin. Invest.*, **49**, 943—951.
103. Hems D. A., Brosnan J. T., (1971), *Biochem. J.*, **123**, 391—397.
104. Flores H., Alleyne G. A. O., (1971), *Biochem. J.*, **123**, 35—39.
105. Alleyne G. A. O., Scullard G. H., (1969), *J. Clin. Invest.*, **48**, 364—370.

106. Vinay P., Lemieux G., Gougoux A., Lemieux Ch., (1980), *Int. J. Biochem.*, **12**, 89—98.
107. Welbourne T. C., (1974), *Am. J. Physiol.*, **226**, 544—548.
108. Kamm D. E., Strobe G. L., (1972), *J. Clin. Invest.*, **51**, 1251—1256.
109. Roobol A., Alleyne G. A. O., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **362**, 83—91.
110. Welbourne T. C., Francoeur D., Thornley-Brown G., Welbourne C. J., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **444**, 644—652.
111. Schoolwerth A. C., Nazar B. L., LaNoue K. F., (1978), *J. Biol. Chem.* **253**, 6177—6183.
112. Cheema-Dhadli S., Halperin M. L., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **99**, 483—489.
113. Halperin M. L., Cheema-Dhadli S., (1980), *Int. J. Biochem.* **12**, 135—137.
114. Goldstein L., (1967), *Am. J. Physiol.*, **213**, 983—989.
115. Durozard D., Bavarel G., (1983), *Biochem.*, **J.**, **210**, 483—487.
116. Stone W. J., Pitts R. F., (1967), *J. Clin. Invest.*, **46**, 1141—1150.
117. Preuss H. G., (1971), *Am. J. Physiol.*, **220**, 54—58.
118. Klahr S., Schoolwerth A. C., Bourgoignie J. J., (1972), *Am. J. Physiol.*, **222**, 813—820.
119. O'Donovan D. J., (1977) w *Biochemical Nephrology*, red. Guder W. G., Schmidt U., str. 236—243; Hans Huber Publishers, Bern.
120. Goldstein L., (1966), *Am. J. Physiol.*, **210**, 661—666.
121. Goldstein L., Copenhaver J. H., (1960), *Am. J. Physiol.* **198**, 227—229.
122. Tannen R. L., Ross B. D., (1978), *Curr. Prob. Clin. Biochem.*, **8**, 217—226.
123. Tizianello A., Deferrari G., Garibotto G., Robaudo C., Buzzone M., Passerone G. C., (1982) *Contr. Nephrol.*, **31**, 40—46.
124. Goorno W. E., Rector F. C., Seldin D. W., (1967), *Am. J. Physiol.*, **213**, 969—974.
125. Pitts R. R., (1971), *N. Eng. J. Med.*, **284**, 32—33.
126. Hems D. A., (1972), *Biochem. J.*, **130**, 672—680.
127. Pagliara A. S., Goodman A. D., (1970), *J. Clin. Invest.*, **49**, 1967—1974.
128. Irias J. J., Greenberg R. E., (1972), *Am. J. Physiol.*, **223**, 750—755.
129. Preuss H. G., Vavatsi-Manos O., Vertuno L., Baird K., (1974), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **146**, 803—808.
130. Cartier P., Belanger P., Lemieux G., (1975), *Am. J. Physiol.*, **228**, 934—943.
131. Weidemann M. J., Krebs H. A., (1969), *Biochem. J.*, **112**, 149—166.
132. Barac-Nieto M., Cohen J. J., (1968), *Am. J. Physiol.*, **215**, 98—107.
133. Barac-Nieto M., Cohen J. J., (1971), *Nephron*, **8**, 488—499.
134. Wirthensohn G., Gerl M., Guder W. G., (1980), *Int. J. Biochem.*, **12**, 157—161.
135. Guder W. G., Schmidt U., (1976), *Kidney Int.*, **10**, 532—538.
136. Carone F. A., Peterson D. R., Oparil S., Pullman T. N., (1979), *Kidney Int.*, **16**, 271—278.
137. Baumann K., (1981) w *Renal Transport of Organic Substances*, red. Greger R., Lang F., Silbernagl S., str. 118—133; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
138. Bourdeau J. E., Carone F. A., Ganote C. E., (1972), *J. Cell Biol.*, **54**, 382—398

139. Johnson V., Maack T., (1977), *Am. J. Physiol.*, F185—F196.
140. Rabkin R., Kitabchi A. E., (1978). *J. Clin. Invest.*, 62, 169—175.
141. Peterson D. R., Carone F. A., Oparil S., Christensen E. I., (1982), *Am. J. Physiol.*, F112—F118.
142. Hruska K. A., Martin K., Menner P., Greenwalt A., Anderson C., Klahr S., Slatopolsky E., (1977), *J. Clin. Invest.*, 60, 501—510.
143. Kau S. T., Maack T., (1977), *Am. J. Physiol.*, 233, F445—F454.
144. Maack T., (1975), *Am. J. Med.*, 58, 57—64.
145. Ottosen P. D., Bode F., Madson K. M., Maunsbach A. B., (1979), *Kidney Int.*, 15, 246—254.
146. Christensen E. J., (1976), *Kidney Int.*, 10, 301—310.
147. Hensen N. E., Korle H., Andersen U., Ølgaard K., (1972), *J. Clin. Invest.*, 51, 1146—1155.
148. Maack T., Johnson V., Kau S. T., Figueiredo J., Sigulem D., (1979), *Kidney Int.*, 16, 251—270.
149. Davidson S. J., (1973), *J. Cell Biol.*, 59, 213—222.
150. Busse D., Steinmaier G., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, 345, 359—372.
151. Poiree J. C., Vannier C., Sudaka P., Fehlman M., (1978), *Biochimie*, 60, 645—651.
152. Malathi P., Preiser H., Fairclough P., Mallett P., Crane R. K., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 554, 259—263.
153. Ganapathy V., Leibach F. H., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, 691, 362—366.
154. Welch C. L., Campbell B. J., (1980), *J. Membr. Biol.*, 54, 39—50.
155. Ganapathy V., Mendicino J., Leibach F. H., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 642, 381—391.
156. Deetjen P., (1981) w Renal Transport of Organic Substances, red. Greger R., Lang F., Silbernagl S., str. 1—5; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
157. Foulkes E. C., (1981) w Renal Transport of Organic Substances, red. Greger R., Lang F., Silbernagl S., str. 45—54; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
158. Heidrich H. G., Kinne R., Kinne-Saffran E., Hanning K., (1972), *J. Cell Biol.*, 54, 232—245.
159. Balagura S. P., Us R. F., (1962), *Am. J. Physiol.*, 203, 11—14.
160. Trimble M. E., (1979), *Am. J. Physiol.*, 237, F210—F217.
161. Koschier F. J., Stokols M. F., Goldinger J. M., Acara M., Hong S. K., (1980), *Am. J. Physiol.*, 238, F99—F106.
162. Maack T., (1980), *Am. J. Physiol.*, 238, F71—F78.
163. Struyvenberg A., Morrison R. B., Relman A. S., (1968), *Am. J. Physiol.*, 214, 1155—1162.
164. Tune B. M., Burg M. B., (1971), *Am. J. Physiol.*, 221, 580—585.
165. Hillman R. E., Albrecht I., Rosenberg L. E., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, 150, 528—530.
166. Hillman R. E., Albrecht I., Rosenberg L. E., (1968), *J. Biol. Chem.*, 243, 5566—5571.
167. Hillman R. E., Rosenberg L. E., (1969), *J. Biol. Chem.*, 244, 4494—4498.
168. Kippen I., Hirayama B., Klinenberg J. R., Wright E. M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 558, 126—135.
169. Gingery R., Chesney R. W., (1980), *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 164, 18—22.

170. Kippen I, Klinenberg J. R., Wright E. M., (1980), *J. Physiol.*, **304**, 373—387.
171. Shimomura A., Chonko A., Tanner R., Edwards R., Grantham J., (1981), *Am. J. Physiol.*, **241**, F565—F578.
172. Boumendil-Podevin E. F., Podevin R. A., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6675—6681.
173. Podevin R. A., Boumendil-Podevin E. F., Bujoli-Roche J., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **629**, 135—142.
174. Busse D., Jahn A., Steinmayer G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **401**, 231—243.
175. Hillman R. E., Rosenberg L. E., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **211**, 318—326.
176. Busse D., (1978), *Arch. Bloch. Bioph.*, **191**, 551—560.
177. Busse D., Elsas L. J., Rosenberg L. E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1188—1193.
178. Liang C. T., Sacktor B., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **466**, 474—487.
179. Kippen I., Hirayama B., Klinenberg J. R., Wright E. M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **556**, 161—174.
180. Lücke H., Stange G., Murer H., (1979), *Biochem. J.*, **182**, 223—229.
181. Murer H., Leopolder A., Kinne R., Burckhardt G., (1980), *Int. J. Biochem.*, **12**, 223—228.
182. Foreman J. H. Wald H., Reynolds R. A., Segal S., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **646**, 188—192.
183. Thierry J., Poujeol P., Ripophe P., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **647**, 203—210.
184. Que N. H., Gmaj P., Angielski S., (1982), *Acta Biochim. Polon.*, **29**, 275—287.
185. Ganapathy V., Roesel R. A., Leibach F. H., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 28—35.
186. Ganapathy V., Roesel R. A., Howard J. C., Leibach F. H., (1983), *J. Biol. Chem.*, **2266**—2272.
187. Slack E. N., Liang C-C. T., Sacktor B., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 891—897.
188. Goldmann D. R., Roth K. S., (1979), *Biochem. J.*, **178**, 253—256.
189. Sacktor B., (1981), *Mol. Cellular Biochem.*, **39**, 239—251.
190. Chauhan V. P. S., Kalra V. K., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **727**, 185—195.
191. Lash L. H., Jones D. P., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**, 55—60.

Działanie tlenu w fotosyntetycznym metabolizmie węgla

Effect of oxygen on photosynthetic carbon metabolism

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Wytwarzanie i przemiany kwasu glikolowego
- III. Współzawodnictwo pomiędzy CO₂ i O₂
- IV. Odplyw asymilowanego węgla z chloroplastów
- V. Substraty odtwarzania RuBP
- VI. Działanie tlenu przy podwyższonym stężeniu CO₂ i intensywnym świetle
- VII. Fizjologiczne znaczenie działania tlenu w procesie fotosyntezy

Contents

- I. Introduction
- II. Glycolic acid synthesis and its metabolism
- III. Competition between CO₂ and O₂
- IV. Outflow of assimilated carbon from chloroplasts
- V. Substrats for RuBP regeneration
- VI. Effect of oxygen under high CO₂ concentration and high light intensity
- VII. Physiological role of oxygen in photosynthesis

I. Wprowadzenie

Badania dotyczące problemu przedstawionego w tym artykule, prowadzone już od przeszło 60 lat, prawie wyłącznie były podejmowane w celu wyjaśnienia zjawiska hamowania fotosyntezy przez tlen, zwanego w literaturze naukowej efektem Warburga (1, 2, 3, 4). Dopiero w ostatnich latach przedmiotem badań stało się także stymulowanie fotosyntezy przez

*) Doc. dr hab., **) Dr, Instytut Botaniki Uniwersytetu Warszawskiego, 02-325 Warszawa, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28

Wykaz stosowanych skrótów: PGA — 3-fosfoglicerynian; RuBP — rybulozo-1,5-bisfosforan; P-glikolan — fosfoglikolan; α -HPMS — kwas α -hydroksy-2-pirydynometanosulfonowy; INH-hydrazyd kwasu izonikotynowego; TPS — fotosynteza całkowita (od ang. *true photosynthesis*); APS — fotosynteza netto (od ang. *apparent photosynthesis*); PR — fotooddychanie (od ang. *photorespiration*); rośliny C₃, C₄ — rośliny, u których pierwszym wykrywanym produktem fotosyntetycznej asymilacji CO₂ jest odpowiednio PGA, kwas szczawiooctowy.

tlen, ujawniające się tylko w specjalnych warunkach doświadczalnych (patrz rozdz. VI).

Obecnie wiemy, że tlen działa w różnych miejscach procesu fotosyntezy. Bezpośrednio uczestnicząc w kilku co najmniej reakcjach, tlen wpływa zarówno na natężenie jak i przebieg tego procesu. Występowanie, kierunek i zakres modyfikacji powodowanych przez tlen zależą w dużym stopniu od innych czynników, z których największe znaczenie mają stężenie dwutlenku węgla i natężenie światła.

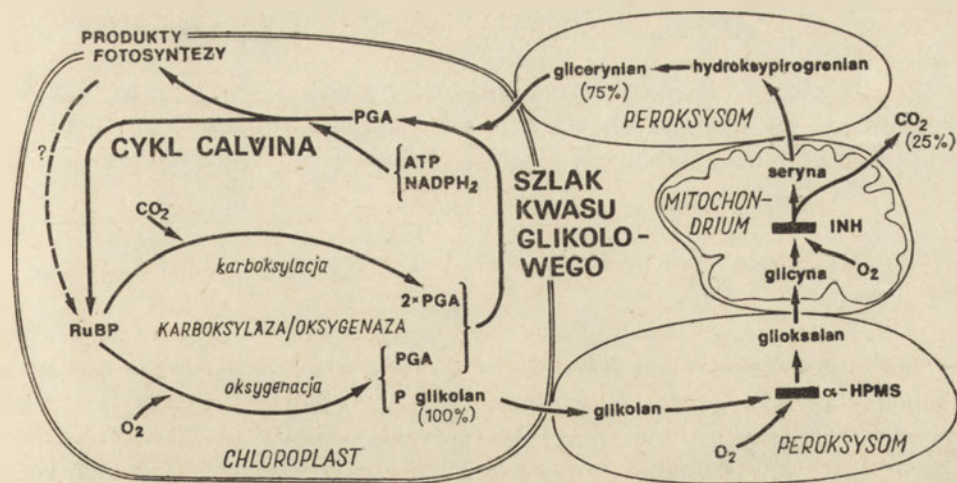
Działanie tlenu na etapie fotosyntetycznych reakcji asymilacji i redukcji węgla, mimo licznych badań, nie jest jeszcze w zadowalającym stopniu poznane. Nie jest też wyjaśniona fizjologiczna funkcja tlenu w tym procesie. W niniejszym przeglądzie ostatnich osiągnięć na tym polu uwzględniono tylko wyniki badań prowadzonych z roślinami C_3 . U roślin C_4 i u roślin gruboszowatych (CAM) występują bowiem 'dodatkowe' mechanizmy fotosyntetyczne (2, 3), które wpływ tlenu istotnie modyfikują.

II. Wytwarzanie i przemiany kwasu glikolowego

Zjawisko hamowania fotosyntezy przez tlen, występujące przy stężeniach CO_2 zbliżonych do atmosferycznego i niższych, ma złożony mechanizm biochemiczny. Na etapie przemian asymilowanego węgla kluczowe regulacyjne znaczenie ma działanie O_2 w reakcjach katalizowanych przez dwufunkcyjny enzym karboksylazę/oksygenazę RuBP (5, 6). Enzym ten zapoczątkowuje dwa wzajemnie uzależnione przeciwstawne procesy: fotosyntetyczną asymilację CO_2 oraz szlak kwasu glikolowego (Ryc. 1). Drugi proces, zwany fotooddychaniem, jest związany z zużywaniem O_2 i wytwarzaniem CO_2 w fotosyntetyzujących tkankach. Oprócz chloroplastów biorą w nim udział peroksyzomy i mitochondria.

Opublikowano nieliczne dane, na podstawie których sugerowano, że karboksylaza i oksygenaza RuBP są odrębnymi enzymami (7). Obecnie można jednak uznać za udowodnione, że obie aktywności są związane z tym samym białkiem (8). Co więcej, w reakcji karboksylacji ($RuBP + CO_2 \rightarrow 2 PGA$) i w reakcji oksygenacji ($RuBP + O_2 \rightarrow PGA + \text{kwas P-glikolowy}$) uczestniczy to samo centrum aktywne enzymu. Ponadto, stężenie jonów wodorowych oraz CO_2 i Mg^{2+} jako aktywatory enzymu mają taki sam wpływ na obie jego aktywności (9, 10). W obu reakcjach enzym wykazuje podobne powinowactwo wobec RuBP, ale charakteryzuje się $K_m (CO_2)$ wyraźnie mniejszym od $K_m (O_2)$ (11).

Reakcje oksygenacji RuBP jest niewątpliwie głównym źródłem glikolanu w komórkach wszystkich fotosyntetyzujących organizmów (12—15). Związek ten może jednak powstawać także w dalszym etapie cyklu Calvina, w reakcji katalizowanej przez transketolazę. Nieenzymatyczne utle-



Ryc. 1. Karboksylacja RuBP i oksigenacja RuBP w cyklu Calvina i w szlaku kwasu glikolowego (według 19).

Uwzględniono miejsca działania O_2 i inhibitorów szlaku kwasu glikolowego. Linią przerywaną zaznaczono hipotetyczną drogę odtwarzania RuBP z wykorzystaniem nagromadzonych w komórkach asymilatów. Liczby w nawiasach wyrażają stechiometrię przemian węgla P-glikolanu.

nianie wytwarzanego tam aktywnego aldehydu glikolowego (pirofosforanu 1,2-dwuhydroksyetylotiaminy) przebiega z małym natężeniem i jest wysyczone już przy niskich stężeniach O_2 (16, 17). W normalnych warunkach nie może być więc wydajnym źródłem glikolanu i w istotny sposób wpływać na natężenie i przebieg fotosyntezy.

Tlen bierze również udział w przemianach kwasu glikolowego (Ryc. 1). Po przekształceniu w chloroplastach P-glikolanu w glikolan rozpoczyna je oksydaza glikolanowa występująca w peroksysomach. Enzym ten, zawierający FMN jako grupę prostetyczną, katalizuje reakcję utleniania glikolanu do glioksalanu z równoczesną redukcją O_2 do H_2O_2 . Małe powinowactwo oksydazy glikolanowej do O_2 sprawia, że szybkość katalizowanej przez nią reakcji silnie zależy od stężenia tego substratu (18).

Bezpośrednim źródłem CO_2 wytwarzanego w fotooddychaniu jest przebiegająca w mitochondriach dekarboksylacja glicyny, prowadząca do przekształcenia 2 cząsteczek glicyny w serynę. Przemiany te są katalizowane przez obecną w błonach dekarboksylazę glicynową i występującą w matryks hydroksymetylotransferazę serynową. W doświadczeniach z izolowanymi mitochondriami wykazano powiązanie tych przemian z redukcją NAD i pobieraniem O_2 jak również ich zależność od ADP. Dało to podstawę dla wysunięcia sugestii, że część energii uwalnianej w fotooddychaniu może być wykorzystana do syntezy ATP w reakcjach fosforylacji oksydacyjnej (19). Reakcje utleniania glicyny ulegają wysyceniu już przy niskim stężeniu tlenu (20, 21). Nie mogą więc, jak przypuszczano wcześniej (22), stanowić ogniwa za pośrednictwem którego stężenie O_2 mody-

fikuje natężenie przepływu asymilowanego węgla przez szlak kwasu glikolowego.

W literaturze nie ma informacji, które by wskazywały na możliwość działania tlenu w dalszych etapach szlaku kwasu glikolowego, poprzedzających powrót metabolizowanego w nim węgla do cyklu Calvina.

III. Współzawodnictwo pomiędzy CO_2 i O_2

Natężenia przemian asymilowanego węgla w cyklu Calvina i w szlaku kwasu glikolowego zależą od stężeń CO_2 i O_2 w miejscu funkcjonowania karboksylazy/oksygenazy RuBP (23—25). Od stężeń tych zależy też natężenie fotosyntezy całkowitej (TPS), fotosyntezy netto (APS) i fotooddychania (PR). Kwas glikolowy nie gromadzi się bowiem w komórkach lecz ulega natychmiast przemianom, w których 25% jego węgla zostaje przekształcone w fotooddechowy CO_2 (26).

Podczas fotosyntezy, przebiegającej w liściach fasoli znajdujących się w warunkach zbliżonych do naturalnych (0.03% CO_2 , 21% O_2 , 25—30°C), stosunek liczby cząsteczek RuBP biorących udział w reakcji karboksylacji do liczby cząsteczek RuBP ulegających oksygenacji wynosi w przybliżeniu 7:1 (23). Przy podwyższaniu stężenia O_2 lub obniżaniu stężenia CO_2 stosunek ten maleje i w obu przypadkach jest to związane z zahamowaniem fotosyntetycznej asymilacji CO_2 . Przy zmianach stężeń CO_2 lub O_2 w przeciwnych kierunkach wartość tego stosunku zwiększa się wielokrotnie (23). Wyraża się to wzrostem natężenia fotosyntetycznej asymilacji CO_2 ; przy czym APS zbliża się do TPS a maleje odpowiednio wartość PR.

Różnica pomiędzy natężeniem asymilacji CO_2 przy atmosferycznym lub wyższych stężeniach O_2 a natężeniem tego procesu przy znacznie obniżonym stężeniu O_2 (np. do 0,5%) jest przyjmowana za ilościowy wskaźnik fotooddychania. Podstawą tego jest założenie, że $\text{PR} = \text{TPS} - \text{APS}$ (27) oraz że wartość TPS tylko w małym stopniu zależy od stężenia tlenu. Wyniki niektórych wcześniejszych prac potwierdzały słuszność takiego założenia w pełnym zakresie stężeń O_2 (28) oraz w szerokim zakresie stężeń CO_2 (29, 30). Znaczyłyby to, że zarówno przy zmianach stężenia CO_2 jak też przy zmianach stężenia O_2 następują ilościowo sobie odpowiadające, lecz przeciwne kierunkowo, zmiany APS i PR oraz prowadziło do wniosku, że bezpośrednią przyczyną efektu Warburga jest wzrost natężenia fotooddychania.

Stechiometria reakcji karboksylacji i oksygenacji RuBP wskazuje jednak, że utrzymanie stałej lub mało tylko zmniejszonej fotosyntezy całkowitej, przy wzrastającym w wyniku podwyższania stężenia tlenu w środowisku fotooddychaniu, musiałoby być związane ze znacznym zwiększeniem ilości RuBP zużywanego w obu reakcjach (31). Takich zmian dynamicznej puli RuBP zależnych od stężenia O_2 doświadczalnie bezpośrednio

nie wykazano. Także występowanie prostej zależności pomiędzy stężeniem O_2 a szybkością wytwarzania kwasu glikolowego i jego przemian związanych z fotooddychaniem można uznać za udokumentowane jedynie w odniesieniu do zakresu stężeń tlenu 2—21‰ (32—34).

Interesujące są doniesienia, że nawet znaczne podwyższenie stężenia CO_2 (do 0,1—0,3‰) lub obniżenie stężenia O_2 do około 1‰ nie powoduje jednak całkowitego zahamowania syntezy kwasu glikolowego i fotooddychania (29, 35-38). Jest to interpretowane jako potwierdzenie możliwości wytwarzania podczas fotosyntezy kwasu glikolowego w alternatywnej reakcji nie hamowanej przez CO_2 i niezależnej od zewnętrznego stężenia tlenu. Może to być, opisana wcześniej, reakcja nieenzymatycznego utleniania aktywnego aldehydu glikolowego, przebiegająca w chloroplastach z udziałem utleniaczy wytwarzanych w fotosystemie II (16, 17). W związku z tym nasuwa się pytanie: czy alternatywna reakcja uczestniczy w wytwarzaniu glikolanu również podczas fotosyntezy odbywającej się w normalnej atmosferze, czy jako mechanizm kompensacyjny jest uruchamiana tylko przy zablokowanej przy wysokim stężeniu CO_2 lub niskim stężeniu O_2 oksygenacji RuBP (38).

Wpływ innych czynników na wytwarzanie i przemianę kwasu glikolowego *in vivo* podczas fotosyntezy jest mało poznany. Wielokrotnie stwierdzano, że zależność tych procesów od natężenia światła jest taka sama jak fotosyntezy. Pozwala to przypuszczać, że światło wpływa na nie wyłącznie pośrednio przez fotosyntezę, która dostarcza substratów dla wytwarzania glikolanu (39, 40).

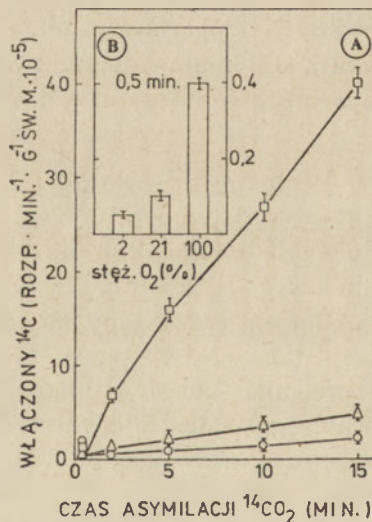
Na podstawie powodowanych temperaturą zmian fotooddychania można wnioskować, że temperatura optymalna dla wytwarzania glikolanu jest wyższa niż optimum temperaturowe fotosyntezy i przekracza zwykle 30°C (27).

W doświadczeniach z roślinami adaptowanymi do chłodu uzyskano dane wskazujące, że efekt niskiej temperatury zależy w dużym stopniu od czasu jej działania. Po względnie krótkim okresie chłodu udział metabolitów szlaku kwasu glikolowego (glikolanu, glicyny i seryny) w fotosyntetycznych przemianach węgla jest zwiększony, natomiast po przedłużonym okresie chłodu modyfikacja taka nie występuje (41, 42). Autorzy badań sugerują, że wzmoczenie przemian kwasu glikolowego jest spowodowane zakłóceniem funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego, a zanik tego wzmoczenia stanowi jeden z przejawów adaptacji roślin do niskiej temperatury. Zmniejszona znacznie asymilacja CO_2 w liściach rzepaku poddane go długotrwałemu wpływowi chłodu charakteryzuje się obniżoną wrażliwością na działanie tlenu (43). Czynnikiem obniżającym wrażliwość fotosyntezy na działanie tlenu (44) oraz zmniejszającym wytwarzanie glikolanu (45) jest też umiarkowany deficyt fosforu w liściach.

IV. Odptyw asymilowanego węgla z chloroplastów

Stymulowanie podczas fotosyntezy wytwarzania kwasu glikolowego z fosforanów cukrów oraz odptyw tego związku z chloroplastów może zmniejszać pule pośrednich metabolitów cyklu Calvina i odtwarzanie RuBP. Bezwzględny wzrost natężenia wytwarzania glikolanu i jego przemian związanych z fotooddychaniem po podwyższeniu stężenia O_2 w środowisku może być więc tylko krótkotrwałym efektem przejściowym prowadzącym do nowego stanu dynamicznej równowagi karboksylacji i oksygenacji RuBP, wyrażającego się obniżeniem zarówno natężenia asymilacji CO_2 jak i wytwarzania kwasu glikolowego. Trwały wzrost wytwarzania kwasu glikolowego i natężenia fotooddychania mógłby ewentualnie wystąpić jedynie przy wzroście stężenia O_2 w takim zakresie, w którym oksygenacja RuBP nie wpływa znacząco na karboksylację RuBP (natężenie fotosyntezy całkowitej).

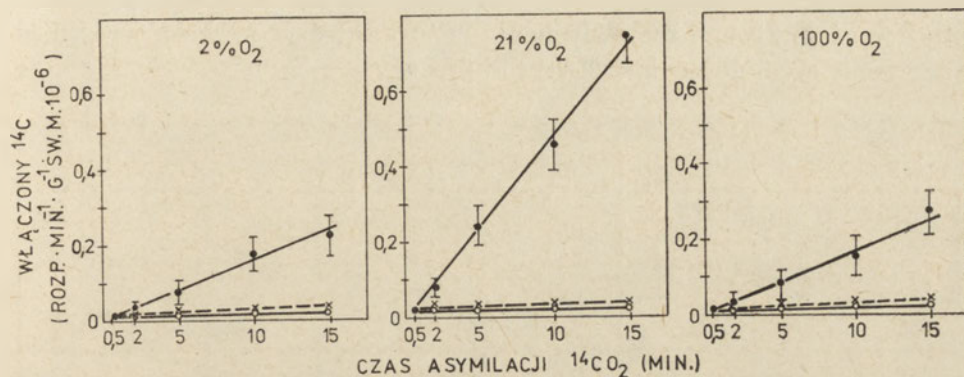
Przedstawioną wyżej hipotezę sprawdzono oznaczając podczas fotosyntezy przebiegającej w różnych warunkach tlenowych ilości asymilowanego węgla ulegającego przemianom w szlaku kwasu glikolowego (46-48). W badaniach tych stosowano inhibitory tego szlaku: kwas α -hydroksy-2-pirydynometanosulfonowy (α -HPMS), który hamuje oksydazę glikolanową i powoduje gromadzenie się glikolanu w tkankach liści (49) oraz hydrazyd kwasu izonikotynowego (INH), działający na etapie przekształcania glicyny w serynę (50), w obecności którego gromadzi się glioksalan i glicyna (Ryc. 1). Gromadzenie się tych metabolitów jest niewątpliwie proporcjonalne do ich wytwarzania.



Ryc. 2. Włączenie ^{14}C do kwasu glikolowego w liściach fasoli podczas asymilacji $^{14}CO_2$ przy różnych stężeniach tlenu (48).

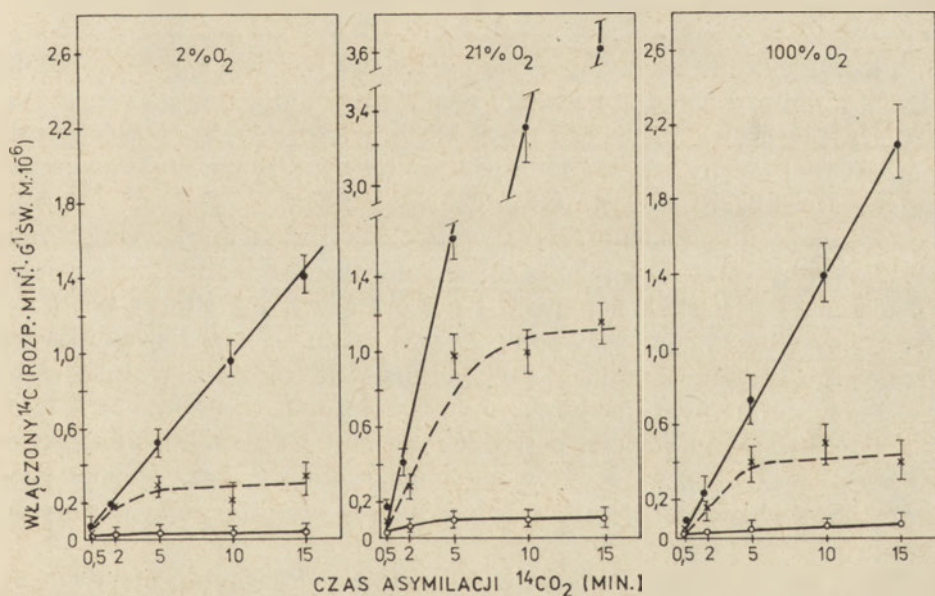
Kinetyka włączenia ^{14}C (A). Włączony ^{14}C po 0,5 min asymilacji (B). Stężenie $^{14}CO_2$ 0,035‰; stężenia O_2 : 2‰ — trójkąty, 21‰ — kwadraty, 100‰ — kółka. Liście pobierały roztwór 10^{-4} M α -HPMS. Liniami pionowymi oznaczono błąd standardowy średniej.

W liściach fasoli asymilujących $^{14}\text{CO}_2$ i pobierających α -HPMS radioaktywny kwas glikolowy gromadził się z szybkością zależną od stężenia tlenu. Przy stężeniu 21% O_2 była ona o rząd większa niż przy stężeniu O_2 obniżonym do 2% jak i podwyższonym do 100% (Ryc. 2A). W taki sam sposób zmieniał się w zależności od stężenia O_2 włączanie asymilowanego ^{14}C do gliksalanu (Ryc. 3) i do glicyny (Ryc. 4) w liściach pobierających INH.



Ryc. 3. Włączanie ^{14}C do kwasu gliksalowego w liściach fasoli podczas asymilacji $^{14}\text{CO}_2$ przy różnych stężeniach tlenu (48).

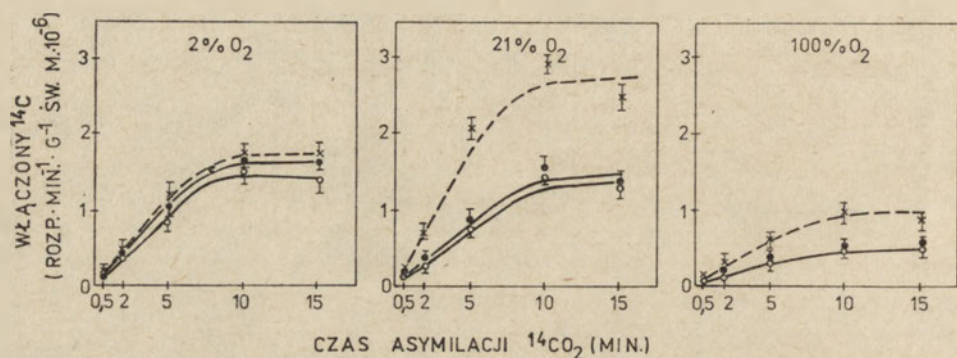
Liście kontrolne pobierające wodę — krzyżyki; liście pobierające roztwór 10^{-2} M α -HPMS — kółka puste; liście pobierające roztwór 10^{-2} M INH — kółka pełne. Liniami pionowymi oznaczono błąd standardowy średniej.



Ryc. 4. Włączanie ^{14}C do glicyny w liściach fasoli podczas asymilacji $^{14}\text{CO}_2$ przy różnych stężeniach tlenu (48).

Oznaczenia jak na ryc. 3.

Włączenie ^{14}C do glicyny i całkowita radioaktywność wysyczonej węglem ^{14}C puli tego aminokwasu były w liściach kontrolnych również największe przy stężeniu 21% O_2 . Włączenie ^{14}C do glicyny było natomiast całkowicie zahamowane w liściach pobierających α -HPMS (Ryc. 4). Stwierdzenia te stanowią świadectwo powstawania glicyny podczas fotosyntezy głównie w szlaku kwasu glikolowego (51, 52). Ponadto, wskazują one, że w całych liściach przepływ asymilowanego węgla przez pule tego aminokwasu przy normalnej atmosferze jest wielokrotnie większy niż zarówno przy stężeniu tlenu hamującym fotooddychanie (2%) jak też w doświadczeniach *in vitro* silnie stymulującym (100%) ten proces.



Ryc. 5. Włączenie ^{14}C do seryny w liściach fasoli podczas asymilacji $^{14}\text{CO}_2$ przy różnych stężeniach tlenu (48).

Oznaczenia jak na ryc. 3.

Włączenie ^{14}C do seryny było tylko częściowo blokowane przez α -HPMS i INH, inhibitory hamujące reakcje szlaku kwasu glikolowego poprzedzające syntezę tego aminokwasu (Ryc. 5). Potwierdza to, że znaczna część ogólnej ilości seryny wytwarzanej podczas fotosyntezy powstaje na drodze nie związanej bezpośrednio z tym szlakiem (52-54).

Radioaktywność podpuli seryny wytwarzanej w szlaku kwasu glikolowego może być obliczona jako różnica pomiędzy ilościami ^{14}C włączonego do seryny w liściach kontrolnych i pobierających inhibitory. Wielkości tej różnicy wskazują, że przy obniżonym stężeniu O_2 udział szlaku kwasu glikolowego w wytwarzaniu seryny nie ma praktycznie znaczenia, natomiast przy normalnym i podwyższonym stężeniu O_2 więcej niż 50% fotosyntetycznej seryny stanowi pośredni metabolit tego szlaku. Przy czym, jak wynika z danych przedstawionych na rycinie 5, bezwzględna ilość seryny tam wytwarzanej jest największa przy atmosferycznym stężeniu tlenu.

Warto zwrócić uwagę na to, że wytwarzanie podczas fotosyntezy seryny na innej drodze niż szlak kwasu glikolowego (nie wrażliwej na α -HPMS i INH) nie zmienia się przy wzroście stężenia O_2 z 2% na 21%, natomiast ulega wyraźnemu obniżeniu przy wysokim stężeniu tlenu (Ryc. 5). Obni-

zenie to jest niewątpliwie spowodowane silnym hamowaniem przez tlen karboksylacji RuBP i wytwarzania ^{14}C -PGA jako bliskiego prekursora tej części puli seryny (54).

Oznaczając w liściach fasoli radioaktywność glikolanu po krótkim czasie asymilacji $^{14}\text{CO}_2$ uzyskano rezultaty pozornie sprzeczne z wnioskami wypływającymi z badań przedstawionych wyżej. Wskazywały one (Ryc. 2B), że asymilowany ^{14}C dociera do puli glikolanu szybciej przy dużej zawartości O_2 w atmosferze niż przy stężeniu 21% O_2 , które jest bardziej korzystne dla wytwarzania tego związku w całych liściach (Ryc. 2A). Ustosunkowując się do tego wyniku trzeba uwzględnić to, że w doświadczeniach ze znaczonymi substratami szybkość pojawiania się znacznika w kolejnych pośrednich i w końcowych produktach szlaku metabolicznego zależy także od wielkości pul ich prekursorów oraz od szybkości ich obrotu. Małe pule prekursorów wysycają się szybciej niż pule duże i znacznik po krótszym czasie pojawia się w dalszych i w końcowych produktach łańcucha przemian.

Włączanie fotosyntetycznie asymilowanego ^{14}C do glikolanu następuje dopiero po przejściu przez szereg pul fosforanów cukrów, prekursorów RuBP w cyklu Calvina. Dane przedstawione na rycinie 2B można więc uznać za świadectwo znacznego zmniejszenia w warunkach wysokiego stężenia O_2 pul tych związków oraz odtwarzania RuBP (46-48). Bezpośrednio stwierdzono to w doświadczeniach z chloroplastami wyizolowanymi z liści szpinaku (55).

Wyniki przedstawionych badań wskazują, że podczas fotosyntezy w całych liściach przebiegającej przy atmosferycznym stężeniu CO_2 , podwyższenie stężenia O_2 z 2% do stężenia atmosferycznego powoduje istotne zwiększenie przepływu asymilowanego węgla przez metabolity szlaku kwasu glikolowego. Dalsze podwyższanie stężenia O_2 jest natomiast związane nie tylko z silnym zahamowaniem asymilacji CO_2 , lecz również ze znacznym ograniczeniem funkcjonowania tego szlaku. Zjawisko takie występuje mimo stymulowania przez tlen wytwarzania i przemian kwasu glikolowego. Zależność fotosyntezy i fotooddychania w całych liściach od CO_2 i O_2 jest bowiem bardzo złożona. Substraty te współzawodnicząc w reakcjach rozpoczynających fotosyntezę i fotooddychanie wpływają także na odtwarzanie RuBP, trzeciego substratu tych reakcji. Przy obniżonym stężeniu O_2 jest ograniczona oksygenacja RuBP i wytwarzanie glikolanu, co może być związane ze zwiększonym natężeniem asymilacji CO_2 . Najbardziej korzystny stosunek obu aktywności karboksylazy/oksygenazy RuBP dla wytwarzania kwasu glikolowego w fotosyntezie jest przy atmosferycznych stężeniach CO_2 i O_2 . W tych warunkach oksygenacja RuBP obniżając odpowiednio natężenie karboksylacji RuBP nie powoduje jednak jeszcze istotnego zmniejszenia wydajności odtwarzania RuBP. Może być też rekompensowana zwiększoną szybkością obrotu pośrednich metabolitów cyklu asymilacji i redukcji węgla (31). Przy podwyższonym natomiast

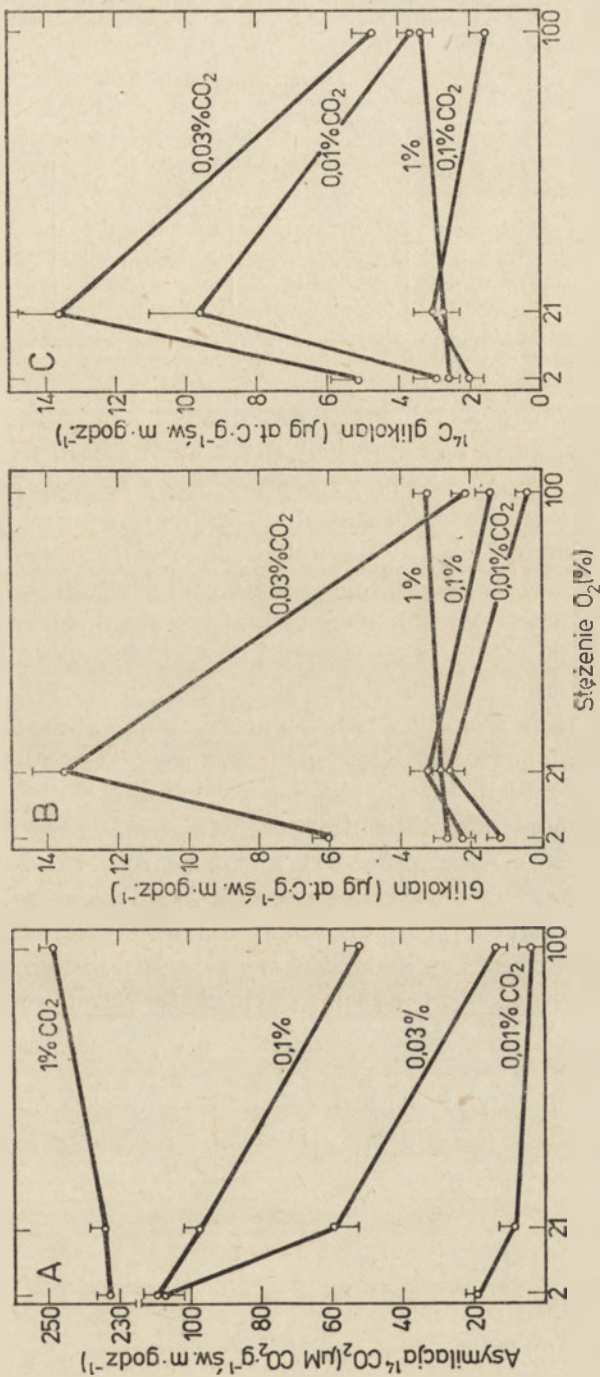
znacznie stężeniu O_2 , w wyniku stymulowania metabolizmu kwasu glikolowego, wzrasta się odpływ asymilowanego węgla z chloroplastów (26). Dopróżdża to do zmniejszenia odtwarzania RuBP, co ogranicza zarówno fotosyntezę jak wytwarzanie i przemiany kwasu glikolowego.

V. Substraty odtwarzania RuBP

Podczas fotosyntezy przebiegającej w warunkach zbliżonych do normalnych RuBP jako akceptor CO_2 i bezpośredni substrat w reakcji wytwarzania glikolanu jest w pełni odtwarzany z aktualnie asymilowanego węgla. Szybki obrót tego metabolitu powoduje, że w doświadczeniach z $^{14}CO_2$, jego pula już po krótkim czasie zostaje wysyciona znacznikiem. Atomy węgla glikolanu osiągają również szybko radioaktywność właściwą taką jaką ma asymilowany $^{14}CO_2$ (29, 56). Po czasie 5—10 min ulegają wysyceniu izotopem ^{14}C pule glicyny i seryny (57).

Z drugiej strony jednak, wytwarzanie glikolanu oraz fotooddychanie przebiegają z podobnym natężeniem jak podczas normalnej fotosyntezy również w liściach znajdujących się w atmosferze niemal całkowicie pozbawionej CO_2 , a więc przy braku asymilacji CO_2 netto (37, 49). Sugeruje to, że substratami w tych procesach mogą być nie tylko aktualnie wytwarzane wczesne produkty fotosyntezy, lecz także uprzednio nagromadzone w komórkach liści asymilaty (21). Sugestię taką potwierdza zmniejszanie się radioaktywności nagromadzonych wcześniej w liściach końcowych produktów asymilacji $^{14}CO_2$ podczas ekspozycji liści na światło w atmosferze pozbawionej CO_2 (58) oraz stwierdzana w takich warunkach doświadczalnych niska radioaktywność właściwa CO_2 wytwarzanego w fotooddychaniu (59).

Badania, w których w liściach fasoli pobierających α -HPMS oznaczano asymilację $^{14}CO_2$, gromadzenie się glikolanu oraz włączanie ^{14}C do tego związku przy różnych stężeniach CO_2 i O_2 dostarczyły przekonujących dowodów zużywania w syntezie glikolanu i w fotooddychaniu nagromadzonych wcześniej w komórkach materiałów zapasowych (47). W doświadczeniach tych asymilacja $^{14}CO_2$ wykazywała typową zależność od stężeń CO_2 i O_2 . W zakresie stężeń 0,01—0,1% CO_2 obserwowano wyraźny efekt Warburga, a przy zawartości 1% CO_2 w atmosferze proces ten praktycznie nie zależał od stężenia O_2 (Ryc. 6A). Największe gromadzenie się glikolanu w liściach (Ryc. 6B) i włączanie asymilowanego ^{14}C do tego metabolitu (Ryc. 6C) miało miejsce przy stężeniach 0,03% CO_2 i 21% O_2 . Potwierdza to, że atmosferyczne stężenia tych gazów stwarzają najlepsze warunki dla funkcjonowania szlaku kwasu glikolowego *in vivo*. Wprawdzie przy obniżonym stężeniu CO_2 w kwasie glikolowym odnajdywano jeszcze nieco większy procent asymilowanego ^{14}C , to jednak przy tym malała bezwzględna ilość wytwarzanego ^{14}C -glikolanu (Ryc. 6C).



Ryc. 6. Asymilacja ^{14}C CO₂ (A), gromadzenie się kwasu glikolowego (B) i włączenie asymilowanego ^{14}C do kwasu glikolowego w liściach fasoli przy różnych stężeniach dwutlenku węgla i tlenu (47).

Liście pobierały roztwór 10⁻⁴ M α-HPMS. Liniami pionowymi oznaczono błąd standardowy średniej.

Tabela 1.

Radioaktywny węgiel włączony do kwasu glikolowego w liściach fasoli podczas asymilacji ^{14}C przy różnych stężeniach CO_2 i O_2 (47).

Stężenie O_2 (%)	% całkowitej ilości ^{14}C związanego w fotosyntezie			
	Stężenie CO_2 (%)			
	1	0,1	0,03	0,01
2	1,16	2,00	4,60	5,90
21	1,20	3,30	23,00	27,80
100	1,30	2,80	16,40	16,30

Liście pobierały roztwór 10^{-2} M α -HPMS; czas asymilacji ^{14}C wynosił 30 min. Średnie wyniki 6 pomiarów.

Wyniki przedstawione na rycinach 6A, 6B i 6C oraz zamieszczone w tabeli 2 wskazują, że w zależności od aktualnych stężeń CO_2 i O_2 do wytwarzania kwasu glikolowego podczas fotosyntezy są wykorzystywane różne źródła węgla. Przy stosunku stężeń CO_2/O_2 takim jak w naturalnej atmosferze lub wyższym, to jest w warunkach korzystnych dla asymilacji $^{14}\text{CO}_2$ (Ryc. 6A), gromadzenie się glikolanu w liściach (Ryc. 6B) odpowiadało włączaniu ^{14}C do tego związku (Ryc. 6C). W takich warunkach radioaktywność właściwa atomów węgla w cząsteczce kwasu glikolowego była zbliżona do radioaktywności właściwej asymilowanego $^{14}\text{CO}_2$ (Tab. 2). Natomiast przy wartościach stosunku CO_2/O_2 niższych od atmosferycznego, które sprzyjają oksygenacji RuBP, gromadzenie się glikolanu w liściach przeważało nad włączaniem ^{14}C do glikolanu. Tym samym, produkt ten wykazywał znacznie obniżoną radioaktywność właściwą.

Przytoczone wyniki świadczą, że przy niekorzystnym dla fotosyntezy stosunku stężeń CO_2/O_2 , w wytwarzaniu glikolanu, jego prekursorów i produktów przemian, uczestniczą uprzednio nagromadzone w komórkach liści związki. Wytwarzanie RuBP ze związków zapasowych zostało wykazane bezpośrednio w doświadczeniach z izolowanymi chloroplastami (55).

Tabela 2.

Stosunek radioaktywności właściwej atomów węgla kwasu glikolowego nagromadzonego w liściach fasoli do radioaktywności właściwej $^{14}\text{CO}_2$ asymilowanego przy różnych stężeniach CO_2 i O_2 (47).

Stężenie O_2 (%)	Stosunek radioaktywności właściwych			
	Stężenie CO_2 (%)			
	1	0,1	0,03	0,01
2	0,81	0,95	0,97	0,37
21	0,85	1,06	1,00	0,27
100	0,86	0,96	0,44	0,21

Objaśnienia jak przy tabeli 1.

VI. Działanie tlenu przy podwyższonym stężeniu CO₂ i intensywnym świetle

W warunkach podwyższonego stężenia CO₂ i intensywnego oświetlenia zmiana stężenia O₂ z około 0,5—2% na 21%, zamiast hamowania, może powodować zwiększenie natężenia fotosyntezy. Ma to miejsce jedynie wtedy, gdy aparat fotosyntetyczny jest w pełni rozwinięty i ma dużą aktywność. Zjawisko to nie jest na pewno powodowane wpływem O₂ na stan aparatów szparkowych liści (60-64), było bowiem stwierdzane nie tylko w doświadczeniach z całymi liśćmi roślin różnych gatunków C₃ (60-63, 65-71) lecz również w doświadczeniach z izolowanymi chloroplastami (71). Dotychczas nie udało się rozstrzygnąć czy jest ono tylko krótkotrwałym efektem przejściowym (69, 70) czy zmianą trwałą (61, 66).

Hipoteza tłumacząca stymulację fotosyntezy przez tlen zwiększonym odtwarzaniem RuBP jest ogólnie akceptowana (60, 65). Według jej założeń, w warunkach nadmiaru CO₂ i energii świetlnej oraz niskich stężeń O₂, fotosyntezę ogranicza regeneracja NADP w procesie redukcji PGA. Konsekwencją wysokiego poziomu NADPH jest hamowanie wytwarzania ATP w fosforylacji niecyklicznej, co z kolei hamuje odtwarzanie RuBP. W takich warunkach podwyższenie stężenia O₂ umożliwia syntezę dodatkowych ilości ATP na drodze fosforylacji pseudocyklicznej (72, 73) lub fosforylacji cyklicznej (74, 75) i w ten sposób wzmacnia odtwarzanie RuBP i asymilację CO₂. Hipotezę tę potwierdzają dane wskazujące, że stężenie 21% O₂ jest zbliżone do optymalnego dla odtwarzania RuBP w procesie fotosyntezy (69).

Nasuwa się jednak przypuszczenie, że jedną z przyczyn stymulowania przez tlen fotosyntezy, tak jak efektu Warburga, mogą być wzmożone przemiany asymilowanego węgla w szlaku kwasu glikolowego, który funkcjonuje nawet przy znacznie podwyższonych stężeniach CO₂ (36—38). Przemiany te, związane z odpływem asymilatów z chloroplastów do cytoplazmy oraz peroksyosomów i mitochondriów, przy nadmiarze CO₂ i energii świetlnej mogą wpływać pozytywnie na natężenie fotosyntezy.

VII. Fizjologiczne znaczenie działania tlenu w procesie fotosyntezy

We wcześniejszych pracach procesy wytwarzania i przemian kwasu glikolowego traktowano wyłącznie jako biologicznie niekorzystną konsekwencję występowania 21% O₂ w atmosferze ziemskiej (76). Zwracano uwagę na związaną z nimi stratę znacznej części asymilowanego węgla, wyrażającą się obniżeniem natężenia asymilacji CO₂ netto (77) oraz wydajności kwantowej fotosyntezy (78, 79). Spodziewano się też osiągnięcia praktycznych korzyści z ograniczenia lub całkowitej ich eliminacji metodami chemicznymi lub genetycznymi u uprawnych roślin C₃ (77, 80). Ocze-

kiwania takie uzasadniało występowanie intensywniejszej fotosyntezy i większej produkcji biomasy u roślin C₄, u których nie ma zewnętrznych przejawów fotooddychania.

Najbardziej skuteczną drogą do osiągnięcia takiego celu wydawało się znalezienie sposobów umożliwiających zmianę stosunku obu aktywności karboksylazy/oksygenazy RuBP, głównego enzymu regulacyjnego cyklu Calvina i fotooddychania. Doniesiono o odmiennym wpływie na nie szeregu czynników chemicznych. W większości badań aktywności enzymu były jednak oznaczane oddzielnie i w różnych warunkach, co stawia pod znakiem zapytania wyciągane na ich podstawie wnioski (10). Możliwość taką potwierdza natomiast selektywne hamowanie oksygenazy RuBP *in vitro* przez hydroksylaminę, wytwarzaną w liściach jako pośredni produkt redukcji jonów azotanowych (81) oraz odmienny wpływ na obie aktywności enzymu jonów Mn²⁺ (82). U krzyżówek *Nicotiana* stwierdzono także zmiany stosunku tych aktywności spowodowane różnym składem podjednostkowym enzymu (83). Znaleziono związki dość specyficznie hamujące wytwarzanie (49, 57) i przemiany (50, 83—89) kwasu glikolowego. Doniesienia o równoczesnym wzmaganiu fotosyntezy przez niektóre z tych związków (49, 50, 54, 84) nie zostały jednak potwierdzone, co sugeruje, że efekt taki może zaistnieć tylko w szczególnych warunkach doświadczalnych. Użytkano mutanty pozbawione niektórych enzymów szlaku kwasu glikolowego. Okazały się one jednak niezdolne do wegetacji w środowisku zawierającym tlen (90—93).

Obecnie coraz bardziej uzasadniony staje się pogląd, że funkcjonowanie szlaku kwasu glikolowego jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju rośliny w środowisku naturalnym (4, 19, 35, 53, 79, 94, 95).

Przemiany kwasu glikolowego, który może być także wytwarzany z nagromadzonych w komórkach liści materiałów zapasowych, stanowią wewnętrzne źródło CO₂. Przy zahamowanym dopływie CO₂ z zewnętrznej atmosfery (np. przez zamknięcie się aparatów szparkowych wskutek deficytu wodnego) przemiany te zapewniają funkcjonowanie fotosyntezy i wytwarzanie wszystkich jej pośrednich produktów. Mogą też stanowić dodatkową drogę odpływu nadmiaru energii fotochemicznej i w ten sposób zabezpieczać centra aktywne fotoukładów przed świetlną inaktywacją (19, 34, 96—99). Wykazano bowiem, że podczas oświetlania liści w stężeniu CO₂ kompensacyjnym, reasymilacja wytwarzanego w fotooddychaniu CO₂ zużywa aż około połowy tej ilości ATP i NADPH jaka jest niezbędna dla fotosyntezy o normalnym natężeniu (19, 100). Przy niskich stężeniach CO₂ natężenie fotosyntezy całkowitej, obliczone jako suma oznaczonych wartości fotosyntezy netto i fotooddychania, może być przy stężeniu 21% O₂ — w warunkach sprzyjających wytwarzaniu CO₂ na światło — nawet wyższe niż w atmosferze pozbawionej tlenu (97).

Działanie O₂ jest związane z transportem związków węgla pomiędzy chloroplastami i cytoplazmą oraz innymi organellami. Wysunięto hipotezę,

ze jedną z funkcji szlaku kwasu glikolowego jest odprowadzanie asymilowanego węgla z chloroplastów do miejsc syntezy sacharozy (25, 101—103).

Kwas glikolowy wytwarzany w wyniku działania tlenu może być donorem elektronów dla fotosystemu I gdy ograniczony lub zahamowany jest normalny przepływ elektronów pomiędzy fotosystemami (104—109). Utleńnianie glikolanu może też dostarczać NADH dla redukcji azotanów w liściach (25, 110). Jedną z branych pod uwagę funkcji szlaku kwasu glikolowego jest ewentualne hamowanie cyklu kwasów trójkarboksylowych w fotosyntetyzujących komórkach przez wytwarzanie w ich mitochondriach NADH w reakcji przekształcania glicyny w serynę (19).

Chociaż żadna z tych hipotetycznych funkcji nie została dotąd potwierdzona w chwili obecnej nie ma wątpliwości, że przebiegające z udziałem O_2 reakcje wytwarzania i przemian kwasu glikolowego stanowią element regulacji fotosyntezy i procesów z nią związanych. Jest oczywiste, że szlak kwasu glikolowego, tak jak inne biochemiczne mechanizmy będące wyrazem przystosowania fotosyntezy do niekorzystnych warunków środowiskowych (np. szlak C_4 oraz występujący u roślin gruboszowatych), wymaga dodatkowego zużycia energii. Doświadczalnie wykazano, że fotooddychanie podwyższa kwantowe zapotrzebowanie fotosyntezy o około 30% (19, 78, 79). Biorąc jednak pod uwagę to, że w uprawach polowych rośliny wykorzystują zaledwie około 1% padającego na liście fotosyntetycznie aktywnego promieniowania słonecznego (79) należy sądzić, że podwyższenie to nie ma praktycznie znaczenia dla produkcji masy roślinnej, a osiągnięte ewolucyjnie z tego procesu korzyści przeważają nad stratami z nim związanymi.

Część badań przedstawionych w artykule wykonano w ramach problemu międzyresortowego MR.II.7.

Zaakceptowano do druku 15.03.1984

PIŚMIENNICTWO

1. Poskuta J., (1979), *Wiadom. Bot.*, **14**, 43—54.
2. Kaniuga Z., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 247—305.
3. Kaniuga Z., (1977), *Zesz. Nauk. Univ. Jagiell.*, **464**, 75—86.
4. Maleszewski S., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 379—402.
5. Bytniewska K., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 333—346.
6. Johal S., Chollet R., (1980), *What's New in Plant Physiol.*, **11**, 45—48.
7. Branden R., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 539—546.
8. Ku M. S., Schmitt M. R., Edwards G. E., (1979), *J. Exp. Bot.*, **30**, 89—98.
9. Murray R., Badger M., Lorimer G. H., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 723—729.
10. Jordan D. B., Ogren W. L., (1981), *Plant Physiol.*, **67**, 237—245.
11. Jensen R. G., (1977), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 379—400.
12. Berry J. A., Osmond C. B., (1978), *Plant Physiol.*, **62**, 954—967.

13. Lorimer G. H., Krause G. H., Berry J. A., (1977), *FEBS Lett.*, **78**, 199—202.
14. Lorimer G. H., Osmond C. B., Akazawa T., Asami S., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**, 49—56.
15. Takabe T., Osmond C. B., Summons R. E., Akazawa T., (1979), *Plant Cell Physiol.*, **20**, 233—241.
16. Shain Y., Gibbs M., (1971), *Plant Physiol.*, **48**, 325—330.
17. Eickenbush I. D., Scheibe R., Beck E., (1975), *Z. Pflanzenphysiol.*, **75**, 375—380.
18. Tolbert N. E., (1971), w *Photosynthesis and Photorespiration*, red. Hatch M. D., Osmond C. B., Slayter R. O., str. 458—471, Wiley-Interscience, New York.
19. Osmond C. B., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **639**, 77—98.
20. Bird J. F., Keys A. J., Whittingham C. P., (1972), w *Proc. of the IInd International Congress on Photosyn. Res.*, **3**, str. 2215—2224, red. Forti G., Avron M., Melandri A., Dr. W. Junk N. V. Publ., the Hague.
21. Vill J., Pärnik T., (1978), *Z. Pflanzenphysiol.*, **88**, 219—226.
22. Kisaki T., Yano N., Hirabayashi S., (1972), *Plant Cell Physiol.*, **13**, 581—584.
23. Kamińska Z., (1981), *Praca doktorska*, Univ. Warszawski, Wyd. Biol.
24. Servaites J. C., Ogren W. L., (1978), *Plant Physiol.*, **61**, 62—67.
25. Tolbert N. E., (1979), w *Encyklopedia of Plant Physiology*, New Series, red. Gibbs M., Latzko E., t. 6, str. 338—351, Springer-Verlag, New York.
26. Oliver D. I., (1979), *Plant Science Letters*, **15**, 35—40.
27. Canvin D. T., (1979), w *Encyklopedia of Plant Physiology*, New Series, red. Gibbs M., Latzko E., t. 6, str. 368—396, Springer-Verlag, New York.
28. Poskuta J., (1971), w *Proc. of the IInd International Congress on Photosynth. Res.*, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 3, str. 2121—2127, Dr. W. Junk N. V. Publ., the Hague.
29. Fock H., Klug K., Krampitz M. J., (1978), *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **91**, 539—549.
30. Gerbaud A., Andre M., (1979), *Plant Physiol.*, **64**, 735—738.
31. Vill J., Pärnik T., (1979), *Z. Pflanzenphysiol.*, **95**, 213—225.
32. Voskresenskaya N. P., Vill J., Grishina G. S., Pärnik T. R., (1970), *Photosynthetica*, **4**, 1—8.
33. Fock H., Höhler T., Canvin D. T., Grant B. R., (1971), w *Proc. IInd International Congress on Photosynthesis Res.*, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 3, str. 1883, 1892, Dr. W. Junk N. V. Publ. the Hague.
34. Osmond C. B., Björkman O., (1972), w *Carnegie Inst. Washington Yb.*, **71**, 141—148.
35. Chollet R., Ogren W. L., (1975), *Botanical Review* **41**, 137—179.
36. Fock H., Przybylla K. R., (1976), *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **89**, 643—650.
37. Bravdo Ben-Ami, Canvin D., (1979), *Plant Physiol.*, **63**, 399—401.
38. Keerberg O., Keerberg H., Pärnik T., Vill J., Värk E., (1983), *Int. J. Appl. Radiat. Isotop.*, **34**, 861—864.
39. Beck E., (1979), w *Encyklopedia of Plant Physiology*, New Series, red. Gibbs M., Latzko E., t. 6, str. 328—337, Springer-Verlag, N.Y.
40. Gao Kao Yu-zhu, Wang Zong, (1982), *Acta Phytophysiological Sinica*, **8**, 373—384.
41. Maciejewska U., Maleszewski S., Kacperska-Palacz A., (1974), *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, **22**, 513—517.
42. Sosińska A., Maleszewski S., Kacperska-Palacz A., (1977), *Z. Pflanzenphysiol.*, **83**, 285—292.

43. Sosińska A., Maleszewski S., (1982), *Z. Pflanzephysiol.*, **108**, 397—399.
44. Bystrzejewska G., (1980), Praca doktorska, Wyd. Biol., UW.
45. Kamińska Z., Bystrzejewska G., Gan M., Maleszewski S., (1983), *Physiol. Vegetale* **21**, 4.
46. Kamińska Z., Gutkowski R., Maleszewski S., (1979), *Z. Pflanzephysiol* **91**, 17—24.
47. Kamińska Z., Maleszewski S., (1980), *Photosynthesis Research* **1**, 45—51.
48. Kamińska Z., Maleszewski S., (1982), *Z. Pflanzenphysiol.*, **108**, 201—206.
49. Zelitch I., (1979), w *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, t. 6, str. 353—365, red. Gibbs M., Latzko E., Springer-Verlag, N.Y.
50. Pritchard G. G., Griffin W. I., Whittingham C. P., (1962), *J. Exp. Bot.*, **13**, 176—184.
51. Burris J. E., Holm-Hansen O., Black C., (1976), *Aust. J. Plant Physiol.*, **3**, 87—92.
52. Platt S. G., Plaut Z., Bassham J. A., (1977), *Plant Physiol.*, **60**, 230—234.
53. Chapman D. J., Leech R. M., (1976), *FEBS Lett.*, **68**, 160—164.
54. Daley L. S., Bidwell G. S., (1977), *Plant Physiol.*, **60**, 109—114.
55. Sicher R. C., Jansen R. G., (1979), *Plant Physiol.*, **64**, 880—883.
56. Agrawal P. K., Fock H., (1978), *Planta*, **138**, 257—261.
57. Zelitch I., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 367—377.
58. Lewanty Z., Maleszewski S., (1976), *Planta*, **131**, 121—123.
59. Ludwig L. J., Canvin D. T., (1971), *Plant Physiol.*, **48**, 712—719.
60. Vill J., Laisk A., Oja V., Pärnik T., (1977), *Photosynthetica*, **11**, 251—259.
61. Cornic G., Louason G., (1980), *Plant, Cell and Environment* **3**, 149—157.
62. Bull T. A., (1968), *Crop. Cci.*, **9**, 726—729.
63. Meidner H., Mansfield T. A., (1968), *Physiology of stomata*, McGraw-Hill, New York.
64. Gauhl E., Björkman O., (1969), *Planta*, **88**, 187—191.
65. Vill Y., Laisk A., Oya V., Pärnik T., (1972), *Dok. Akad. Nauk SSSR*, **204**, 1269—1271.
66. Jolliffe P. A., Treguna E. B., (1973), *Can. J. Bot.*, **51**, 841—853.
67. Vill J., Pärnik T., (1974), *Photosynthetica*, **8**, 208—215.
68. Miyachi S., Okabe K., (1976), *Plant Cell Physiol.*, **17**, 973—986.
69. Canvin D. T., (1978), w *Photosynthetic Carbon Assimilation*, red. Siegelman H. W., Hind G., str. 61—67, Plenum Press, New York.
70. McVetty P. B. E., Canvin D. T., (1981), *Can. J. Bot.*, **59**, 721—725.
71. Fedina I. S., Vaklinova S. G., (1973), *Doklady Bolgarskoi Akademii Nauk*, **26**, 1681—1684.
72. Heber U., French C. S., (1968), *Planta*, **79**, 99—112.
73. Egneus H., Heber U., Matthiesen, Kirk M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **408**, 252—268.
74. Hind G., Mills J. D., Slovacek R. D., (1978), w *Proc. of the IVth International Congress on Photosynthesis Res.*, red. Hall D. O., Coombs J., Goodwin T. W., str. 591—600, London: Biochem. Soc.
75. Heber U., Egneus H., Hanck U., Jensen M., Koster S., (1978), *Planta*, **143**, 41—49.
76. Lorimer G. H., Andrews T. J., Tolbert N. E., (1973), *Biochemistry*, **12**, 18—23.
77. Zelitch I., (1971), *Photosynthesis, Photorespiration and Plant Productivity*, str. 347, Academic Press, New York.

78. Campbell W. H., Black C. C., (1978), *BioSystems*, **10**, 253—264.
79. Maleszewski St., Bystrzejewska G., (1981), *Postępy Biologii Komórki*, **8**, 211—225.
80. Zelitch I., (1975), *Science*, **188**, 626—633.
81. Kei-Ichoro Okabe, Codd G. A., Stewart W. D. P., (1979), *Nature*, **279**, 525—527.
82. Christeller J. T., Laing W. A., (1979), *Biochem. J.*, **183**, 747—750.
83. Rhodes P. R., Shain-Dow Kung, Marsho T. V., (1980), *Plant Physiol.*, **65**, 69—73.
84. Zelitch I., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 1623—1631.
85. Jewess P. J., Kerr M. W., Whitaker D. P., (1975), *FEBS Lett.*, **53**, 292—296.
86. Kumarasinghe K. S., Keys A. J., Whittingham C. P., (1977), *J. Exp. Bot.*, **28**, 1163—1168.
87. Servaites J. C., Ogren W. L., (1977), *Plant Physiol.*, **60**, 461—466.
88. Creach E., Stewart C. R., (1982), *Plant Physiol.*, **70**, 1444—1448.
89. Jenkins C. L., Rogers L. J., Kerr M. W., (1983), *Phytochemistry* **22**, 19—23.
90. Somerville C. R., Ogren W. L., (1982), w *Methods in chloroplasts molecular biology*, red. Edelman et al., str. 129, Elsevier Biomedical Press.
91. Somerville C. R., Ogren W. L., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2684—2687.
92. Somerville C. R., Ogren W. L., (1981), *Plant Physiol.*, **67**, 666—671.
93. Somerville C. R., Ogren W. L., (1982), *Trends in Biochemical Sciences*, **7**, 171—174.
94. Goldsworthy A., (1970), *The Botanical Review*, **36**, 321—340.
95. Zelitch I., (1979), *Chemical and Engineering News*, **57**, 28—48.
96. Krause G. H., Lorimer G. H., Heber U., Kirk M. R., (1978), w *Proc. IV Int. Congr. Photosynthesis*, red. Hall D. O., Coombs J., Goodwin T. W., str. 299—310, London: Biochem. Soc.
97. Hanson D. A., Nelson C. E., (1978), *Plant Physiol.*, **62**, 305—312.
98. Tenhunen J. D., Weber J. A., Yocum C. S., Gares D. M., (1979), *Plant Physiol.*, **63**, 916—923.
99. Powles S. B., Osmond C. B., (1979), *Plant Physiol.*, **64**, 982—988.
100. Osmond C. B., Winter K., Powles S. B., (1980), w *Plant Responses to Water and High Temperature Stress*, red. Turner N. T., Kramer P. J., str. 139—154, John Wiley, New York.
101. Waidyanatha U. P., Keys A. J., Whittingham C. P., (1975), *J. Exp. Bot.*, **28**, 1247—1257.
102. Kumarasinghe K. S., Keys A. J., Whittingham C. P., (1977), *J. Exp. Bot.*, **28**, 1247—1257.
103. Champigny M. L., Moyse A., (1979), *Plant Cell Physiol.*, **20**, 1167—1178.
104. Sörensen L., Halldal P., (1977), *Photochem. Photobiol.*, **26**, 511—518.
105. Sörensen L., Holmen A. T., Halldal P., (1978), *Physiol. Plant.*, **42**, 425—427.
106. Halldal P., Holmen A. T., (1979), *Physiol. Plant.*, **47**, 195—199.
107. Halldal P., Holmen A. T., (1979), *Plant Cell Physiol.*, **20**, 757—763.
108. Nilsen S., Haugstad M., Holmen A. T., (1979), *Physiol. Plant.*, **47**, 19—24.
109. Tillberg E., (1980), *Physiol. Plant.*, **50**, 158—160.
110. Lips S. H., (1971), w *Proc. of the IInd International Congress on Photosynth. Res.*, red. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 3, str. 2241—2249, Dr W. Junk N. V., Publ., the Hague.

Udział mono- i oligomerycznych form karotenoidów w przekazywaniu energii wzbudzenia elektronowego w układach modelowych

Participation of the mono- and oligomeric forms of carotenoids in the transfer of electronic excitation energy in model systems

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Agregacja karotenoidów w układzie *in vitro*
 - II-1. Agregacja karotenoidów w uwodnionych rozpuszczalnikach organicznych
 - II-2. Charakterystyka spektralna karotenoidów w warstwach monomolekularnych
 - II-3. Agregacja karotenoidów w dwuwarstwowych błonach lipidowych
 - II-4. Budowa zagregowanych form karotenoidów
- III. Przekazywanie energii wzbudzenia elektronowego z udziałem karotenoidów
 - III-1. Tworzenie trypletowych stanów wzbudzonych karotenoidów
 - III-2. Ochronna rola karotenoidów
 - III-3. Mechanizm dezaktywacji wzbudzonych stanów trypletowych karotenoidów
 - III-4. Przekazywanie energii z udziałem wzbudzonego stanu singletowego karotenoidów
 - III-5. Mechanizm przenoszenia energii wzbudzenia elektronowego z karotenoidów na chlorofil
- IV. Podsumowanie

Contents

- I. Introduction
- II. Aggregation of the carotenoids in model systems
 - II-1. Aggregation of the carotenoids in aqueous organic solvents
 - II-2. Optical properties of carotenoids in monolayers
 - II-3. Aggregation of the carotenoid in liposomes or detergent micelles
 - II-4. The structure of the carotenoid aggregates
- III. Participation of the carotenoid in the transfer of electronic excitation energy
 - III-1. The formation of the excited triplet state of carotenoids
 - III-2. Protection function of carotenoids

*) Mgr, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków.

Wykaz stosowanych skrótów: Car - karotenoid w stanie podstawowym, Car* — karotenoid w stanie wzbudzony, T-trypletowy stan wzbudzony, S — singletowy stan wzbudzony, Chl - chlorofil, N - naftalen.

III-3. The mechanism of quenching of the carotenoid triplet states

III-4. Energy transfer from singlet excitation state of carotenoids

III-5. The mechanism of singlet-singlet excitation energy transfer from carotenoids to chlorophyll

IV. Summary

I. Wstęp

Wyniki badań wykonanych w układach modelowych pozwalają lepiej zrozumieć budowę i funkcję barwników fotosyntetycznych *in vivo*. Indukowane zmiany własności fizykochemicznych barwników fotosyntetycznych otrzymane przez odpowiedni dobór parametrów układu modelowego miały przypominać analogiczne zmiany zachodzące w błonach tylakoidów. Właściwości i funkcja barwników chlorofilowych i karotenoidowych zależą w dużej mierze od ich oddziaływań z najbliższym otoczeniem. Spośród wielu teoretycznie możliwych typów oddziaływań między cząsteczkami barwników fotosyntetycznych a określonymi składnikami lameli chloroplastów najlepiej poznano oddziaływania między różnymi cząsteczkami chlorofilu prowadzące do powstania dimerów lub oligomerów (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). W badaniach tych wyjaśniono nie tylko budowę agregatów, ale także rolę form oligomerycznych chlorofilu w przenoszeniu energii wzbudzenia elektronowego.

Dotychczas nie udało się stworzyć podobnego układu modelowego, który wyjaśniałby różnice we własnościach barwników karotenoidowych występujących w antenach i centrach reakcji. Najwięcej kontrowersji wzbudza wciąż budowa formy natywnej tych barwników, a zwłaszcza możliwość ich połączenia z białkami i lipidami oraz agregacji. Prowadzone są także intensywne badania mechanizmów przekazywania energii wzbudzenia elektronowego na poziomie stanów singletowych i trypletowych z udziałem karotenoidów. Mają one na celu wyjaśnienie antenowej i ochronnej funkcji karotenoidów *in vivo*.*)

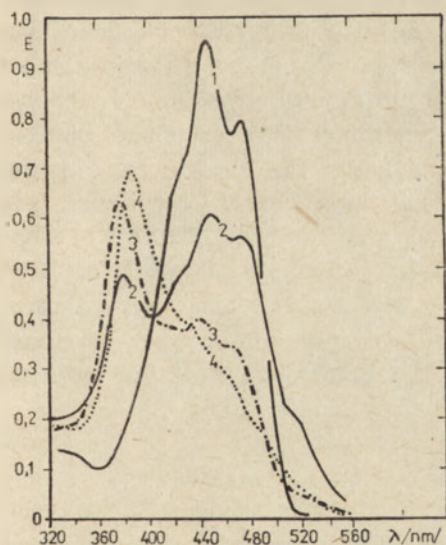
II. Agregacja karotenoidów w układach modelowych

Proces agregacji barwników karotenoidowych rejestruje się oznaczając zmiany w widmach absorpcyjnych i dichroizmu kołowego oraz rezonansowego efektu Ramana. Charakterystyka spektralna zagregowanej formy określonego karotenoidu nie zależy od układu w którym ona powstała, chociaż obecność chlorofilu lub innych związków może spowodować zahamowanie procesu agregacji.

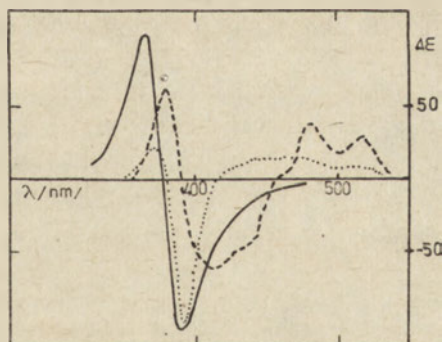
*) Aktualny stan wiedzy o funkcji karotenoidów w obrębie aparatu fotosyntetycznego opisano w „Postęпах Biochemii” (9a).

II-1. Agregacja karotenoidów w uwodnionych rozpuszczalnikach organicznych

Widma absorpcyjne lycopenu oraz karotenoidów z grupami karbonylowymi (luteina, zeaksantyna, neoksantyna, wiolaksantyna) ulegają charakterystycznym zmianom przy stopniowym zwiększaniu zawartości wody w roztworze etanolewym, metanolewym, acetonowym lub izopropanolowym (10, 11, 12). Zmiany te polegają na zanikaniu struktury wibracyjnej widma absorpcyjnego oraz jego przesunięciu z regionu charakterystycznego dla karotenoidów w rozpuszczalnikach organicznych w kierunku fal krótszych (Ryc. 1). Ponieważ zmiany te są odwracalne uważa się, że dodanie wody powoduje odwracalną agregację cząsteczek barwnika (10). Podczas procesu agregacji wymienionych karotenoidów zachodzą także zmiany w widmie dichroizmu kołowego (Ryc. 2). Podwyższenie temperatury lub dodanie detergentu (Triton X-100, Tween 80) do roztworu etanolo-wodnego luteiny powoduje zanik szczytu w części krótkofalowej widma absorpcyjnego i spadek sygnału dichroizmu kołowego co może sugerować, że wzrost oddziaływań hydrofobowych odpowiedzialny jest za stabilizację agregatów (13). Porównując rezonansowy efekt Ramana roztworu etanolo-wodnego luteiny lub acetonowódno-zeaksantyny z rezonansowym efektem Ramana tych samych karotenoidów w bezwodnych rozpuszczalnikach organicznych stwierdzono, że dodanie wody prowadzi do przesunięcia pasma 1525 cm^{-1} związanego z drganiami rozciągającymi $\text{C}=\text{C}$, o 6 cm^{-1} w stronę niższych częstości oraz do obniżenia jego względnej intensywno-



Ryc. 1. Wpływ zawartości wody na widma absorpcyjne zeaksantyny w roztworze etanolewym (10): 1 — 2% wody, 2 — 43% wody, 3 — 50% wody, 4 — 66% wody



Ryc. 2. Wpływ zawartości wody na widmo dichroizmu kołowego etanolewego roztworu luteiny (13): — 55% wody, ····· 60% wody, - - - 80% wody

ści (12). Zmiany te są prawdopodobnie spowodowane tym, że podczas agregacji zwiększa się udział oddziaływań typu van der Waalsa między cząsteczkami (12).

Wprowadzenie luteiny rozpuszczonej w etanolu do wodnego zbuforowanego (bufor fosforanowy, pH 7,0) roztworu albuminy, owoalbuminy lub β -laktoglobuliny, a następnie oddializowanie rozpuszczalnika organicznego prowadzi do identycznych zmian w widmie absorpcyjnym i dichroizmu kołowego jak w przypadku agregacji barwnika w roztworze etanolowo-wodnym (14, 15). Luteina wiąże się z białkiem tworząc kompleks przy czym stosunek molowy barwnika do białka nie jest stały lecz waha się w granicach 8-35 w zależności od wyjściowych ilości obu składników. Kompleks ten może występować w formie rozpuszczalnej lub w postaci precypitatu. Wzrost ilości dodanej luteiny w stosunku do ilości wyjściowego białka a także obniżenie pH poniżej punktu izoelektrycznego powoduje powstawanie precypitatu (14, 15). Jeżeli stosunek molowy luteiny do owoalbuminy w kompleksie nie wytrąconym jest równy 8, a orientacyjnie wyznaczony ciężar cząsteczkowy wynosi około 720 000 to należy przypuszczać, że cząsteczki białka asocjują w roztworze wodnym i przez to ochraniają związaną luteinę przed kontaktem z wodą a utworzony kompleks jest rozpuszczalny w wodzie (15).

II-2. Własności spektralne karotenoidów w warstwach monomolekularnych

Analizując zmiany widm absorpcyjnych β -karotenu oraz mieszaniny β -karotenu i chlorofilu w monomolekularnej warstwie na powierzchni wody w zależności od stężenia barwników stwierdzono, że β -karoten może występować w tych warstwach w trzech „formach” o maksimach absorpcyjnych: 460 (C460 — forma monomeryczna), 500 i 520 nm (C500, C520 — formy zagregowane lub mikrokrystaliczne) (16, 17). W warstwie monomolekularnej zbudowanej z β -karotenu i chlorofilu w warunkach gdy $\text{Chl/Car} = 3:1$ β -karoten występuje wyłącznie w formie C500 z czego wynika, że chlorofil sprzyja agregacji β -karotenu, ale hamuje tworzenie większych agregatów (17). W monomolekularnej warstwie lecytyny β -karoten (18) lub luteina (19) tworzą tylko formy monomeryczne, co może świadczyć o tym, że w takim układzie fosfolipid jest „idealnym rozpuszczalnikiem” tych barwników.

II-3. Agregacja karotenoidów w dwuwarstwowych błonach lipidowych

Dwa czynniki wpływające na organizację błon lipidowych tzn. stężenie fosfolipidu i temperatura inkubacji w widoczny sposób oddziałują na stopień agregacji wprowadzonych barwników karotenoidowych (20, 21). Widmo absorpcyjne zeaksantyny w liposomach DPPC (dipalmitylofosfatydylocholino) poniżej temperatury topnienia przesuwa się w kierunku

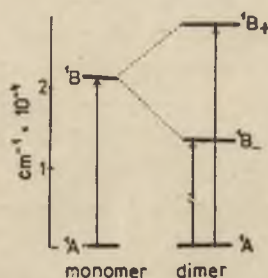
dłuższych fal wraz ze wzrostem stosunku molowego fosfolipidu do karotenoidu, co związane jest z rozpadem agregatów tego barwnika do formy monomerycznej. W liposomach DSPC (distearylofosfatydylocholiny) nie zaobserwowano tego zjawiska (20). Zmiany w widmie absorpcji zeaksantyny lub β -kryptoksantyny związane z przejściem formy zagregowanej do monomerycznej można również indukować w liposomach DSPC lub DPPC podwyższając temperaturę inkubacji powyżej punktu topnienia (20, 21). Proces deagregacji karotenoidów można także śledzić poprzez zmiany rezonansowego efektu Ramana. Stwierdzono, że intensywność pasma 1160 cm^{-1} związanego z drganiami rozciągającymi C—C jest zależna od ilości formy monomerycznej zeaksantyny, a skokowy wzrost intensywności tego pasma pokrywa się z temperaturą topnienia fosfolipidu (20).

II-4. Budowa zagregowanych form karotenoidów

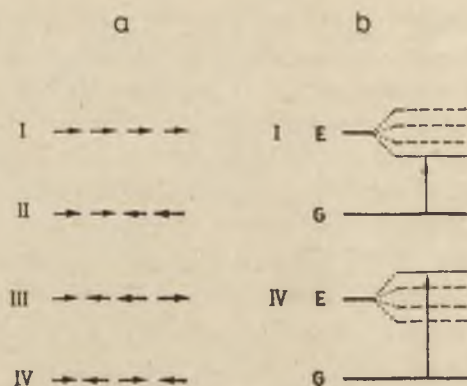
Stosunkowo nieznaczne różnice w rezonansowym efekcie Ramana karotenoidów będących w formie monomerycznej lub zagregowanej mogą świadczyć o tym, że w czasie agregacji zachodzą małe zmiany w elektronowym stanie podstawowym tych barwników. Przesunięcie maksimum absorpcji i zmiana w strukturze wibracyjnej widma absorpcyjnego wskazuje na to, że znaczne oddziaływania między monomerami zachodzą w elektronowym stanie wzbudzonym agregatu (12). Tego typu zmiany można wyjaśnić na podstawie teorii ekscytonu.

Istota wzbudzenia ekscytonowego polega na rozszczepieniu poziomu wzbudzonego monomeru na taką liczbę podpoziomów jaka odpowiada liczbie cząsteczek w agregacie co wynika z oddziaływań momentów dipolowych zagregowanych cząsteczek (22, 23). Badając zmiany widma absorpcyjnego etanolowego roztworu lykopenu po dodaniu wody stwierdzono, że tworzeniu form zagregowanych tego barwnika towarzyszy pojawienie się szczytu w rejonie 350—360 nm (24). Song i Moore (24) uważają, że zmiany te spowodowane są oddziaływaniami ekscytonowymi w dimerach lykopenu, które prowadzą do rozszczepienia pierwszego wzbudzonego poziomu singletowego monomeru (Ryc. 3). Zakładając, że maksimum absorpcji formy monomerycznej przy 472 nm i maksimum absorpcji formy dimerycznej przy 355 nm związane są odpowiednio z przejściami ${}^1B \leftarrow {}^1A$ i ${}^1B_+ \leftarrow {}^1A$ (Ryc. 3) obliczono, że takie rozszczepienie może się pojawić wówczas, gdy odległość między środkami mas dwóch cząsteczek lykopenu będzie równa 7,2 Å. Autorzy ci podkreślają jednak, że wielkość i charakter zmian zależą nie tylko od odległości, ale także od układu geometrycznego cząsteczek w dimerze.

Rozpatrując hipotetyczny linearny układ czterech cząsteczek K a s h a (25) wyróżnił cztery możliwe ułożenia ich indukowanych momentów dipolowych (Ryc. 4A). Zgodnie z regułami wyboru dozwolone przejścia absorpcyjne układu I i IV przedstawia rycina 4B. Z diagramów tych wynika, że



Ryc. 3. Ekscytonowe rozszczepienie pasma ${}^1B \leftarrow {}^1A$ na pasma ${}^1B_+ \leftarrow {}^1A$ i ${}^1B_- \leftarrow {}^1A$ w dimerach lykopenu przy uwzględnieniu oddziaływań typu dipol-dipol; 1A oznacza stan podstawowy, 1B pierwszy singletowy stan wzbudzony monomeru (24).



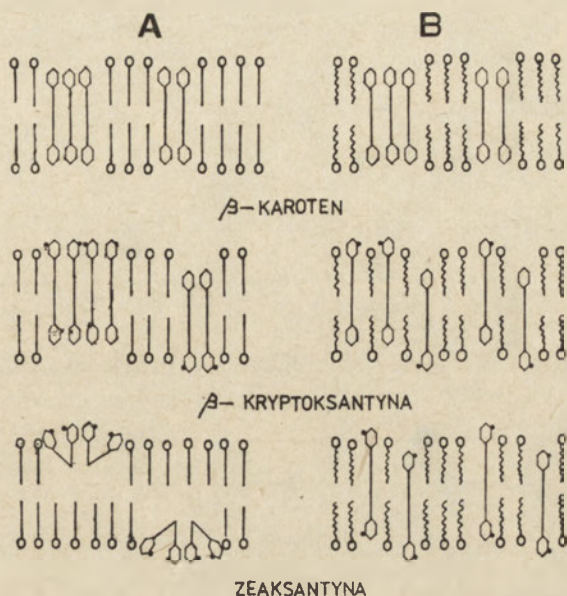
Ryc. 4. A) ułożenie indukowanych światłem momentów dipolowych w hipotetycznym agregacie składającym się z czterech liniowo ułożonych cząsteczek (25), B) reguły wyboru dla przejść powstałych w wyniku ekscytonowego rozszczepienia poziomu wzbudzenia (E) w liniarnych agregatach oznaczonych jako I i IV na Ryc. 4A (25).

w układzie I (ang. *head-to-tail*) nastąpi przesunięcie widma absorpcyjnego agregatów w stronę fal dłuższych, natomiast w układzie IV (ang. *card-pack*) w stronę fal krótszych w porównaniu z widmami absorpcyjnymi monomerów. Drugi z wspomnianych układów możnaby uważać za model agregacji ksantofili w przyjętej konwencji.

Zakładając, że agregaty barwników mają strukturę pseudokrystaliczną i indukowane momenty dipolowe monomerów leżą w płaszczyźnie agregatu to w wyniku agregacji powinno nastąpić przesunięcie widma absorpcji w stronę fal dłuższych. Natomiast jeżeli momenty te są ułożone prostopadle do płaszczyzny agregacji to powinno nastąpić przesunięcie widma absorpcyjnego w stronę fal krótszych (23, 26). Obserwowanie tego zjawiska jest możliwe przy odpowiedniej orientacji wektora elektrycznego światła wzbudzającego względem płaszczyzny agregacji. Interpretacja widm adsorpcyjnych agregatów nie jest jednak prosta, nawet przy założeniu, że mają one budowę pseudokrystaliczną, ponieważ wielkość i kształt agregatu wywierają także wpływ na charakter widma absorpcyjnego (27).

Oprócz widm absorpcyjnych i zmian rezonansowego efektu Ramana różnice w natężeniu luminescencji są również wykorzystywane w badaniach procesów agregacji barwników. Z rozważań teoretycznych (28) wynika, że powinny występować zmiany w kwantowej wydajności fluorescencji i fosforescencji na skutek przejścia form monomerycznych w formy zagregowane. Metoda ta nie jest jednak wykorzystana w badaniach struktury zagregowanych karotenoidów, ponieważ barwniki te nie wykazują mierzalnej fluorescencji i fosforescencji (24).

Badając zależne od temperatury zmiany w widmach absorpcji karotenoidów w liposomach Yamamoto (21) zaproponował model organizacji karotenoidów w błonach lipidowych będących w stanie żelu lub ciekłego kryształu (Ryc. 5). Wysłunięto jednak wiele zastrzeżeń do tego



Ryc. 5. Model organizacji karotenoidów w podwójnej warstwie lipidowej w stanie A) żelu, B) ciekło-kryształicznym. Ciemne kółka oznaczają grupy hydroksylowe (21).

modelu. Na przykład wyniki badań nad rozmieszczeniem β -karotenu w podwójnej warstwie lipidowej będącej w stanie ciekło-kryształicznym wskazują na to, że niezależnie od grubości błony β -karoten nie penetruje w głąb lecz orientuje się dłuższą osią prostopadle do łańcuchów kwasów tłuszczowych lipidu (29). Ponadto agregacja zeaksantyny nie jest prawdopodobnie związana z równoczesną izomeryzacją tego barwnika (12, 20) jak to wynikałoby z założeń proponowanego modelu (Ryc. 5).

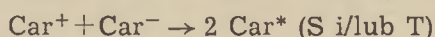
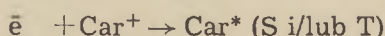
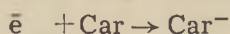
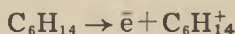
III. Przekazywanie energii wzbudzenia elektronowego z udziałem karotenoidów

III-1. Tworzenie trypletowych stanów wzbudzonych karotenoidów

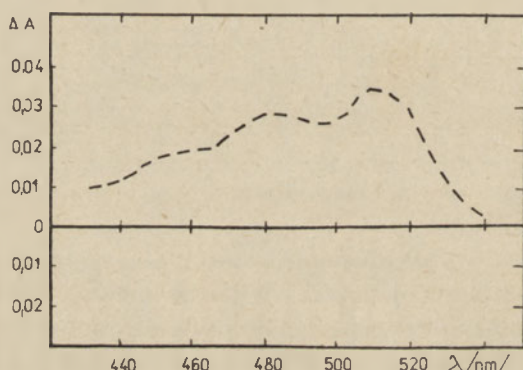
Oświetlenie karotenoidów w rozpuszczalnikach organicznych prowadzi do powstania wzbudzonych stanów singletowych tych barwników. Nie wykrywa się w tych warunkach trypletowych stanów wzbudzonych ze względu na niską wydajność przejścia międzysystemowego $S \rightarrow T$ i krótki czas życia pierwszego wzbudzonego stanu singletowego (24, 30). Wzbudze-

nie karotenoidów do stanów trypletowych jest możliwe przy zastosowaniu techniki błyskowej radiolizy lub fotolizy (30, 31, 32, 33, 34).

Metoda błyskowej radiolizy pozwala na wzbudzenie karotenoidów do stanów trypletowych bez udziału specjalnych uczulaczy. W przypadku błyskowej radiolizy β -karotenu w n-heksanie mają zachodzić następujące reakcje prowadzące do powstania wzbudzonych stanów trypletowych barwnika (30):



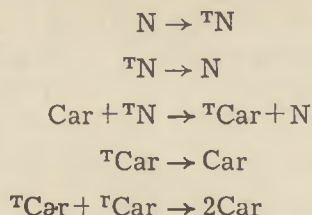
Zmiany w widmie absorpcyjnym związane z przejściem T—T β -karotenu w n-heksanie po naświetleniu błyskiem 50—100 ns, dawką 1—2 kradów przedstawiono na rycinie 6. Technika ta pozwala na bezpośredni pomiar



Ryc. 6. Zmiany w widmie absorpcyjnym związane z przejściem T—T β -karotenu w n-heksanie po naświetleniu błyskiem 50—100 ns dawką 1—2 kradów z uwzględnieniem zaniku wzbudzonego stanu singletowego (30).

czasu życia trypletowego stanu wzbudzonego karotenoidów; czas ten w przypadku β -karotenu wynosi 8 μs (30), a w przypadku innych karotenoidów mieści się w granicach 3,4–9,4 μs (Tabela 1). Stwierdzono również, że czas życia wzbudzonego stanu trypletowego karotenoidów maleje wraz ze wzrostem liczby wiązań podwójnych w cząsteczce (31).

Stosując radiolizę lub fotolizę błyskową karotenoidów w obecności uczulacza (naftalen, antracen, bifenyl) obserwuje się przekazywanie energii wzbudzenia elektronowego ze stanu trypletowego sensibilizatora na cząsteczkę karotenoidów. W benzenowym roztworze β -karotenu i 0,01M naftalenu pulsowe naświetlenie (10 μs) dawką 7,6 kradów wywołuje następujący łańcuch reakcji (32):



Maksimum absorpcji związane z przejściem T—T β -karotenu w układzie benzen-naftalen występuje przy 530 nm (32) podczas gdy w układzie n-heksan-antracen przy 515 nm (31). Analiza widm absorpcyjnych trypletów innych karotenoidów (zeaksantyna, echinenon, kantaksantyna, astaksantyna, dihydroksylykopen, β -apo-8'-karotenal) wzbudzonych metodą fotolizy błyskowej w układzie heksan-antracen (31) lub metodą radiolizy błyskowej w układzie benzen-naftalen (35) wskazuje, że położenia maksimum absorpcji związane z przejściami T—T przesuwają się w stronę fal dłuższych wraz ze wzrostem liczby podwójnych wiązań w cząsteczce (Tabela 1), a energia wzbudzonych stanów trypletowych (E_T) jest liniową funkcją energii singletowych stanów wzbudzonych (E_S):

$$E_T = kE_S + k_1$$

k , k_1 — stałe równe 6,0 i 7,2 kJ/mol

Ponieważ energia wzbudzonych stanów singletowego i trypletowego wynosi odpowiednio 181 i 128 kJ/mol w przypadku chlorofilu *a* oraz 248 i 88 kJ/mol w przypadku β -karotenu (32) istnieje możliwość przekazywania energii wzbudzenia elektronowego z chlorofilu na karoten na poziomie

Tabela 1.

Charakterystyka singletowych i trypletowych stanów wzbudzonych karotenoidów

Karotenoid	Maksimum absorpcji dla przejść		Czas życia T_1 (μ s)	Odnosnik
	$S_1 \leftarrow S_0$	$T_2 \leftarrow T_1$		
β -karoten	464	530	5,0 (bz)	32, 33
		515	9,0 (hx)	30, 31
luteina	450	518	8,9 (dg)	64
zeaksantyna	457	520	6,5 (bz)	35
			9,4 (bz)	37
astaksantyna	478	580	6,2 (bz)	35, 37
kantaksantyna	473	555	3,8 (bz)	35, 37
echinenon	464	550	5,2 (bz)	37
			3,4 (bz)	35
dihydroksylykopen	533	540	7,9 (bz)	37

bz - oznaczenie wykonano w benzenie,

hx - oznaczenie wykonano w heksanie,

dg - jedyny przypadek, w którym otrzymano trypletowe stany wzbudzone karotenoidu w micelach detergentu (digitoniny).

stanów trypletowych. Wykazano (36) że tego typu przekazywanie jest możliwe w rozpuszczalniku organicznym przy zastosowaniu techniki fotolizy błyskowej gdy chlorofil *a* pełni rolę sensibilizatora.

Wzbudzone stany trypletowe karotenoidów można także otrzymać w reakcji z tlenem singletowym (37, 38, 39):

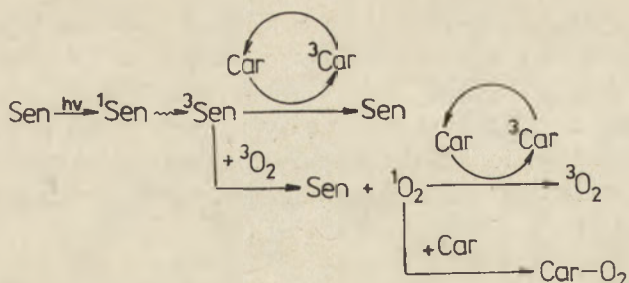


W reakcji z tlenem singletowym część karotenoidów ulega utlenieniu (40). Wydajność wygaszania tlenu singletowego przez karotenoidy rośnie ze wzrostem liczby podwójnych wiązań w układzie sprzężonym w cząsteczce (41), a obecność grup OH nie wpływa na szybkość tego procesu (42).

Podczas powstawania wzbudzonych stanów trypletowych β -karotenu w roztworze *n*-heksanu w nieobecności uczulacza zachodzi równocześnie częściowa izomeryzacja barwnika do formy *cis*, co wyraża się obniżeniem transmisji przy 340 nm (30). Badania kinetyki zmian w rezonansowym efekcie Ramana w czasie otrzymywania trypletowych stanów wzbudzonych β -karotenu metodą pulsowej radiolizy w obecności uczulacza, a także zmian położenia i intensywności pasm w zależności od dawki napromieniania wskazują na to, że w trypletowym stanie wzbudzonym β -karoten występuje w konformacji 15, 15'-*cis* (33). Pomimo, że hipoteza ta nie jest w pełni udowodniona (35) istnieje coraz więcej faktów świadczących na jej korzyść. Między innymi wykazano przy zastosowaniu techniki rezonansu Ramana, że różnice między 15-*cis* i całkowicie-*trans* β -karotenem istniejące w stanie podstawowym zanikają po wzbudzeniu tych barwników do stanów trypletowych (34). Tym tłumaczy się fakt izomeryzacji 15-*cis* β -karotenu do formy całkowicie-*trans* w czasie fotolizy w roztworze benzen-aceton zawierającym 2×10^{-5} M chlorofilu *a*. W tych samych warunkach całkowicie-*trans* β -karoten ulega izomeryzacji nie tylko do formy 15-*cis*, ale również do form 9- i 13-*cis* (34).

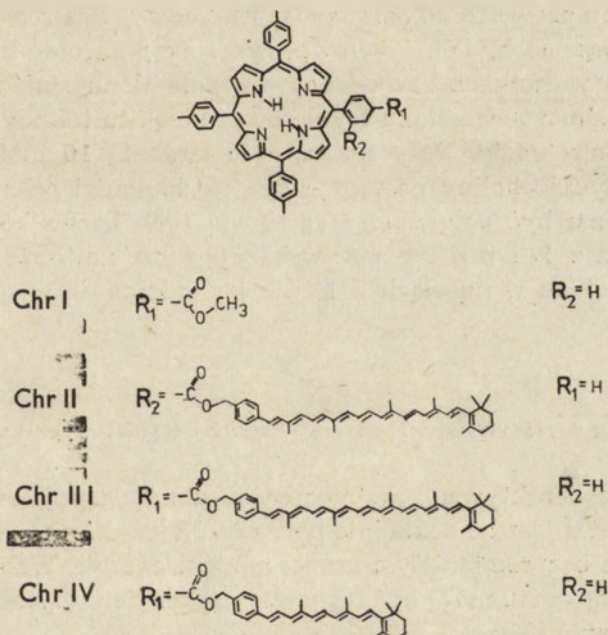
III-2. Ochronna rola karotenoidów

Wzbudzenie chlorofilu *a* w rozpuszczalnikach organicznych w obecności tlenu prowadzi do fotodestrukcji tego barwnika. Po wprowadzeniu karotenoidów do tego układu zachodzi wygaszanie trypletowego stanu wzbudzonego chlorofilu oraz singletowego tlenu (Ryc. 7) przez co chlorofil nie ulega fotooksydacji (42, 43, 44). Aby odpowiedzieć na pytanie, który z tych procesów w głównej mierze odpowiedzialny jest za własności ochronne barwników karotenoidowych przeprowadzono badania modelowe na syntetycznie otrzymanych karotenoido-porfirynach (Ryc. 8). Stosując radiolizę błyskową stwierdzono, że połączenie tych dwóch chromoforów nie powoduje zmiany widm absorpcyjnych a także współczynników ekstynkcji stanów trypletowych karotenoidu (45). Okazało się, że po



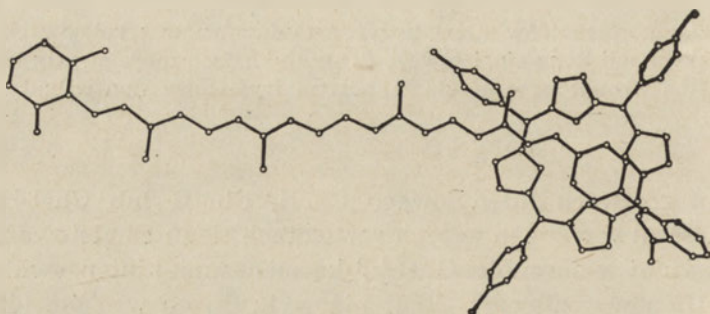
Ryc. 7. Udział karotenoidów (Car) w wydaszaniu stanów trypletowych uczulacza (^3Sen) i dezaktywacji tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$) w układach modelowych; ^1Sen oznacza singletowy stan wzbudzonego uczulacza, ^3Car — trypletowy stan wzbudzony karotenoidów (65).

oświetleniu roztworu bifenylowego ChrII, ChrIII lub ChrI+ β -karoten (Ryc. 8) ilość utworzonego w tych roztworach tlenu singletowego wzrasta najintensywniej w obecności ChrI+ β -karoten, mniej intensywnie w obecności ChrIII a w roztworze ChrII nie wykryto go w ogóle (45). Dalsze badania wykazały, że w karotenoido-porfirynach, zwłaszcza w ChrII zachodzi efektywne wygaszanie trypletowych stanów wzbudzonych pierścienia porfiryńowego. Różnice w wydajności wygaszania wzbudzonych stanów trypletowych układu porfiryńowego między ChrII i ChrIII wynikają z różnicy w ich zdolnościach do zmian konformacyjnych: w ChrII pier-



Ryc. 8. Schemat budowy karotenoido-porfiryn ChrI — Chr IV (45, 62).

ścien jononowy karotenoidu może przyjąć takie ułożenie (Ryc. 9), w którym znajduje się on w płaszczyźnie równoległej do płaszczyzny układu porfiryнового w odległości około 4 Å. W tych warunkach ma miejsce najefektywniejsze oddziaływanie między zewnętrznymi powłokami elektronowymi obu pierścieni. Naturalnym odpowiednikiem modelu ChrII jak wykazano metodą dichroizmu liniowego jest oddziaływanie długofalowej formy chlorofilu *a* z β -karotenem w PSI (46).

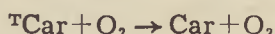


Ryc. 9. Konformacja karoteno-porfiryny ChrII z Ryc. 8 (45).

Własności ochronne karotenoidów badano głównie w rozpuszczalnikach organicznych gdzie barwniki te znajdują się w formie monomerycznej. Znana jest jednak zdolność β -karotenu do ochrony lipidów przez peroksydacją. Oświetlenie liposomów w obecności uczulacza (błękitu toluidynowego) i tlenu prowadzi do peroksydacji lipidów (47). Procesy te są zahamowane w liposomach, do których wprowadzono β -karoten lub kantaksantynę. W tych warunkach zachodzi wygaszanie tlenu singletowego i dezaktywacja wzbudzonego stanu trypletowego błękitu toluidynowego przez wbudowany karotenoid. Po przekroczeniu stężenia 10 mM karotenoidu na mol fosfatydylocholino następuje spadek zdolności ochronnych karotenoidów, co ma być połączone z agregacją tych barwników (47). Dane otrzymane przez L i n d i g (48) wskazują także na to, że forma zagregowana β -karotenu w micelach SDS nie jest zdolna do wygaszania tlenu singletowego.

III-3. Mechanizm dezaktywacji wzbudzonych stanów trypletowych karotenoidów

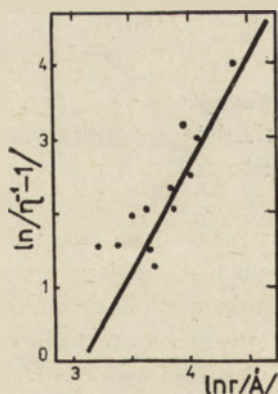
Mechanizm dezaktywacji wzbudzonych stanów trypletowych karotenoidów nie został jeszcze dokładnie poznany. Najczęściej uważa się, że jest on związany z bezpromienistym rozproszeniem energii. Wzbudzone stany trypletowe β -karotenu mogą być wygaszane przez tlen cząsteczkowy w stanie podstawowym (37):



Najnowsze badania (32) wskazują na to, że możliwa jest także anihilacja typu tryplet-tryplet prowadząca do powstania najniższego singletowego stanu wzbudzonego β -karotenu ^3Ag , którego energia byłaby o około 42 kJ/mol niższa od pierwszego singletowego stanu wzbudzonego ^1Bu (49).

III-4. Przekazywanie energii z udziałem wzbudzonego stanu singletowego karotenoidów

Przekazywanie energii z singletowego stanu wzbudzonego karotenoidów (β -karoten, luteina, zeaksantyna, fukoksantyna) na chlorofil badano w układach modelowych, w których możliwe jest osiągnięcie dużego lokalnego stężenia barwników i równocześnie określonego ich uporządkowania tzn. w jednocząsteczkowej warstwie na powierzchni wody, liposomach lub micelach detergentu. Nie obserwowano tego procesu w bezwodnych rozpuszczalnikach organicznych gdzie barwniki karotenoidowe występują wyłącznie w formie monomerycznej (50). We wszystkich przypadkach wydajność przekazywania energii z singletowego stanu wzbudzonego karotenoidów na chlorofil zależała od stężenia barwników. Efektywność przekazywania energii z luteiny na chlorofil a wbudowanych w miciele detergentu (stosunek stężenia luteiny do chlorofilu a wynosił jak 1:1) była odwrotnie proporcjonalna do trzeciej potęgi odległości między cząsteczkami obu barwników (51). Jak widać na rycinie 10 liniowy przebieg krzywej w przypadku bardzo małych odległości jest zaburzony prawdopodobnie na skutek procesu agregacji barwników. W tych warunkach efektywność przekazywania energii na chlorofil jest największa (osiąga 15%). Podobną wartość otrzymano w przypadku mieszaniny β -karotenu i chlorofilu (3:1) w monomolekularnej warstwie na powierzchni wody (17). Interesujący jest fakt, że maksymalną efektywność przekazywania energii



Ryc. 10. Zależność wydajności przenoszenia energii wzbudzenia elektronowego (η) od odległości (r) między luteiną i chlorofilem a wbudowanych w miciele detergentu (51).

wzbudzenia elektronowego wykryto między formą zagregowaną β -karotenu o maksimum absorpcji przy 500 nm a chlorofilem *a* posiadającym maksimum absorpcji przy 669—672 nm. W tym samym układzie energia z wzbudzonego stanu singletowego fukoksantyny na chlorofil *a* była przenoszona w około 50%. Nie zaobserwowano natomiast przenoszenia energii z β -karotenu na chlorofil *a* wbudowanych w liposomy (50, 52).

III-5. Mechanizm przenoszenia energii wzbudzenia elektronowego z karotenoidów na chlorofil

Opisano dwa mechanizmy przenoszenia energii z karotenoidów na chlorofil w układach modelowych: jeden opiera się na teorii Förstera (53, 54, 55), a drugi na założeniach opracowanych przez Dextera (56).

Według teorii Förstera w przekazywaniu energii wzbudzenia elektronowego z cząsteczki donora D na cząsteczkę akceptora A istotną rolę odgrywają: wielkość energii ich wzajemnego oddziaływania (E), różnica wartości energii między kolejnymi poziomami oscylacyjnymi w danym przejściu elektronowym (ΔE) oraz szerokość poziomu oscylacyjnego ($\Delta E'$). Rozróżnia się następujące typy oddziaływań (53, 54):

$$\begin{array}{ll} E > \Delta E & \text{oddziaływania silne} \\ \Delta E > E > \Delta E' & \text{oddziaływania słabe} \\ \Delta E' > E & \text{oddziaływania bardzo słabe} \end{array}$$

Typowe przekazywanie energii zgodne z mechanizmem postulowanym przez Förstera zachodzi dla oddziaływań bardzo słabych. W tym przypadku efektywność rezonansowego przenoszenia energii (K_{er}) zależy od stopnia pokrywania się widma fluorescencji donora z widmem absorpcji akceptora (Ω) (55):

$$K_{er} = Ak^2\Omega k_D^0 R^{-6} \quad \text{wzór I}$$

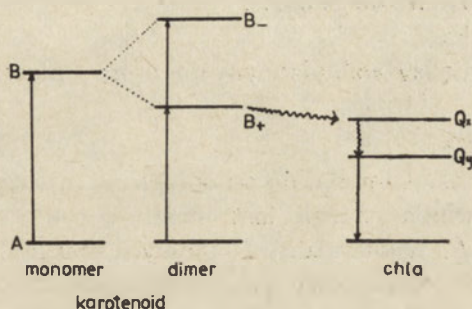
gdzie:

- R — odległość donora od akceptora,
- k_D^0 — stała szybkości promienistego zaniku wzbudzenia D
- k — stała zależna od orientacji D i A
- A — wielkość stała

Ponieważ karotenoidy w rozpuszczalnikach organicznych nie fluoryzują przypuszcza się (49, 57), że energia jest przekazywana z najniższego wzbudzonego singletowego stanu wzbudzonego karotenoidów ^SAg ; energia związana z bezpromienistym przejściem z ^SAg do stanu podstawowego pokrywa się z widmem absorpcyjnym chlorofilu w rejonie $15\,000\text{ cm}^{-1}$.*

* Song i wsp. (58, 59) uważają, że rozszczepienie ekscytonowe pierwszego wzbudzonego stanu singletowego (^1Bu) zagregowanych karotenoidów powoduje lepsze dopasowanie energii przejścia $^1\text{Bu} \rightarrow \text{A}$ do widma absorpcyjnego chlorofilu (Ryc. 11).

Z wielu danych wynika jednak, że przenoszenia energii z karotenoidów na chlorofil *a* w układach modelowych nie można opisać w oparciu o typowe rezonansowe oddziaływania. W przypadku bardzo słabych oddziaływań efektywność przekazywania energii powinna być zgodnie z tezami Förstera odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi z odległości między donorem a akceptorem (wzór I). Natomiast stwierdzona doświadczalnie wydajność przekazywania energii z luteiny na chlorofil jest odwrotnie proporcjonalna do trzeciej potęgi z odległości między cząsteczkami barwników wbudowanych w micelle detergentu (51). Uważa się obecnie, że jeżeli między cząsteczkami występują silne oddziaływania to



Ryc. 11. Diagram poziomów energetycznych monomera i dimeru karotenoidu oraz chlorofilu *a* (59).

w przekazywaniu energii dużą rolę mogą odgrywać również siły odpowiedzialne za agregację cząsteczek. Zjawisko to obserwuje się na przykład w układzie gdzie luteina i chlorofil wbudowane są w micelle detergentu (51). Zakładając nawet, że najniższy singletowy stan wzbudzony karotenoidów 1Ag byłby donorem energii to w oparciu o wzór I niska wydajność kwantowa fluorescencji karotenoidów uniemożliwia przekazywanie energii zgodnie z opisem Förstera (60). Podobny wniosek można wysnuć z fotochemicznych badań karoteno-porfiryn przedstawionych na rycinie 8 (61, 62). Stwierdzono mianowicie, że przekazywanie energii wzbudzenia elektronowego z karotenoidu na układ porfirynewy (ChrIII) nie występowało chociaż odległość między barwnikami była mniejsza od krytycznej. W tych warunkach tylko niska wydajność kwantowa fluorescencji mogła uniemożliwić przekazywanie energii. Jeżeli do pierścienia porfirynewego przyłączono fluoryzujący karotenoid (ChrIV) wydajność ta wzrosła aż do 80% (61).

Dopasowanie energii bezpromienistego przejścia 1Ag do stanu podstawowego w karotenoidach do widma absorpcyjnego chlorofilu może preferować mechanizm przekazywania energii opisany przez Dextera (60). Według teorii Dextera (56) stała szybkości przekazywania nie zależy od wielkości momentów dipolowych przejść związanych z emisją i absorpcją energii a efektywność przenoszenia energii jest niezależna od kwan-

towej wydajności emisji. Migracja energii jest wynikiem elektrostatycznych oddziaływań elektronów rozmieszczonych na zewnętrznych pokrywających się chmurach elektronowych donora i akceptora (56). Prawdopodobieństwo migracji energii K_{er} można opisać następującym równaniem (za 63):

$$K_{er} = \frac{2Q}{h/2} e^{-2R/h} \int_0^{\infty} f(v)\varphi(v)dv \quad \text{wzór II}$$

gdzie:

$f(v), \varphi(v)$ — układ widmowy fluorescencji donora i absorpcji akceptora unormowane do jedności

h — stała Plancka

R — odległość między wzbudzonym donorem i niewzbudzonym akceptorem

Q — wartość stała

Wartość K_{er} zależy eksponentalnie od odległości między cząsteczkami (R). Ten typ przekazywania energii jest możliwy tylko przy odległościach mniejszych niż 15 Å. W układzie modelowym opisanym na str. 12 udało się zbliżyć pierścień porfirykowy do karotenoidu (ChrII) na odległość 4 Å i okazało się wówczas, że 25% energii ulega przeniesieniu z singletowego stanu wzbudzonego niefluoryzującego karotenoidu na układ porfirykowy (porównaj na str. 16). Jeżeli odległość między chromoforami wynosiła nie 4 Å ale 25 Å to w podobnym układzie barwników nie obserwowano przekazywania energii z donora na akceptor (62).

IV. Podsumowanie

Agregacja barwników karotenoidowych *in vitro* zachodzi na skutek zwiększenia oddziaływań typu van der Waalsa lub (i) hydrofobowych między cząsteczkami barwników w stanie podstawowym i silnego sprzężenia ekscytonowego w stanie wzbudzonym. Obie formy karotenoidów (monomeryczna i zagregowana) różnią się w efektywności przenoszenia energii na poziomie trypletowego i singletowego stanu wzbudzonego. Funkcja ochronna karotenoidów związana jest z efektywnym wygaszaniem trypletowego stanu wzbudzonego sensibilizatora (w tym chlorofilu) i dezaktywacją tlenu singletowego; w układzie *in vitro* bardziej efektywne w tym procesie są formy monomeryczne karotenoidów. Formę zagregowaną karotenoidów charakteryzuje natomiast duża wydajność przenoszenia energii z singletowego stanu wzbudzonego na chlorofil. Przekazywanie energii z karotenoidów na chlorofil zachodzi przypuszczalnie z najniższego singletowego stanu wzbudzonego 1S_0 , a w przypadku agregatów z ekscytonowo-rozszczipionego pierwszego singletowego stanu

wzbudzonego (¹Bu). Przekazywanie energii z karotenoidów na chlorofil odbywa się prawdopodobnie zgodnie z mechanizmem opisanym przez Dexter'a.

Autorka składa serdeczne podziękowania Pani Prof. dr hab. Danucie Frąckowiak za krytyczną ocenę niniejszego artykułu oraz uwagi dotyczące stosowanej terminologii.

Zaakceptowano do druku 8.11.1983

PIŚMIENNICTWO

1. Shipman L. L., Cotton T. M., Norris J. R., Katz J. J., 1976, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1791—1794.
2. Shipman L. L., Katz J. J., 1977, *J. Phys. Chem.*, **81**, 577—581.
3. Bucks R. R., Boxer S. G., 1982, *J. Amer. Chem. Soc.*, **104**, 340—343.
4. Katz J. J., 1973, *Naturwissenschaften.*, **60**, 32—39.
5. Katz J. J., Janson T. R., 1973, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **206**, 579—603.
6. Fong F. K., Koester V. J., 1975, *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 6888—6890
7. Fong F. K., Koester V. J., 1976, *Biochim. Biophys. Acta*, **423**, 52—64.
8. Fong F. K., 1977, *J. Theor. Biol.*, **66**, 199—202.
9. Kratky C., Dunitz J. D., 1977, *J. Mol. Biol.*, **113**, 431—442.
- 9a. Włoch E., Więckowski St., 1982, *Post. Bioch.*, **28**, 331—352.
10. Hager A., 1970, *Planta (Berl.)*, **91**, 38—53.
11. Buchwald M., Jencks W. P., 1968, *Biochemistry*, **7**, 834—843.
12. Salares V. R., Young N. M., Carey P. R., Bernstein H. J., 1977, *J. Ram. Spectroscopy* **6**, 282—288.
13. Lamatre J., Maudinas B., Ernst C., 1980, *Photochem. Photobiol.*, **31**, 201—205.
14. Takagi S., Shiroishi M., Takagi T., 1980, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2111—2117.
15. Takagi S., Shiroishi M., Takagi T., 1981, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1159—1165.
16. Litwin F. F., Gulyaew B. A., Sineshchekov V. A., 1965, *Dokl. Akad. Nauk USSR*, **162**, 1184—1187.
17. Sineshchekov V. A., Litvin F. F., Das M., 1972, *Photochem. Photobiol.*, **15**, 187—197.
18. Aghion J., Leblanc R. M., 1978, *J. Mem. Biol.*, **42**, 189—198.
19. Sielewiesiuk J., Stachura S., 1981, *Studia Biophys.*, **85**, 165—170.
20. Mendelsohn R., Van Holten R., 1979, *Biophys. J.*, **27**, 221—236.
21. Yamamoto H. Y., Bangham A. D., 1978, *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 119—127.
22. Kasha M., Rawls H. R., El-Bayoumi M. A., 1965, *Pure Appl. Chem.*, **11**, 371—392.
23. Hochstrasser R. M., Kasha M., 1964, *Photochem. Photobiol.*, **3**, 299—306.
24. Song P-S, Moore T. A., 1974, *Photochem. Photobiol.*, **19**, 435—441.
25. Kasha M., 1959, *Rev. Modern. Phys.*, **31**, 162—169.
26. Hochstrasser R. M., 1964, *Photochem. Photobiol.*, **3**, 317—331.
27. Hexter R. M., 1962, *J. Chem. Phys.*, **37**, 1347—1348.
28. Mc Rae E. G., Kasha M., 1958, *J. Chem. Phys.*, **28**, 721—722.
29. Johansson L. B-A, Lindbom G., Wieslander A., Arvidson G., 1981, *Febs Lett.*, **128**, 97—99.
30. Land E. J., Sykes A., Truscott T. G., 1971, *Photochem. Photobiol.*, **13**, 311—320.

31. Truscott T. G., Land E. J., Sykes A., 1973, *Photochem. Photobiol.*, **17**, 43—51.
32. Jensen N-H, Wilbrandt R., Pagsberg P. B., 1980, *Photochem. Photobiol.*, **32**, 719—725.
33. Jensen N-H, Wilbrandt R., Pagsberg P. B., Sillesen A. H., Hansen K. B., 1980, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7441—7444.
34. Jensen N-H, Nielsen A. B., Wilbrandt R., 1982, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6117—6119.
35. Dallinger R. F., Farquharson S., Woodruff W. H., Rodgers M. A., 1981, *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 7433—7440.
36. Mathis P., Kleo J., 1973, *Photochem. Photobiol.*, **18**, 343—346.
37. Rodgers M. A. J., Bates A. L., 1980, *Photochem. Photobiol.*, **31**, 533—537.
38. Farmilio A., Wilkinson F., 1973, *Photochem. Photobiol.*, **18**, 447—450.
39. Foote C. S., Denny R. W., 1968, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6233—6235.
40. Hasegawa K., Macmillan J. D., Maxwell W., Chichester C. D., 1969, *Photochem. Photobiol.*, **9**, 165—169.
41. Foote C. S., Chang J. C., Denny R. W., 1970, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 5216—5218.
42. Mathews-Roth M. M., Wilson T., Fujimori E., Krinsky N. I., 1974, *Photochem. Photobiol.*, **19**, 217—222.
43. Koka R., Song P-S, 1978, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 509—515.
44. Fujimore E., Livingston R., 1957, *Nature*, **18**, 1036—1038.
45. Bensasson R. V., Land E. J., Moore A. L., Crouch R. L., Dirks G., Moore T. A., Gust D., 1981, *Nature*, **290**, 329—332.
46. Junge W., Schaffernicht H., Nelson N., 1977, *Biochim. Biophys. Acta*, **462**, 73—83.
47. Anderson S. M., Krinsky N. I., 1973, *Photochem. Photobiol.*, **18**, 403—408.
48. Lindig B. A., Rodgers M. A. J., 1981, *Photochem. Photobiol.*, **33**, 627—634.
49. Thrash R. J., Fang H. L-B, Leroi G. E., 1977, *J. Chem. Phys.*, **67**, 5930—5933.
50. Białek-Bylka G. E., Shkuropatov A. Ya., Kadoshnikov S. I., Frackowiak D., 1982, *Photosynthesis Res.*, **3**, 241—245.
51. Szabad J., Lehoczki E., Szaley L., Cartorday K., 1974, *Biophys. Struct. Mechanism.*, **1**, 65—74.
52. Mahreteab A., Strauss G., 1978, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 369—375.
53. Förster Th. 1965, *Modern Quantum Chemistry Cz. III, Action of Light and Organic Molecules.*, Academic Press N.Y., 93—137.
54. Förster Th., 1965, *Pure Appl. Chem.*, **11**, 287—295.
55. Förster Th., 1959, *Discuss Faraday Soc.*, **27**, 7—17.
56. Dexter D. L., 1953, *J. Chem. Phys.*, **21**, 836—850.
57. Thrash R. J., Fang H. L-B, Leroi G. E., 1979, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 1049—1050.
58. Song P-S., Koka P., Prezelin B. D., Haxo F. T., 1976, *Biochemistry* **15**, 4422—4427.
59. Song P-S., Jung J., 1980, *J. Korean Agricul. Chem. Soc.*, **23**, 73—83.
60. Naqvi K. R., 1980, *Photochem. Photobiol.*, **31**, 523—524.
61. Dirks G., Moore A. L., Moore A. T., Gust D., 1980, *Photochem. Photobiol.*, **32**, 277—280.
62. Moore A. L., Dirks G., Gust D., Moore T. A., 1980, *Photochem. Photobiol.*, **32**, 691—695.
63. Borisov A. I., Godik V. I., 1973, *Biochim. Biophys. Acta*, **301**, 227—248.
64. Mathis P., 1969, *Photochem. Photobiol.*, **9**, 55—63.
65. Krynsky N. I., 1978, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **284**, 581—590.

JOANNA GEMEL *)

Lipidy błon tylakoidów

Lipids of thylakoid membranes

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Płynność błon a aktywności chloroplastów
- III. Galaktolipidy
 - III-1. Charakterystyka ogólna
 - III-2. Kwasy tłuszczowe w galaktolipidach
 - III-3. Galaktolipidy a struktura błon tylakoidów
 - III-4. Galaktolipidy a funkcjonowanie chloroplastów
- IV. Fosfolipidy
 - IV-1. Charakterystyka ogólna
 - IV-2. Kwasy tłuszczowe w fosfolipidach
 - IV-3. Fosfolipidy a fotosyntetyczny transport elektronów
- V. Sulfolipidy
 - V-1. Charakterystyka ogólna
 - V-2. Sulfolipid a fotosynteza
- VI. Wolne kwasy tłuszczowe
 - VI-1. Oddziaływanie kwasów tłuszczowych z błonami
 - VI-2. Kwasy tłuszczowe a struktura chloroplastów
 - VI-3. Kwasy tłuszczowe a fotosynteza
- VII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Membrane fluidity and chloroplast activity
- III. Galactolipids
 - III-1. General characteristics

*) Mgr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: PS I (II) — I(II) układ fotosyntezy, MGDG— mono-galaktozylodiacyloglicerol, DGDG — digalaktozylodiacyloglicerol, LHCP — kompleks chlorofil a/b — białko, zbierający energię (light harvesting chlorophyll protein complex), DCIP, DCIPH₂ — utleniona i zredukowana forma 2,6-dichlorofenolindo-fenolu, PG — fosfatydyloglicerol, PC — fosfatydylocholina, DPC — difenylokarbazyd, CF₁ — chloroplastowy czynnik sprzęgający (coupling factor), BSA — albumina surowicy wołu, KT — kwasy tłuszczowe, MV — metylowiologen, PCy — plastocyanina, TMPD — N-tetrametylo-p-fenyldiamina, ATP — adenozyntrifosforan.

- III-2. Galactolipid fatty acids
- III-3. Galactolipids and structure of thylakoid membranes
- III-4. Galactolipids and function of chloroplasts
- IV. Phospholipids
 - IV-1. General characteristics
 - IV-2. Phospholipid fatty acids
 - IV-3. Phospholipids and photosynthetic electron transport
- V. Sulpholipids
 - V-1. General characteristics
 - V-2. Sulpholipid and photosynthesis
- VI. Free fatty acids
 - VI-1. Fatty acid — membrane interaction
 - VI-2. Fatty acid and chloroplast structure
 - VI-3. Fatty acids and photosynthesis
- VII. Concluding remarks

I. Wstęp

Błony chloroplastów tak jak inne błony biologiczne, mają charakter lipoproteinowy o stosunku ilościowym białek do lipidów 1:1 (1). Wśród lipidów dominują galaktolipidy: monogalaktozylo-diacyloglicerol i digalaktozylo-diacyloglicerol, stanowiące 53—70% lipidów błon tylakoidów. W mniejszych ilościach występują: fosfolipidy (12—18%), sulfolipid (10—18%) i kwas fosfatydowy (0—19%) (2, 3) (Tabela 1). W chloroplastach występują także w niewielkich ilościach (0,9—3,2 $\mu\text{mola/mg}$ chlorofilu) wolne kwasy tłuszczowe (4).

W badaniach lipidów chloroplastów szczególnie pomocne okazało się zastosowanie technik mikroskopowych (5—7) i enzymów lipolitycznych

Tabela 1.

Skład lipidowy błon tylakoidów

Lipidy	Szpinak (<i>S. oleracea</i>)	Soja (<i>G. max</i>)	Ryż (<i>O. sativa</i>)	Kukurydza (<i>Z. mays</i>)	
				Mezofil	Pochwa około- wiązkowa
Monogalaktozylo-diacyloglicerol	38	39	44	40	30
Digalaktozylo-diacyloglicerol	29	28	24	30	23
6-Sulfochinowozylo-diacyloglicerol	18	14	17	14	10
Fosfatydyloglicerol	11	11	8	10	10
Fosfatydylocholina	3	3	3	1	6
Fosfatydyloinozytol	1	2	1	1	T
Fosfatydyloetanolamina	ND	ND	T	ND	2
Kwas fosfatydowy	T	3	3	4	19

ND — nie stwierdzono, T — ilości śladowe. Wszystkie wartości podano w % całkowitej ilości lipidów (3)

(8—15), pozwalających na usunięcie z błon danej grupy lipidów i obserwację efektów wywołanych ich brakiem. Wykorzystanie tych i innych metod doświadczalnych pozwoliło na ustalenie, że lipidy w chloroplastach odgrywają rolę strukturalną (5, 16), wpływają na aktywności fotochemiczne tych organeli (7, 13, 14, 17—19), fotofosforylację (5, 20, 21) i reakcje ciemne fotosyntezy (20).

II. Płynność błon a aktywności chloroplastów

Niezwykle istotnym czynnikiem dla aktywności chloroplastów jest płynność błon uwarunkowana ich składem lipidowym (22—24). Od niej zależą m.in. przepuszczalność błon i aktywności fotochemiczne (24). Jej wpływ na aktywności chloroplastów można badać stosując związki bezpośrednio ograniczające ruchliwość lipidów np. mielitynę (24) lub zmieniając skład lipidowy błon np. przez uwodornienie kwasów tłuszczowych wchodzących w skład lipidów błonowych (22, 23). Mielityna (polipeptyd będący składnikiem jadu pszczoł) reagując z monowarstwami lipidowymi błon chloroplastów, ogranicza ich ruchliwość. Konsekwencją jej związania z błonami jest zahamowanie aktywności fotochemicznych, zmniejszenie zdolności wytwarzania gradientu elektrochemicznego w poprzek błony, rozprężenie i uwolnienie plastocyaniny (24). Podobny efekt wywołuje, na skutek zmniejszenia płynności, uwodornienie podwójnych wiązań w cząsteczkach kwasów tłuszczowych. Jest to proces zachodzący stopniowo (np. $C_{18:3} \rightarrow C_{18:2} \rightarrow C_{18:1} \rightarrow C_{18:0}$). Uwodornienie 30—40% podwójnych wiązań nie jest wystarczające dla zmodyfikowania aktywności fotochemicznych chloroplastów. Dopiero nasycenie 50—60% wiązań jest powodem zahamowania aktywności PS II i stymulacji aktywności PS I (23). Spadkowi płynności błon towarzyszy też zmniejszenie ich przepuszczalności (24).

Obecnie badania lipidów chloroplastów są przeprowadzane w bardziej szczegółowym aspekcie. Koncentrują się na określeniu współzależności pomiędzy galakto-, fosfo- i sulfolipidami oraz wolnymi kwasami tłuszczowymi a aktywnościami chloroplastów.

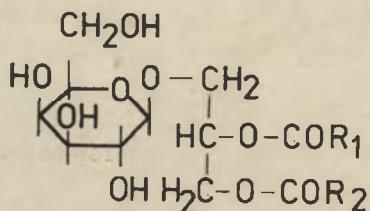
III. Galaktolipidy

III-1. Charakterystyka ogólna

Do galaktolipidów błon tylakoidów (Ryc. 1) zalicza się przede wszystkim monogalaktozylo-diacyloglicerol i digalaktozylo-diacyloglicerol (25, 26) oraz występujące w śladowych ilościach trigalaktozylo-diacyloglicerol i tetragalaktozylo-diacyloglicerol (25—27). Acylogalaktolipidów (Ryc. 2): acylo-MGDG, acylo-DGDG i acylo-lizo-MGDG nie stwierdzono *in vitro*. Wy-

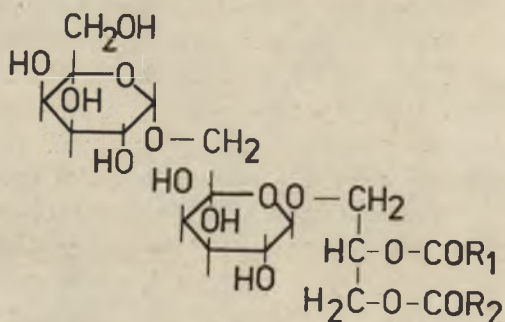
stępują jedynie w homogenatach liści (28—30). Stąd ich powstawanie przypisuje się procesom uszkodzenia organeli (28).

Poziom galaktolipidów w roślinach jest cechą gatunkową (4). Wykazano zależność zdolności do fotosyntezy i poziomu galaktolipidów (25).



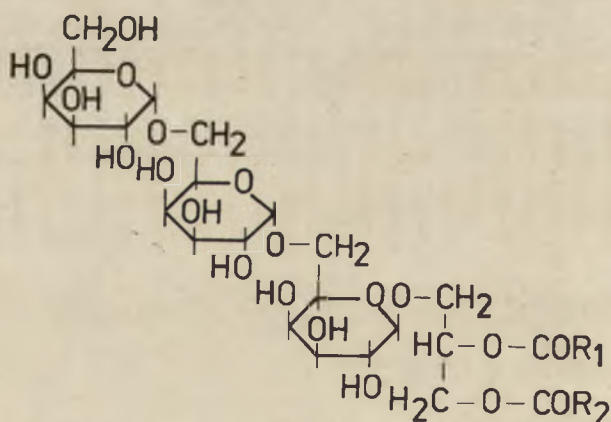
Monogalaktozylodiacyloglicerol (MGDG)

1,2-diacylo-3-O-β-D-galaktopiranozylo-sn-glicerol



Digalaktozylodiacyloglicerol (DGDG)

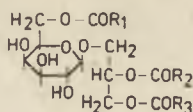
1,2-diacylo-3-O-(α-D-galaktopiranozylo-(1→6)-O-β-D-galaktopiranozylo)-sn-glicerol



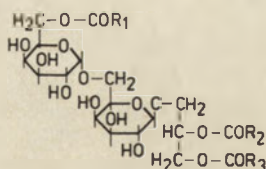
Trigalaktozylodiacyloglicerol (TGDG)

1,2-diacylo-3-O-(α-D-galaktopiranozylo-(1→6)-α-D-galaktopiranozylo-(1→6)-O-β-D-galaktopiranozylo)-sn-glicerol

Ryc. 1. Galaktolipidy roślinne (25).



6-O-Acylmonogalaktosylodiacylglycerol



6-O-Acyldigalaktosylodiacylglycerol

Ryc. 2. Acylogalaktolipidy roślinne (25).

Wyrazem tego jest charakterystyczna dla błon chloroplastów przewaga ilościowa monogalaktosylodiacylglicerolu w porównaniu z digalaktosylodiacylglicerolem (3, 25) oraz wyższy poziom galaktolipidów niż w tkankach nefotosyntetyzujących, gdzie ponadto występuje odwrócenie proporcji galaktolipidów na korzyść digalaktosylodiacylglicerolu (31, 32). W chloroplastach roślin chłodowrażliwych w porównaniu z chłodoodpornymi nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie galaktolipidów. Wskazuje to na brak zależności pomiędzy reakcją roślin na obniżoną temperaturę a zawartością galaktolipidów w ich chloroplastach (4) (Tabela 2).

Tabela 2.

Poziom galaktosylodiacylgliceroli w chloroplastach roślin chłodoodpornych i chłodowrażliwych (4) Przedstawione wyniki (w $\mu\text{molach/mg}$ chlorofilu) są średnimi arytmetycznymi \pm odchylenie standardowe, obliczonymi na podstawie 3-5 doświadczeń

Źródło galaktolipidów		MGDG	DGDG	Suma MGDG + DGDG	Stosunek MGDG/DGDG
rośliny chłodowrażliwe	Szpinak (<i>S. oleracea</i>)	1,06 \pm 0,03	0,65 \pm 0,14	1,71	1,6
	Groch (<i>P. sativum</i>)	1,72 \pm 0,27	0,78 \pm 0,06	2,50	2,2
rośliny chłodoodporne	Fasola (<i>P. vulgaris</i>)	0,72 \pm 0,04	0,25 \pm 0,03	0,97	2,9
	Bób (<i>V. faba</i>)	0,79 \pm 0,13	0,68 \pm 0,03	1,47	1,2
	Kukurydza (<i>Z. mays</i>)	1,52 \pm 0,20	0,83 \pm 0,20	2,35	1,8
	Pomidor (<i>L. esculentum</i>)	2,09 \pm 0,17	1,13 \pm 0,17	3,22	1,9

III-2. Kwasy tłuszczowe w galaktolipidach

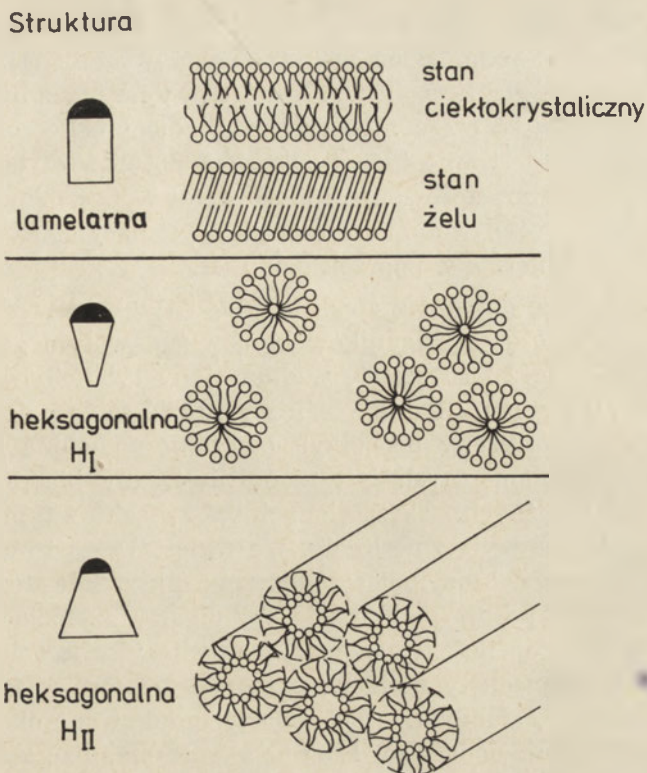
Dla galaktolipidów chloroplastów znamienny jest wysoki stopień nienasylenia kwasów tłuszczowych (33—37). Ponad 90% stanowią kwasy nienasycone, przy czym występują różnice międzygatunkowe dotyczące ich składu. Rośliny, które z wielonienasyconych kwasów tłuszczowych zawierają jedynie kwas linolenowy nazwano roślinami $C_{18:3}$, np. rodziny *Asteraceae*, *Fabaceae* (38, 39), a te które oprócz kwasu linolenowego zawierają też heksadekatrienowy nazwano roślinami $C_{16:3}$, m.in. rodziny *Solanaceae*, *Ranunculaceae*, *Chenopodiaceae*, *Apiaceae* i *Brassicaceae* (38, 39).

Dzięki zastosowaniu specyficznych enzymów hydrolizujących znana jest nawet pozycja kwasów tłuszczowych w cząsteczkach galaktolipidów (40—42). Kwas linolenowy najczęściej znajduje się w pozycji C-1 glicerolu. W roślinach $C_{16:3}$ w monogalaktozylodiacyloglicerolu w pozycji C-2 towarzyszy mu naogół kwas heksadekatrienowy, a w digalaktozylodiacyloglicerolu palmitynowy. Natomiast w roślinach $C_{18:3}$ w monogalaktozylodiacyloglicerolu w pozycji C-2 występuje głównie kwas linolenowy, a w digalaktozylodiacyloglicerolu linolenowy lub palmitynowy (25, 39).

III-3. Galaktolipidy a struktura błon tylakoidów

Z przewagi ilościowej galaktolipidów nad innymi składnikami lipidowymi w błonach tylakoidów wynika przypuszczenie o ich roli strukturalnej (35, 43). Potwierdzają ją obserwacje mikroskopowe chloroplastów traktowanych galaktolipazą (5), w których obserwuje się zakłócenie regularnej struktury gran.

Wydaje się, że monogalaktozylodiacyloglicerol i digalaktozylodiacyloglicerol tworzą dwuwarstwową, płynną matriks błon tylakoidów. Potwierdzają to doświadczenia przeprowadzone *in vitro* (44, 45). Monogalaktozylodiacyloglicerol w środowisku wodnym tworzy jedną z charakterystycznych dla lipidów strukturę tzw. heksagonalną II (44), a digalaktozylodiacyloglicerol lamelarną (44). Tworzenie przez cząsteczki lipidów w wodzie różnych struktur molekularnych wynika z ich polarnej budowy (Ryc. 3). Lipidy o zbliżonych rozmiarach grup polarnych i hydrofobowych, jak fosfatydylocholina, fosfatydyloglicerol, digalaktozylodiacyloglicerol łatwo tworzą struktury dwuwarstwowe zgodne z przyjmowanym modelem błon biologicznych. Cząsteczki lipidów o niewielkich rozmiarach grup polarnych np. nienasycona fosfatydyloetanolamina, monogalaktozylodiacyloglicerol, kardiolipina w obecności Ca^{2+} przyjmują konfigurację heksagonalną II tj. tworzą cylindry, w których polarne części są skierowane do środka. Cząsteczki lipidów, w których części polarne dominują np. lizolecytyny, gangliozydy tworzą struktury heksagonalne I tj. cylindry z częściami po-



Ryc. 3. Struktura lipidów błonowych poddanych rozproszeniu w środowisku wodnym (46).

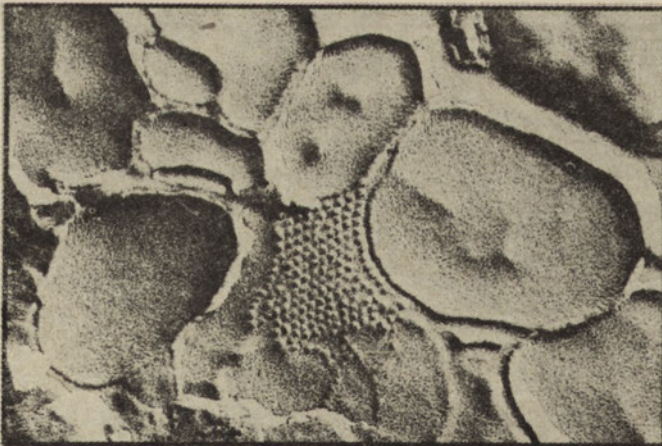
larnymi skierowanymi na zewnątrz (46). Skład kwasów tłuszczowych w cząsteczkach determinuje ich konfigurację. Wzrost nasycenia wywołany przez uwodornienie wiązań podwójnych redukuje zdolność monogalaktozylodiacylglicerolu do tworzenia struktur innych niż struktura dwuwarstwy lipidowej (ang. *non-bilayer*) (47). Gdy monogalaktozylodiacylglicerol i digalaktozylodiacylglicerol podda się równocześnie dyspersji w wodzie w stosunkach molowych takich, w jakich występują w błonach to obserwuje się regularną strukturę dwuwarstwową, a pomiędzy dwiema warstwami lipidów odwrócone micle (7) (Ryc. 4). Z obserwacji mikroskopowych błon chloroplastów poddanych *freeze-fracture* wynika ponadto, że obecność innych lipidów obdarzonych ładunkiem wpływa dodatkowo na modyfikację struktury (45) np. kwaśne lipidy: fosfotydylglicerol i sulfolipid uniemożliwiają tworzenie struktur innych niż dwuwarstwa lipidowa.

Ostatnio dużo uwagi poświęca się badaniom dotyczącym asymetrycznego rozmieszczenia lipidów w błonach biologicznych. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu wyrafinowanych technik współczesnej biologii błon m.in. enzymów specyficznych wobec określonych lipidów oraz selektywnego

znakowania składników błonowych. Asymetryczne rozmieszczenie galaktolipidów wykazano m.in. w błonach tylakoidów sałaty (1). Tylko 20% monogalaktozylodiacylloglicerolu jest łatwo trawione przez lipazę z *Rhizopus*. Fakt, że mniejsza część monogalaktozylodiacylloglicerolu jest położona po zewnętrznej stronie błon tylakoidów potwierdza też Radunz w doświadczeniach z zastosowaniem przeciwciał wobec monogalaktozylodiacylloglicerolu (1, 48). Natomiast digalaktozylodiacylloglicerol jest rozmieszczony równomiernie w poprzek błony (1).

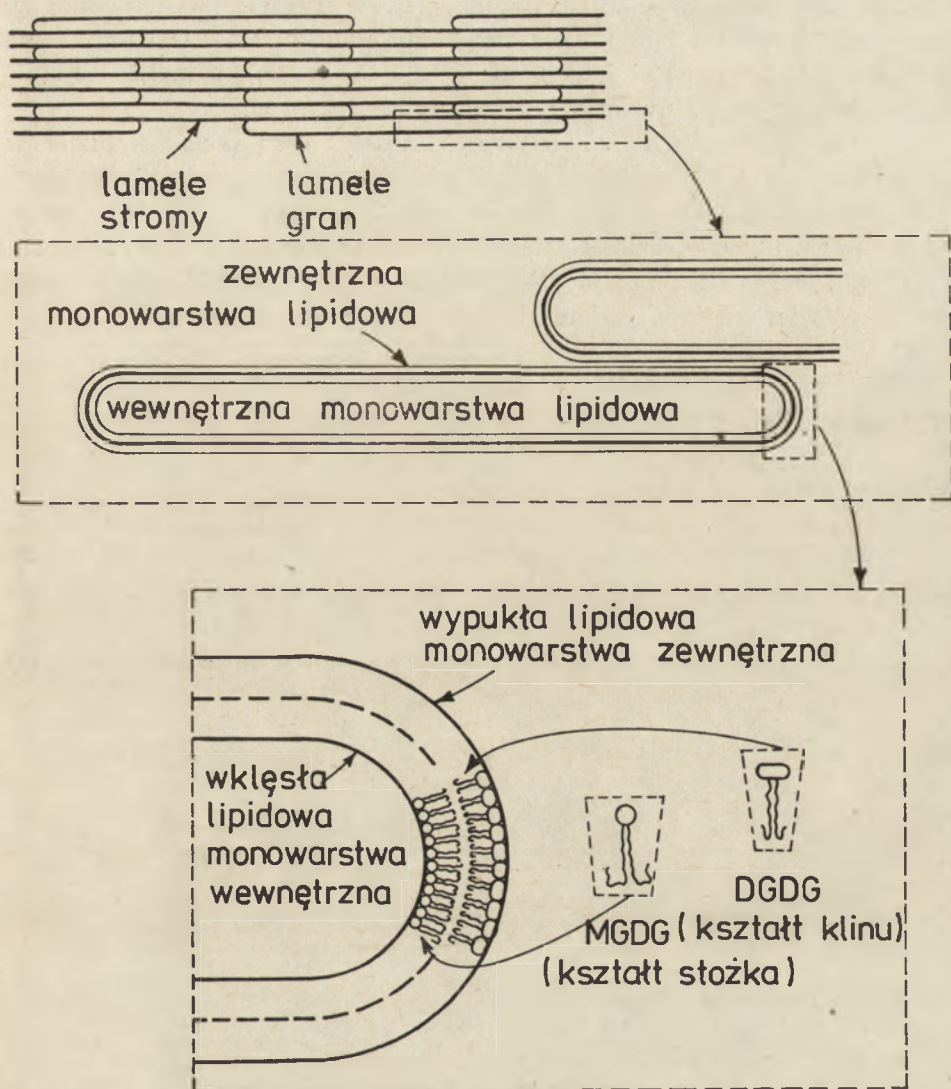
Ciekawą hipotezę dotyczącą struktury błon tylakoidów z uwzględnieniem nie tylko położenia składników błonowych, w tym galaktolipidów w poprzek błony, lecz i asymetrię wzdłuż błony tylakoidów przedstawił ostatnio Murphy (49) (Ryc. 5). Jeśli wyobrazić sobie pojedynczy tylakoid gran jako wydłużony pęcherzyk otoczony podwójną błoną, to ze względów termodynamicznych jest niemożliwe, aby białka znajdowały się w częściach brzeżnych, zakrzywionych. W związku z tym w częściach skrajnych występują wyłącznie lipidy. We wklęsłej części błony znajdują się cząsteczki monogalaktozylodiacylloglicerolu o kształcie stożkowym, natomiast w wypukłej klinowate cząsteczki digalaktozylodiacylloglicerolu. Około 1/3 całkowitej ilości monogalaktozylodiacylloglicerolu występuje w brzegowych częściach tylakoidów, pozostałe 2/3 jest składnikiem tzw. odwróconych miceli, stabilizując deformacje indukowane obecnością białek. Warto przy tym dodać, że Costes rolę stabilizującą przypisuje digalaktozylodiacylloglicerolowi (50).

Wykazano, że galaktolipidy są związane w błonach tylakoidów z cząsteczkami chlorofilu. Wydaje się, że długołańcuchowe, węglowodorowe reszty galaktolipidów są miejscem wiązania fitolowej części chlorofilu (51). Z oznaczeń ilościowych wynika jednak, że tylko 15—20% galaktoli-



Ryc. 4. Mikrofotografia elektronowa (metoda freeze-fracture) mieszaniny MGDG i DGDG (2:1) poddanej działaniu ultradźwięków w środowisku wodnym (7).

Tylakoidy



Ryc. 5. Schemat struktury tylakoidu w przekroju poprzecznym (49). MGDG — mono-galaktozyliodacyloglicerol (cząsteczka o kształcie stożka), DGDG — digalaktozyliodacyloglicerol (cząsteczka o kształcie klinu).

pidów jest związanych z kompleksami chlorofil-białko (36, 52), a stosunek związanych galaktolipidów do chlorofilu wynosi 1:4,5 (36). Oddziaływanie to ma prawdopodobnie charakter niespecyficzny.

III-4. Galaktolipidy a funkcjonowanie chloroplastów

Oprócz roli strukturalnej wiele jest danych przemawiających za udziałem galaktolipidów w funkcjonowaniu chloroplastów. Erwin i Bloch

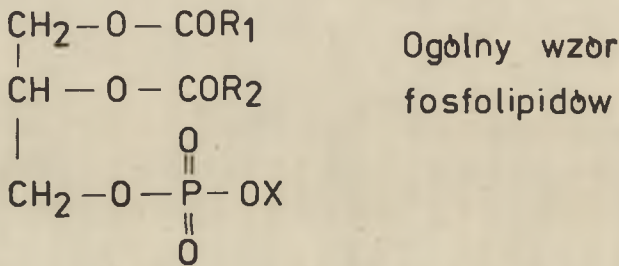
(53) postulowali bezpośredni udział galaktolipidów w fotosyntetycznym wydzielaniu tlenu, a nienasyconym kwasom tłuszczowym przypisywali funkcję przenośników elektronów (25, 53). Wprawdzie stwierdzono, że działanie egzogennej galaktolipazy na błony chloroplastów jest przyczyną zahamowania aktywności fotochemicznych (43, 54, 55), jednakże czynnikami hamującymi są uwolnione kwasy tłuszczowe (por. VI).

Według *Bensona* (25, 56) galaktolipidy biorą ponadto udział w transporcie cukrów przez błony (25). Glukoza ulega epimeryzacji do galaktozy, która włączona do monogalaktozydylacyloglicerolu łatwo może przeniknąć przez błonę otoczki. Następnie dzięki działaniu galaktozydazy cukier ulega uwolnieniu z cząsteczki galaktolipidu. Hipoteza ta nie znalazła jednak potwierdzenia w badaniach izotopowych *Roughana* (57).

IV. Fosfolipidy

IV-1. Charakterystyka ogólna

Fosfolipidy błon tylakoidów (Ryc. 6) są reprezentowane głównie przez fosfotydylcholinę i fosfotydylglicerol oraz w śladowych ilościach fosfotydylinozytol i fosfotydylloetanolaminę, co razem stanowi około 15% lipidów błon tylakoidów (2, 3). Fosfolipidy występują na powierzchni błon



X = -H	Kwas fosfatydowy (PA)
X = -CH ₂ -CH ₂ -N(CH ₃) ₃	fosfatydylcholina (PC)
X = -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	fosfatydylloetanolamina (PE)
X = -glicerol	fosfatydylglicerol (PG)
X = -inozytol	fosfatydylinozytol (PI)

Ryc. 6. Fosfolipidy błon tylakoidów (58).

(2, 59). Nie budzi też wątpliwości asymetria ich rozmieszczenia. Stosując trawienie fosfolipazą A_2 z trzustki wykazano, że około 70% fosfatydyloglicerolu i 35% fosfatydylocholinoi znajduje się po zewnętrznej, a pozostała ich część po wewnętrznej stronie błon tylakoidów (1, 11, 14).

IV-2. Kwasy tłuszczowe w fosfolipidach

Głównym składnikiem fosfatydylocholinoi w tylakoidach jest kwas linolowy oraz w mniejszych ilościach palmitynowy, oleinowy i linolenowy (58). Mniej natomiast wiadomo na temat pozycyjnego rozmieszczenia kwasów tłuszczowych. Wykazano jedynie, że w pozycji C-1 glicerolu dominują nasycone kwasy tłuszczowe (58).

W cząsteczkach fosfatydyloglicerolu najczęściej występuje kwas palmitynowy i 3-trans-heksadekanowy stanowiąc około połowy kwasów tłuszczowych wchodzących w jego skład (33, 60). Znaczne ilości kwasu 3-trans-heksadekanowego występują poza tym jedynie w kardiolipinie z bobu (*Vicia faba*) i triacyloglicerolach z rodziny *Compositae* (58). W fosfatydyloglicerolu kwas ten występuje w pozycji C-2 glicerolu (61, 62). W pozycji C-1 najczęściej towarzyszy mu kwas linolenowy (61, 62). Wydaje się, że wrażliwość roślin na przemarzanie zależy od składu kwasów tłuszczowych w cząsteczkach fosfatydyloglicerolu. Z porównania bowiem 9 gatunków roślin chłodowrażliwych z 12 gatunkami roślin chłodoodpornych wynika, że w cząsteczkach fosfatydyloglicerolu suma fosfatydyloglicerolu zawierającego wyłącznie kwas palmitynowy oraz fosfatydyloglicerolu zawierającego w C-1 glicerolu reszty kwasu palmitynowego, a w C-2 3-trans-heksadekanowego wynosi 6-65% w pierwszej grupie roślin, natomiast 3-19% w drugiej z nich. Jest to tylko jedna z różnic pomiędzy roślinami obu grup (63).

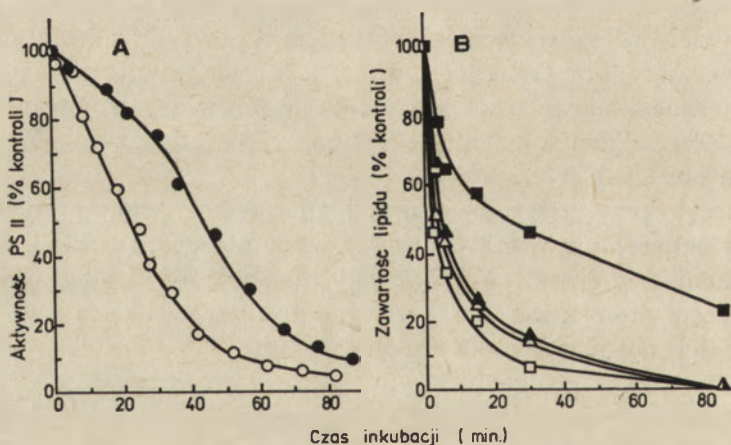
Wysunięto przypuszczenie odnośnie znaczenia charakterystycznego dla fosfatydyloglicerolu kwasu 3-trans-heksadekanowego. Doświadczenia z zastosowaniem fosfolipazy A_2 wykazały niezbędność fosfatydyloglicerolu zawierającego ten kwas dla wydajności aparatu zbierającego światło i aktywności puli plastochinonu (64).

Ponadto wykazano, że fosfatydyloglicerol zawierający kwas 3-trans-heksadekanowy jest specyficznie związany z oligomeryczną formą kompleksu lipoproteinobarwnikowego LHCP tzw. LHCP¹ (65, 66). W skład tego kompleksu obok fosfatydyloglicerolu wchodzi monogalaktocylo-diacylloglicerol i digalaktocylo-diacylloglicerol (65). Jednak tylko usunięcie (np. przez działanie fosfolipazy A_2) fosfatydyloglicerolu zawierającego kwas 3-trans-heksadekanowy powoduje przekształcenie formy oligomerycznej LHCP¹ w monomeryczną LHCP³ (67). Możliwa jest rekonstrukcja formy oligomerycznej przez zmieszanie formy monomerycznej z liposomami utworzonymi z fosfatydyloglicerolu zawierającego kwas 3-trans-

heksadekanowy (66). To samo zjawisko stwierdzono *in vivo* w liściach *Picea abies* w ciemności, gdzie obserwowano jedynie LHCP³ i brak kwasu 3-trans-heksadekanowego. Dopiero w świetle białym pojawiał się ten kwas (66, 68). Zaobserwowano zależność ułożenia tylakoidów w regularne stopy zwane granami, od syntezy tego związku (65).

IV-3. Fosfolipidy a fotosyntetyczny transport elektronów

Obecnie znana jest już zależność aktywności fotochemicznej chloroplastów od składu fosfolipidowego ich błon. Analogiczny kształt krzywych: hydrolizy fosfatydylocholiny i zmian aktywności $H_2O \rightarrow DCIP$ w obecności fosfolipazy A_2 świadczy o niezbędności fosfatydylocholiny dla aktywności PS II (14). Dodatkowym potwierdzeniem tej obserwacji jest doświadczenie, w którym błony tylakoidów poddawano działaniu enzymów o odmiennej specyficzności substratowej: fosfolipazy A_2 z trzustki i z jadu żmiji *Vipera russelli* (Ryc. 7). Wiadomo, że fosfolipaza trzustkowa wykazuje znaczną wybiórczość wobec fosfatydyloglicerolu, a fosfolipaza z jadu żmiji wobec fosfatydylocholiny. Przy takiej samej szybkości hydrolizy fosfatydyloglicerolu przez fosfolipazę trzustkową mniejszej hydrolizie fosfatydylocholiny przez fosfolipazę trzustkową odpowiada mniejsza inhibicja aktywności PS II (14). Ponadto stwierdzono udział w aktywności PS II tylko tej części fosfatydylocholiny, która znajduje się po we-



Ryc. 7. Porównanie działania fosfolipazy A_2 z trzustki i jadu żmiji *Vipera russelli* na aktywność PS II (A) i hydrolizę fosfolipidów (B) jako funkcja czasu inkubacji (14). A) Aktywność PS II ($H_2O \rightarrow DCIP$) w obecności trzustkowej fosfolipazy A_2 (●) oraz w obecności fosfolipazy A_2 z *Vipera russelli* (○), B) Zawartość fosfolipidów: PG w obecności fosfolipazy A_2 z trzustki (▲) i z *Vipera russelli* (△), PC w obecności fosfolipazy A_2 z trzustki (■) i z *Vipera russelli* (□).

wewnętrznej stronie błon tylakoidów (14). W warunkach hydrolizy tylko zewnętrznej puli fosfatydylocholiny (krótkie czasy działania fosfolipazy) nie obserwowano zahamowania aktywności PS II (14). Dopiero hydroliza wewnętrznej puli fosfatydylocholiny wywołuje inhibicję tego układu.

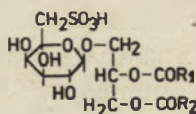
Fosfatydyloglicerolowi przypisuje się rolę regulacyjną w aktywności PS I (14). Hydrolizie tego fosfolipidu towarzyszy wzrost aktywności PS I. Stymulacja jest maksymalna, gdy hydrolizie poddaje się obie — zewnętrzną i wewnętrzną pulę fosfatydyloglicerolu (14). Zwiększenie aktywności PS I w obecności fosfolipazy nie wynika z rozprężenia i nie jest związane z działaniem kwasów tłuszczowych uwolnionych przez fosfolipazę (13). Można ją natomiast przypisać tworzeniu lizozwiązków. W obecności lipolitycznej acylohydrolazy, uniemożliwiającej nagromadzenie się lizofosfolipidów powstających w wyniku działania fosfolipazy, obserwowano inhibicję aktywności PS I (13). Wydaje się, że dwuwarstwowa struktura błon nie ulega naruszeniu na skutek hydrolizy fosfolipidów. Indukuje natomiast wzrost przepuszczalności błony. Wzrost aktywności PS I może zatem wynikać ze zwiększenia przepuszczalności błon dla donorów elektronów (13). Natomiast przypuszczenie D u v a l a i wsp. (64) o udziale fosfatydyloglicerolu w aktywności PS II wydaje się błędne, ponieważ autorzy zaniedbali fakt szerokiej specyficzności substratowej stosowanej fosfolipazy z jadu żmiji. Założyli, że w czasie jej działania poziom fosfatydylocholiny jest stały, a hydrolizie ulega tylko fosfatydyloglicerol, co zdaniem R a w y l e r a i S i e g e n t h a l e r a jest dużym uproszczeniem (14).

Podsumowując: w łańcuchu fotosyntetycznego transportu elektronów stwierdzono istnienie dwóch miejsc działania fosfolipazy A_2 : miejsce inhibicji w PS II pomiędzy miejscem donorowym DPC a plastochinonem i miejsce stymulacji pomiędzy miejscem donorowym DCIPH₂ a pierwotnym akceptorem PS I (14).

V. Sulfolipidy

V-1. Charakterystyka ogólna

Sulfolipidy są reprezentowane w błonach tylakoidów przez sulfochinozozyliodiacyloglicerol (Ryc. 8). Zawiera on przede wszystkim kwas linole-



Sulfochinozozyliodiacyloglicerol

Ryc. 8. Struktura sulfolipidu roślinnego (58).

nowy i palmitynowy (8, 69, 70). W pozycji C-1 glicerolu występuje najczęściej kwas linolenowy, a w C-2 palmitynowy (69). Sulfolipid jest położony w błonach powierzchniowo (71). Występuje głównie po wewnętrznej stronie błon (1).

V-2. Sulfolipid a fotosynteza

W tkankach nefotosyntetyzujących występuje znacznie mniej sulfolipidu niż w fotosyntetyzujących (70, 72), co sugeruje jego niezbędność w procesie fotosyntezy. U *Euglena* oraz w roślinach wyższych stwierdzono, że syntezie chlorofilu i galaktolipidów towarzyszy synteza sulfolipidu (70). W hodowanej heterotroficznie tkance *Ochromonas danica* zawartość sulfolipidu jest 5—6-krotnie niższa niż w warunkach wzrostu autotroficznego (73). Wysłunięto szereg przypuszczeń tłumaczących jego udział w fotosyntezie. Niewykluczone, że sulfolipid zawierający kwas linolenowy i palmitynowy wpływa na ułożenie cząsteczek chlorofilu w błonach, zapewniając dużą wydajność działania barwnika. Przeciwnie przeciwno sulfolipidowi hamuje fotosyntetyczny transport elektronów w PS I (8, 69). Usunięcie sulfolipidu z błon tylakoidów przez ekstrakcję heptanem powoduje zahamowanie aktywności PS I i fotofosforylacji (74). Egzogenny sulfolipid przywraca tę aktywność tylko częściowo. Najbardziej efektywne w reaktywacji PS I są nasycające ilości plastocyaniny. Poza tym sulfolipid w większym stopniu niż galakto- i fosfolipidy chroni czynnik CF₁ przed inaktywacją wywołaną chłodem (75). Sulfolipid jest też niezbędny w reakcjach ciemnych fotosyntezy (70, 76). *Chlorella pyrenoidosa* hodowana w ciemności nie zawiera sulfolipidu (70) i w tych warunkach zahamowana jest aktywność fosforybulozokinazy (70, 76). Ponieważ sulfolipid nie wpływa na aktywność wyizolowanego enzymu przypuszcza się, że jest on *in vivo* miejscem wiązania enzymu (70, 76).

VI. Wolne kwasy tłuszczowe

VI-1. Oddziaływanie kwasów tłuszczowych z błonami

Egzogenne kwasy tłuszczowe wpływają wprawdzie na strukturę i funkcje chloroplastów, ale nie są one tak efektywne jak endogenne, uwalniane przez lipazy (77, 78). Prawdopodobnie jest to spowodowane trudniejszą dostępnością związku podanego z zewnątrz w porównaniu z endogennym. Tylko kwasy tłuszczowe co najmniej 12-węglowe mogą oddziaływać z błonami chloroplastów, przy czym najbardziej efektywny jest kwas linolenowy (79—84). Dla skuteczności działania istotne jest nie tyle stężenie kwasu tłuszczowego, co stosunek molowy kwas tłuszczowy/chlorofil,

a właściwie związany z błonami kwas tłuszczowy/chlorofil (81, 83). Wiązanie to ma charakter kooperatywny, ponieważ zdolność chloroplastów do wiązania kwasów tłuszczowych rośnie ze wzrostem ilości związanego już kwasu tłuszczowego (83). Asocjacja kwasu z błoną może mieć charakter oddziaływania elektrostatycznego. Prawdopodobnie kwas tłuszczowy najpierw asocjuje z powierzchnią błony, a potem przenika do jej wnętrza (83).

Przed destrukcyjnym wpływem kwasów tłuszczowych na strukturę i funkcje chloroplastów zabezpiecza je albumina (11, 18, 80). Efektywność jej działania maleje ze wzrostem stężenia kwasów (83). Natomiast niecałkowita odwracalność przez albuminę zmian w strukturze organeli i ich aktywnościach, wynika z niecałkowitego związania kwasów tłuszczowych przez to białko (83). Skuteczność działania albuminy jest większa gdy jej dodanie poprzedza dodanie kwastów tłuszczowych (81, 85). Podobny efekt obserwuje się w przypadku działania endogennych kwasów tłuszczowych uwolnionych przez galaktolipazę. Efektywność działania albuminy zwiększa się, gdy jej dodanie poprzedza dodanie enzymu (19) lub gdy zmniejszy się szybkość uwalniania kwasów tłuszczowych dodając kolejno małe ilości galaktolipazy zamiast tę samą ilość enzymu jednorazowo (5). Prawdopodobnie w przypadku dodania enzymu w pierwszej kolejności, albumina ma lepsze możliwości współzawodniczenia z błonami o uwolnione kwasy tłuszczowe (86). Wydaje się bowiem, że działanie albuminy polega na wiązaniu kwasów tłuszczowych, uniemożliwiającym im oddziaływanie na błony (86). W związku z tym hamujący wpływ egzogennych kwasów tłuszczowych jest łatwiej odwracany przez albuminę niż spowodowany przez endogenne kwasy tłuszczowe (5).

VI-2. Kwasy tłuszczowe a struktura chloroplastów

W obecności kwasów tłuszczowych w miarę wzrostu stosunku kwasu tłuszczowego/chlorofilu obserwowano stopniowe naruszanie struktury chloroplastów — pęcznienie tylakoidów (6, 81, 87), a następnie zanik struktury gran (6, 81). Albumina wiążąc kwasy tłuszczowe w znacznym stopniu przywraca regularną strukturę chloroplastów (85) (Ryc. 9).

VI-3. Kwasy tłuszczowe a fotosynteza

Zarówno PS II, jak i PS I jest wrażliwy na działanie kwasów tłuszczowych (88, 89), jednak oba układy fotosyntezy charakteryzuje różna wrażliwość (18, 19, 90). Do zahamowania aktywności PS II w 50% w optymalnych warunkach wystarcza stosunek kwas tłuszczowy/chlorofil = 1, natomiast dla PS I 16,5 (90). W PS II stwierdzono dwa miejsca działania kwasów tłuszczowych: w kompleksie rozszczepiającym wodę oraz za miejscem donorowym DPC (18, 19). Działanie kwasów tłuszczowych na kom-

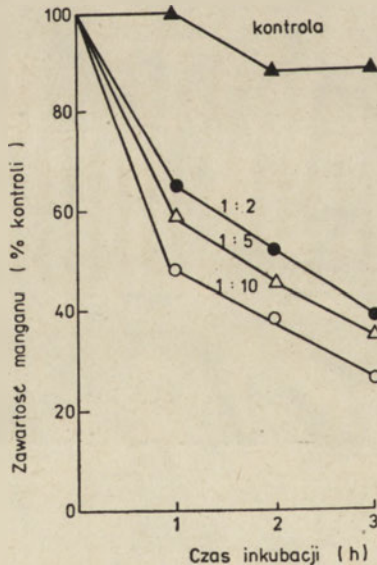


Ryc. 9. Wpływ egzogenego kwasu linolenowego na strukturę chloroplastów szpinaku. Chloroplasty inkubowano w temperaturze pokojowej w ciągu 30 min. z różnymi stężeniami kwasu tłuszczowego (6). A) Kontrola (bez kwasu linolenowego), pow. 30 000 ×. B) Kwas linolenowy : chlorofil = 1 : 5, pow. 14 000 ×. C) Kwas linolenowy : chlorofil = 1 : 2, pow. 14 000 ×. D) Kwas linolenowy : chlorofil = 1 : 1, pow. 14 000 ×. E) Kwas linolenowy : chlorofil = 1 : 1, BSA 2 mg/ml, pow. 14 000 ×.



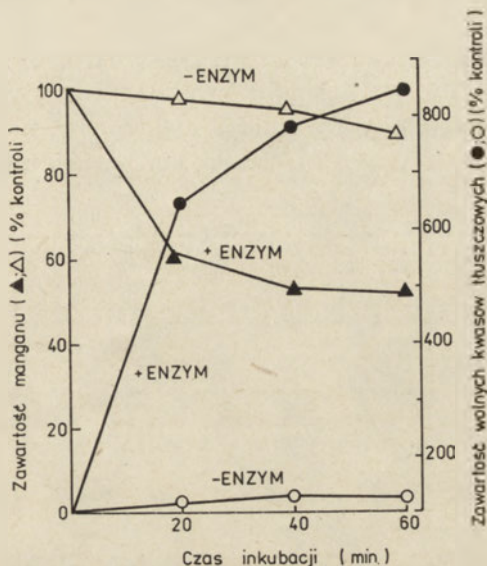


pleks rozszczepiający wodę polega na indukowaniu uwalniania z błon tylakoidów jednego z jego składników tj, manganu luźno związanego z błonami (18, 91—93). Działanie takie jest charakterystyczne zarówno dla kwasów egzogennych (Ryc. 10), jak i endogennych uwalnianych w wy-



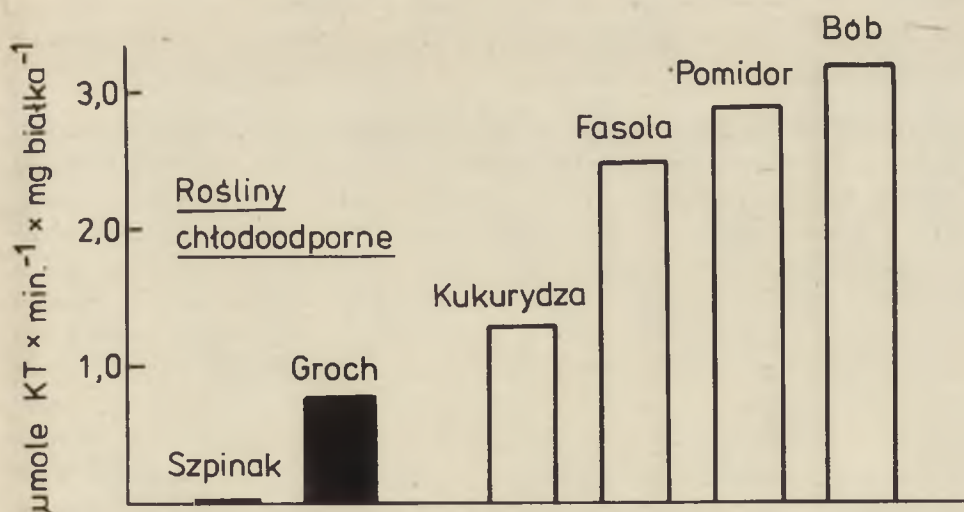
Ryc. 10. Wpływ kwasu linolenowego na zawartość manganu w chloroplastach szpinaku (93). W doświadczeniach stosowano chlorofil: KT w zakresie 1:2—1:10.

niku działania egzogennej galaktolipazy (Ryc. 11) (93) lub nagromadzających się w czasie przechowywania liści roślin chłodowrażliwych w chłodzie (0°C) i ciemności (91—94). Wydaje się, że czynnikiem uwalniającym kwasy tłuszczowe jest działanie endogennej galaktolipazy w tych roślinach, co potwierdza fakt niskiej aktywności tego enzymu w roślinach



Ryc. 11. Wpływ galaktolipazy na poziom wolnych kwasów tłuszczowych i manganu w chloroplastach szpinaku (93).

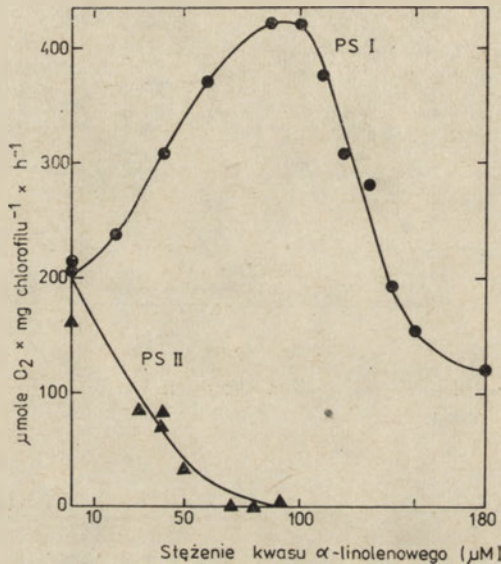
Rośliny chłodowrażliwe



Rys. 12. Porównanie aktywności galaktolipazy w chloroplastach roślin chłodowrażliwych i chłodoodpornych (4).

chłodoodpornych (4) (Ryc. 12), w których nie obserwowano nagromadzenia się kwasów tłuszczowych w analogicznych warunkach (93, 94). Wolne kwasy tłuszczowe są czynnikiem indukującym uwalnianie manganu z błon i w konsekwencji zahamowanie reakcji Hilla (93). Reaktywację zapewnia naświetlanie liści w ciągu 2 godzin (94), czemu towarzyszy ponowne wbudowanie manganu i kwasów tłuszczowych w błony tylakoidów.

Wpływ kwasów tłuszczowych na PS I jest bardziej zróżnicowany (18). Przy niskich stężeniach tj. stosunku kwas tłuszczowy/chlorofil = 1:10 — 1:1 obserwuje się stymulację transportu elektronów, natomiast przy wyższych 1:1 — 2:1 spadek (Ryc. 13). Wzrost aktywności może wynikać z roz-



Ryc. 13. Wpływ kwasu linolenowego na aktywności fotochemiczne chloroplastów szpinaku (18).

przeżenia transportu elektronów (81, 83, 85). W dużym stopniu bowiem efekt ten jest znoszony w obecności związku rozprzegającego, metyloaminy (83). Indukowana przez kwasy tłuszczowe zmiana struktury błony powoduje ponadto zwiększenie reaktywności wobec sztucznych donorów elektronów (18). Natomiast spadek aktywności PS I przy wyższych stężeniach kwasów tłuszczowych wynika z usunięcia z błon plastocyaniny. Dodanie jej powoduje bowiem reaktywację (18). Analogiczne zjawisko stwierdzono w przypadku działania endogennych kwasów tłuszczowych uwolnionych przez galaktolipazę. Przeprowadzono w tym przypadku próbę przywrócenia aktywności przez egzogenne galaktolipidy (17) (Tabela 3). Jednak dodanie monogalaktosylodiacylglicerolu lub digalaktosylodiacylglicerolu (w stosunku ilościowym do chlorofilu 2,5) do liofilizowanych chloroplastów trawionych galaktolipazą lub ekstrahowanych heptanem (95) przywraca tylko częściowo aktywność PS I (17). Dopiero dodanie nasycających ilości

plastocyjaniny przywraca tę aktywność prawie całkowicie, co sugeruje, że działanie galaktolipazy na aktywność PS I polega na usunięciu plastocyjaniny z błon tylakoidów (17, 96). Łatwość przywracania aktywności PS I świadczy o niewielkim uszkodzeniu błony. Ponadto częściowa rekonstrukcja aktywności PS I w chloroplastach traktowanych enzymem zachodzi bez względu na obecność kwasów tłuszczowych uwolnionych w czasie trawienia (17).

Tabela 3

Przywracanie aktywności PS I przez galaktozydylacyloglicerole i plastocyjaninę w liofilizowanych chloroplastach szpinaku trawionych galaktolipazą (17)

+MGDG lub DGDG ($\mu\text{mole/mg}$ chlorofilu)	Aktywność: TMPD \rightarrow MV			
	($\mu\text{mole O}_2 \times \text{mg}$ chlorofilu $^{-1} \times \text{h}^{-1}$)	% kon- trolli	($\mu\text{mole O}_2 \times \text{mg}$ chlorofilu $^{-1} \times \text{h}^{-1}$) +PCy	% kon- trolli
—	483	100		
—	124	26	269	56
2,5 MGDG	199	41	379	78
2,5 DGDG	199	41	380	79
2,5 MGDG + DGDG	212	44	396	82

Na działanie egzo- i endogennych kwasów tłuszczowych wrażliwa jest również synteza ATP (5, 21, 90). Hamowanie cyklicznej i niecyklicznej fotofosforylacji przez kwasy tłuszczowe wynika z ich właściwości rozprężających na ten proces (81, 83, 85) oraz zahamowania transportu elektronów z powodu uwolnienia manganu (92, 93) i plastocyjaniny (17) z błon tylakoidów.

Znany jest także wpływ egzogennych kwasów tłuszczowych na reakcje ciemne fotosyntezy (20). Wpływają one bowiem hamująco na karboksylazę rybulozo-1,5-bisfosforanu, fosfatazę-1,6-bisfosforanu i sedoheptulozo-1,7-bisfosforanu oraz na skutek zahamowania fotofosforylacji, na kinazę rybozo-5-fosforanu i reakcje syntezy sacharozy i polisacharydów z cukrów prostych (20).

VII. Uwagi końcowe

W fotosyntetyzujących roślinach zielonych lipidy są aktywnymi metabolitami (10, 97). Ich biosynteza i degradacja jest kontrolowana przez szereg czynników m.in. przez warunki świetlne, temperaturę, dostępność tlenu i ATP (81). Wydaje się, że na strukturę i funkcje chloroplastów wpływają głównie zmiany poziomu lipidów, a właściwie stosunku

chlorofil/(galakto)lipidy/wolne kwasy tłuszczowe (84). Szczególnie wyraźne są one podczas starzenia izolowanych chloroplastów (77—80, 91, 98—103) i w czasie przechowywania liści roślin chłodowrażliwych w chłodzie i ciemności (91—93, 104, 105). Procesowi temu towarzyszy m.in. ubytek galakto-lipidów i wyraźny wzrost poziomu wolnych, zwłaszcza nienasyconych kwasów tłuszczowych (92, 93, 94). Na skutek nagromadzenia się kwasów tłuszczowych spowodowanego hydrolizą lipidów błonowych zachodzą zmiany analogiczne do opisanych wcześniej. Są to zarówno zmiany strukturalne, jak i dotyczące transportu elektronów, syntezy ATP i cyklu Calvina. (Bardziej szczegółowy opis zmian zachodzących w chloroplastach w czasie ich starzenia znajdzie czytelnik w opublikowanym przed kilku laty artykule przeglądowym Wolińskiej (106).)

Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania Panu Prof. Zbigniewowi Kaniudze za zachęcenie mnie do napisania niniejszej pracy oraz cenne uwagi podczas jej przygotowania.

Część badań przedstawionych w artykule wykonano w ramach problemu węzłowego nr 10.2.10. i międzyresortowego MR-II/15 oraz MR-II/7.

Zaakceptowano do druku 21.03.1984

PIŚMIENNICTWO

1. Unitt M. D., Harwood J. L., (1982) w *Developments in Plant Biology*, red. Wintermans J. F. G. M., Kuiper P. J. C., t. 8, str. 359—362, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
2. Anderson J. M., (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **416**, 191—235.
3. Nishihara M., Yokota K., Kito M., (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **617**, 12—19.
4. Kaniuga Z., Gemel J., (1984) *FEBS Lett.*, **171**, 55—58.
5. Shaw A. B., Anderson M. M., McCarty R. E., (1976) *Plant Physiol.*, **57**, 724—729.
6. Okamoto T., Katoh S., Satoru M., (1977) *Plant Cell Physiol.*, **18**, 551—560.
7. Sen A., Williams W. P., Brain A. P. R., Quinn P. J., (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **685**, 297—306.
8. Radunz A., (1969) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 411—417.
9. Hirayama O., Matsui T., (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **423**, 540—547.
10. Galliard T., (1979) w *Developments in Plant Biology*, red. Appelqvist L. A., Liljenberg C., t. 3, str. 121—132, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
11. Rawyler A., Siegenthaler P. A., (1980) w *Developments in Plant Biology*, red. Mazliak P., Benveniste P., Costes C., Douce R., t. 6, str. 117—120, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
12. Rawyler A., Siegenthaler P. A., (1980) *Eur. J. Biochem.*, **110**, 179—187.
13. Rawyler A., Siegenthaler P. A., (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **638**, 30—39.

14. Rawyler A., Siegenthaler P. A., (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **635**, 348—358.
15. Krupa Z., (1981) *Wiad. bot.*, **25**, 7—18.
16. Costes C., Bazier R., (1971) w Second International Congress on Photosynthesis, str. 1635—1645, Stresa.
17. Krupa Z., Baszyński T., (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **408**, 26—34.
18. Golbeck J. H., Martin I. F., Fowler C. F., (1980) *Plant Physiol.*, **65**, 707—713.
19. Michalski W. P., Kaniuga Z., (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **589**, 84—89.
20. Pedersen T. A., Kirk M., Bassham J. A., (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, **112**, 189—203.
21. Wintermans J. F. G. M., Helmsing P. J., Polman B. J. J., Van Gisbergen J., Collard J., (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 95—105.
22. Vigo C., Goni F. M., Quinn P. J., Chapman D., (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **508**, 1—14.
23. Restall C. J., Williams P., Percival M. P., Quinn P. J., Chapman D., (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **555**, 119—130.
24. Bishop D. G., Kenrick J. R., Coddington J. M., Johns S. R., Willing R. T., (1982) w *Developments in Plant Biology*, red. Wintermans J. F. G. M., Kuiper P. J. C., t. 8, str. 339—344, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
25. Douce R., Joyard J., (1980) w *The Biochemistry of Plants*, red. Stumpf P. K., Conn E. E., t. 4, str. 321—362, Academic Press, New York.
26. Sastry P. S., Kates M., (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 231—233.
27. Webster D. E., Chang S. B., (1969) *Plant Physiol.*, **44**, 1523—1527.
28. Heinz E., (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, **144**, 321—332.
29. Critchley C., Heinz E., (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **326**, 184—193.
30. Heinz E., (1974) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 612—616.
31. Galliard T., (1968) *Phytochemistry*, **7**, 1907—1914.
32. Galliard T., (1968) *Phytochemistry*, **7**, 1915—1922.
33. Allen C. F., Good P., Davis H. H., Fowler S. D., (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 424—430.
34. McCarty R. E., Jagendorf A. T., (1965) *Plant Physiol.*, **40**, 725—735.
35. Bishop D. G., Andersen K. S., Smillie R. M., (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **231**, 412—414.
36. Heinz E., (1981) *FEBS Lett.*, **124**, 105—111.
37. Henry L. E. A., Mikkelsen J. D., Moller B. L., (1983) *Carlsberg Res. Commun.*, **48**, 131—148.
38. Gardiner S. E., Roughan P. G., (1983) *Biochem. J.*, **210**, 949—952.
39. Heinz E., Roughan P. G., (1983) *Plant Physiol.*, **72**, 273—279.
40. Noda M., Fujiwara N., (1967) *Biochim. Biophys. Acta.*, **137**, 199—201.
41. Safford R., Nichols B. W., (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **210**, 57—64.
42. Auling G., Heinz E., Tulloch A. P., (1971) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 905—912.
43. Anderson M. M., McCarty R. E., Zimmer E. A., (1974) *Plant Physiol.*, **53**, 699—704.
44. Williams W. P., Sen A., Quinn P. J., (1982) *Biochem. Soc. Trans.*, **10**, 335—338.
45. Quinn P. J., Gounaris K., Sen A., Williams W. P., (1982) w *Developments in Plant Biology*, red. Wintermans J. F. G. M., Kuiper P. J. C., t. 8, str. 327—330, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
46. De Gier J., Van Echteld C. J. A., Van Dersteen A. T. M.,

- Noordam P. C., Virkleij A. J., Dukruijff B., (1982) w *Developments in Plant biology*, red. Wintermans J. F. G. M., Kuiper P. J. C., t. 8, str. 315—325, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
47. Gounaris K., Mannock D. A., Sen A., Brain A. P. R., Williams W. P., Quinn P. J., (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **732**, 229—242.
 48. Radunz A., (1979) *Z. Naturforsch*, **34c**, 1199—1204.
 49. Murphy D. J., (1982) *FEBS Lett.*, **150**, 19—26.
 50. Costes C., Brazier R., Burgoffer O., Carrayol E., Deroche M. E., (1975) *Proc. Int. Congr. Photosynth.*, 3rd, Rehovot, Israel, red. Avron M., str. 2049—2060, t. 3, Elsevier, Amsterdam.
 51. Gause G. F., Dudnik Yu. V., Laiko A. V., Metyksa E. M., (1967) *Science*, **157**, 1191—1197.
 52. Quinn P. J., Williams W. P., (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **737**, 223—266.
 53. Erwin J., Bloch K., (1964) *Science*, **143**, 1006—1012.
 54. Ostrovskaya L. K., Kochubey S. M., Yakovenko A. M., (1971) w *Second International Congress on Photosynthesis*, str. 1617—1630, Stresa.
 55. Kochubei S. M., Shadchina T. M., Kononenko A. A., Lukashev E. P., Timofeev K. N., Matorin D. N., (1975) *Photosynthetica*, **9**, 255—260.
 56. Benson A. A., (1964) *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **15**, 1—16.
 57. Roughtan P. G., (1970) *Biochem. J.*, **117**, 1—8.
 58. Harwood J. L., (1980) w *The Biochemistry of Plants*, red. Stumpf P. K., Conn E. E., t. 4, str. 1—55, Academic Press, New York.
 59. Hirayama O., Nomotobori T., (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **502**, 11—16.
 60. Nichols B. W., (1965) *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 274—279.
 61. Haverkate F., Van Deenen L. L. M., (1965) *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 78—92.
 62. Foley A. A., Harwood J. L., (1982) w *Developments in Plant Biology*, red. Wintermans J. F. G. M., Kuiper P. J. C., t. 8, str. 331—334, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
 63. Murata N., (1983) *Plant Cell Physiol.*, **24**, 81—86.
 64. Duval J. C., Trémolierès A., Dubacq J. P., (1979) *FEBS Lett.*, **106**, 414—418.
 65. Trémolierès A., Dubacq J. P., Ambard-Bretteville F., Remy R., (1981) *FEBS Lett.*, **130**, 27—31.
 66. Trémolierès A., Dubacq J. P., Duval J. C., Lemoine Y., Remy R. (1982) w *Developments in Plant Biology*, red. Wintermans J. F. G. M., Kuiper P. J. C., t. 8, str. 369—372, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
 67. Remy R., Trémolierès A., Duval J. C., Ambard-Bretteville F. Dubacq J. P. (1982) *FEBS Lett.*, **137**, 271—275.
 68. Harwood J. L., James A. T. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **50**, 325—334.
 69. Nicholls R. G., Harwood J. L. (1978) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1125.
 70. Harwood J. L. (1980) w *The Biochemistry of Plants*, red. Stumpf P. K., Conn E. E., t. 4, str. 301—320, Academic Press, New York.
 71. Heise K. P., Jacobi G. (1973) *Z. Naturforsch*, **28c**, 120—127.
 72. Leech R. M., Rumsby M. G., Zhomson W. W. (1973) *Plant Physiol*, **52**, 240—245.
 73. Miyachi S., Miyachi S. (1966) *Plant Physiol.*, **41**, 479—486.
 74. Krupa Z., Baszyński T. (1977) *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol.*, **25**, 409—413.

75. Livne A., Racker E. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 1332—1338.
76. Sinensky M. (1977) *J. Bacteriol.*, **129**, 516—524.
77. Constantopoulos G., Kenyon C. N. (1968) *Plant Physiol.*, **43**, 531—536.
78. Siegenthaler P. A., Rawyler A. (1977) *Plant Sci. Lett.*, **9**, 265—273.
79. Krogmann D. W., Jagendorf A. T. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 421—430.
80. Siegenthaler P. A., (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 182—191.
81. Molotkovsky Y. G., Zhestkova I. M. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, **112**, 170—172.
82. Siegenthaler P. A. (1973) *FEBS Lett.*, **39**, 337—340.
83. Okamoto T., Katoh S. (1977) *Plant Cell Physiol.*, **18**, 539—550.
84. Siegenthaler P. A., Horakova J. (1975) w *Proc. Int. Congr. Photosynth.*, 3rd, Rehovot, Israel, red. Avron M., str. 655—664, t. 1, Elsevier, Amsterdam.
85. Cohen N. S., Nathanson B., White J. E., Brody M. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.*, **135**, 21—27.
86. Friedlander M., Neumann J. (1968) *Plant Physiol.*, **43**, 1249—1254.
87. Brody M. (1974) w *Biomembranes, Architecture, Biogenesis, Bioenergetics and Differentiation*, red. Packer L., str. 331—351, Academic Press, New York.
88. Brody S. S., Brody M., Doring G. (1970) *Z. Naturforsch.*, **25b**, 367—372.
89. Siegenthaler P. A., Depéry F. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **61**, 573—580.
90. Siegenthaler P. A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 153—162.
91. Kaniuga Z., Ząbek J., Sochanowicz B. (1978) *Planta*, **144**, 49—56.
92. Kaniuga Z., Gemel J., Madzio B. (1982) Second European Bioenergetics Conference, Lyon, Short Reports, str. 489—490.
93. Kaniuga Z., Gemel J., Zabłocka B. (1984) praca zgłoszona do druku w *Biochim Biophys. Acta*.
94. Kaniuga Z., Michalski W. (1978) *Planta*, **140**,⁴ 129—136.
95. Krupa Z., Baszyński T. (1978) *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol.*, **26**, 885—889.
96. Krupa Z. (1982) *Photosyn. Res.*, **3**, 95—104.
97. Heise K. P., Harnischfeger G. (1979) w *Developments in Plant Biology*, red. Appelqvist L. A., Liljenberg C., t. 3, str. 1975—1980, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
98. Wasserman A. R., Fleischer S. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 154—169.
99. Kulandaivelu G., Hall D. O. (1976) *Z. Naturforsch.*, **31c**, 452—455.
100. Kulandaivelu G., Hall D. O. (1976) *Z. Naturforsch.*, **31c**, 82—84.
101. Siegenthaler P. A., Depéry F. (1977) *Plant Cell Physiol.*, **18**, 1047—1055.
102. Siegenthaler P. A., Rawyler A., Henry L. E. A. (1981) w *Photosynthesis II. Electron Transport and Photophosphorylation*, red. Akoyunoglou G., str. 167—174, Balaban Intern. Science Services, Philadelphia.
103. Henry L. E. A., Siegenthaler P. A., (1981) w *Photosynthesis III. Structure and Molecular Organization of the Photosynthetic Apparatus*, red. Akoyunoglou G., str. 567—576, Balaban Intern. Science Services, Philadelphia.

104. Kaniuga Z., Sochanowicz B., Ząbek J., Krzystyniak K. (1978) *Planta*, **140**, 121—128.
105. Kaniuga Z. (1981) *Pol. ecol. Stud.*, **7**, 349—363.
106. Wolińska D. (1975) *Wiad. bot.*, **19**, 165—180.

Biosynteza glikosfingolipidów

Biosynthesis of glycosphingolipids

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Biosynteza ceramidu
- III. Glikozylacja ceramidu
 - III-1. Biosynteza monoheksyloceramidów
 - III-2. Biosynteza złożonych glikosfingolipidów
- IV. Miejsce biosyntezy glikosfingolipidów w komórce oraz transport glikosfingolipidów do błony plazmatycznej
 - IV-1. Rozmieszczenie glikosfingolipidów w komórce
 - IV-2. Rozmieszczenie transferaz cukrowych w komórce
 - IV-3. Biosynteza glikosfingolipidów w komórce i umiejscowienie związków prekursorowych
 - IV-4. Transport gangliozydów z miejsca glikozylacji do powierzchni komórki
 - IV-5. Biogeneza błony plazmatycznej i mechanizm transportu składników błonowych z miejsca biosyntezy do powierzchni komórki
- V. Regulacja biosyntezy glikosfingolipidów
- VI. Biosynteza glikosfingolipidów w organizmach rozwijających się oraz w tkankach nowotworowych
- VII. Podsumowanie

Contents

- I. Introduction
- II. Biosynthesis of ceramide
- III. Glycosylation of ceramide
 - III-1. Biosynthesis of monohexosylceramides
 - III-2. Biosynthesis of complex glycosphingolipids

*) Dr., Zakład Biochemii I. H., 00-957 Warszawa, ul. Chocimska 5

Gal — galaktoza, Glc — glukoza, Fuk — fukoza, GalNAc — N-acetylogalaktozamina, GlcNAc — N-acetyloglukozamina, NANA — kwas N-acetylneuraminowy.

Symbole cyfrowe stosowane przy opisie kwasów tłuszczowych (np. 24:1) oznaczają kolejno ilość atomów węgla w cząsteczce oraz ilość wiązań podwójnych w łańcuchu węglowodorowym. Przy opisie gangliozydów stosowano nazewnictwo opracowane przez Svennerholma (1), (patrz ryc. 3), GA1 — asjalo GM1, GA2 — asjalo GM1, Cer — ceramid.

IV. Site of biosynthesis of glycosphingolipids in cells and translocation of glycosphingolipids to the plasma membrane

IV-1. Subcellular distribution of glycosphingolipids

IV-2. Subcellular distribution of glycosyltransferases

IV-3. Biosynthesis of glycosphingolipids in cells and the localization of precursor compounds

IV-4. Translocation of gangliosides from the site of glycosylation to the cell surface

IV-5. Biogenesis of plasma membrane. Mechanism of transport of plasma membrane elements from the site of biosynthesis of the cell surface

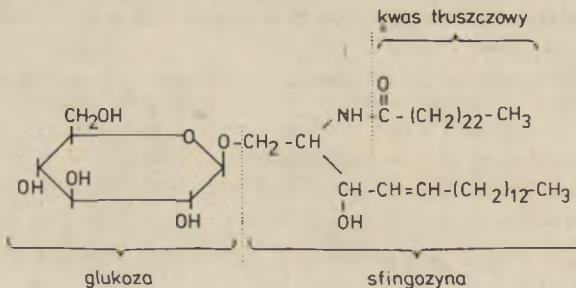
V. Regulation of the biosynthesis of glycosphingolipids

VI. Biosynthesis of glycosphingolipids in developing organisms and in neoplastic tissues

VII. Summary

I. Wstęp

Cząsteczka glikosfingolipidu zbudowana jest z kwasu tłuszczowego, długołańcuchowej zasady organicznej sfingozyzny oraz fragmentu sacharydowego (2—4). Sfingozyzna razem z kwasem tłuszczowym tworzy część zwaną ceramidem (Ryc. 1). Glikosfingolipidy tworzą liczną i niejednorodną



Ryc. 1. Struktura chemiczna glukozyloceramidu, jednego z najprostszych glikosfingolipidów

grupę związków różniących się między sobą ciężarem cząsteczkowym, składem i strukturą. Ze względu na budowę łańcuchów cukrowych glikosfingolipidy zwierzęce dzieli się na glikosfingolipidy obojętne, gangliozydy i glikosfingolipidy siarczanowe (sulfatydy). Glikosfingolipidy obojętne zawierać mogą w cząsteczce glukozę, galaktozę, N-acetyloglucozaminę, N-acetylogalaktozaminę i fukozę. Gangliozydy charakteryzują się dodatkowo obecnością kwasu sjałowego, zaś sulfatydy obecnością reszt siarczanowych. Ostatnio zalecana klasyfikacja glikosfingolipidów bierze pod uwagę strukturę chemiczną tetraglikozyloceramidów (Tab. 1).

Glikosfingolipidom przypisuje się ważne funkcje biologiczne. Przyпуска się, że związki te jako składniki błony plazmatycznej biorą udział

Tabela 1.

Struktura chemiczna tetrasacharydoceramidów glikosfingolipidów „ganglio”, „globo”, „globoizo”, „lakto” i „laktoneo”

Nazwa glikosfingolipidu	Struktura chemiczna tetraglikozyloceramidu
„ganglio”	Gal β (1—3)-GalNAc β (1—4)-Gal β (1—4)-Glc-Cer
„globo”	GalNAc β (1—3)-Gal α (1—4)-Gal β (1—4)-Glc-Cer
„globoizo”	GalNAc β (1—3)-Gal α (1—3)-Gal β (1—4)-Glc-Cer
„lakto”	Gal β (1—3)-GlcNAc β (1—3)-Gal β (1—4)-Glc-Cer
„laktoneo”	Gal β (1—4)-GlcNAc β (1—3)-Gal β (1—4)-Glc-Cer

W tabeli wymieniono grupy glikosfingolipidów omawiane w tej pracy. Dokładną klasyfikację glikosfingolipidów znajdzie czytelnik w pracy Sweeley'a i Siddiqui (2).

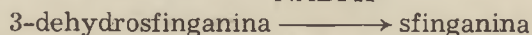
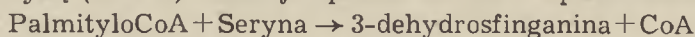
w przekazywaniu informacji ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórek. Wiele spośród glikosfingolipidów erytrocytów człowieka opisanych zostało jako powierzchniowe antygeny grupowe (4). Szereg gangliozydów pełni funkcje receptorów takich substancji jak toksyny (5, 6), hormony (7, 8), interferon (9), fibronektyna (10) czy białka wirusa grypy (11). Znane są prace wskazujące, że gangliozydy błony plazmatycznej biorą udział w procesie rozpoznawania się komórek (12). W tkance nerwowej związki te wiążąc jony wapnia uczestniczą przypuszczalnie w transmisji synaptycznej (13). Prowadzone są aktualnie badania nad rolą gangliozydów w transformacji limfocytów (14, 15), a także nad udziałem glikosfingolipidów w procesie cytolizy komórek obcych przez układ limfocytarny organizmów zwierzęcych (16-18).

Biosynteza glikosfingolipidów rozpoczyna się utworzeniem fragmentu lipidowego, do którego dołączane są kolejno pojedyncze reszty cukrowe. Ostateczna struktura chemiczna glikosfingolipidów uwarunkowana jest specyficznością oraz kolejnością działania enzymów syntetyzujących. Niższa praca poświęcona została biosyntezie glikosfingolipidów. W rozdziałach II i III omówione zostaną reakcje enzymatyczne związane z powstawaniem oraz glikozylacją ceramidu. W rozdziałach IV, V i VI przedstawione zostaną najnowsze poglądy na przebieg biosyntezy glikosfingolipidów w żywej komórce, omówiony zostanie także problem transportu glikosfingolipidów z miejsca biosyntezy do błony komórkowej oraz problem regulacji biosyntezy.

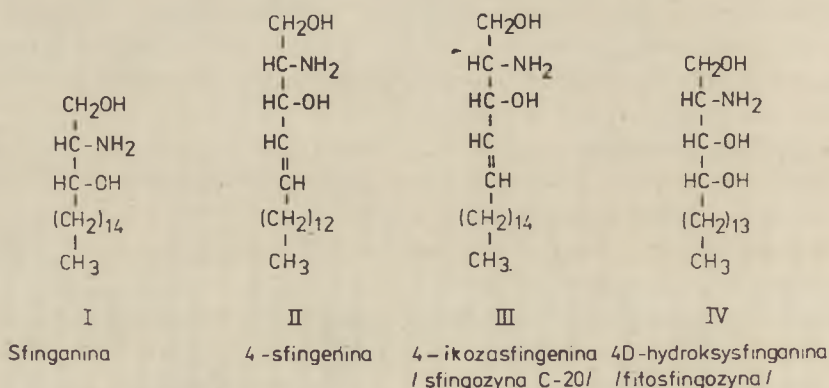
II. Biosynteza ceramidu

W latach 50-tych zaobserwowano, że sfingolipidy powstają przy udziale octanu i seryny (19, 20). Brady i Koval (21) byli pierwszymi, którym udało się przeprowadzić biosyntezę długołańcuchowej zasady organicznej w preparatach bezkomórkowych. Później stwierdzono, że komórki

drożdży wykorzystują w biosyntezie sfingozyn kwas palmitynowy (16:0) i serynę (22—26). Reakcja opisana została w sposób następujący:



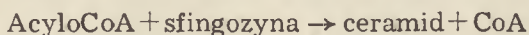
Jeśli w łańcuchu węglowodorowym syntetyzowanego związku wytworzone zostanie wiązanie podwójne, zamiast sfinganiny (Ryc. 2, wzór I) powstaje sfingenina (Ryc. 2, wzór II). Wytworzenie podwójnego wiązania zachodzi albo na etapie palmityloCoA (23, 24, 27), albo też po przyłączeniu seryny (28). Seryna i kwas tłuszczowy są także prekursorami sfingozyn w tkankach zwierzęcych (29—31). Sfingozyna zawierająca 20 atomów węgla w cząsteczce (Ryc. 2, wzór III) powstaje z seryny i kwasu tłuszczowego osiemnastowęglowego (31—33). Wiele prac poświęconych zostało powstawaniu sfingozyny zawierającej dodatkowo grupę hydroksylową przy węglu 4 (4-hydroksysfinganiny), znanej pod nazwą fitosfingozyny (Ryc. 2, wzór IV), (34—37). Dotychczasowe prace wskazują, że dołączenie grupy OH do węgla 4 zachodzi bądź drogą hydroksylacji sfinganiny, przebiegającej w obecności tlenu (O₂), bądź też drogą przyłączenia cząsteczki wody do cząsteczki sfinganiny w miejscu wyznaczonym przez wiązanie podwójne (37).



Ryc. 2. Wzory chemiczne najbardziej znanych sfingozyn

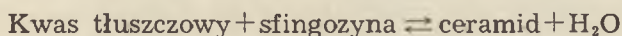
W cząsteczce ceramidu sfingozyna połączona jest z kwasem tłuszczowym wiązaniem amidowym (Ryc. 1). Kwasy tłuszczowe występujące w glikosfingolipidach zwierzęcych zawierają od 16 do 26 atomów węgla w cząsteczce (3, 38). Są to pochodne nasycone lub nienasycone, niektóre z nich wykazują obecność grup hydroksylowych. Do kwasów odnajdywanych w największych ilościach należą: kwas lignocerynowy (24:0), nerwonowy (24:1), palmitynowy (16:0), behenowy (22:0) oraz kwas o nieparzystej liczbie atomów węgla w cząsteczce, 23:0. W niektórych glikosfingolipidach dominują kwasy α-hydroksylowe.

Uważa się obecnie, że główną reakcją w której powstaje ceramid jest przeniesienie kwasu tłuszczowego na sfingozynę przy udziale koenzymu A (39—42):



Wykazano, że tempo biosyntezy ceramidu zależy od struktury kwasu tłuszczowego dołączanego do sfingozyny. W mózgu wykryto cztery różne transferazy reszt acylowych różniące się specyficznością substratową (41).

W innych pracach stwierdzono, że biosynteza ceramidu przebiegać może przy udziale ceramidazy drogą odwrócenia reakcji hydrolizy (43):



Ostatnie badania wskazują jednak, że przemiana ta jeśli w ogóle zachodzi w komórkach jest reakcją nieistotną z punktu widzenia ilościowego (42, 44).

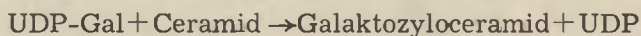
Niedawno opisano w preparatach mózgowych enzym różniący się od opisanej uprzednio transferazy kwasów tłuszczowych i ceramidazy (45). Enzym wykorzystuje jako substrat długołańcuchowy kwas lignocerynowy, wymaga obecności nukleotydu pirymidynowego i jest hamowany przez inhibitory łańcucha oddechowego. ATP i CoA nie przyspieszają powstawania ceramidu, jednak autorzy nie wykluczają możliwości aktywacji kwasu tłuszczowego przy udziale innych, nieznanych obecnie czynników jako warunku reakcji ze sfingozyną.

III. Glikozylacja ceramidu

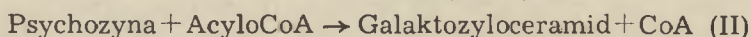
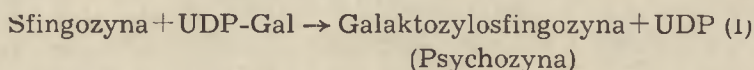
Biosynteza łańcuchów cukrowych glikosfingolipidów przebiega drogą przyłączania pojedynczych reszt cukrowych do związków akceptorowych przy udziale specyficznych glikozylotransferaz (3). Pierwszy cukier przenoszony jest na wolną lub związaną z kwasem tłuszczowym sfingozynę. Do powstałego glikosfingolipidu dołączane są kolejno następne reszty sacharydowe aż do wytworzenia produktu końcowego. Przyjmuje się, że transferazy cukrowe działają w błonowych kompleksach wieloenzymatycznych. Cukry przed wejściem w reakcję ulegają aktywacji przy udziale nukleotydów. Nukleotydylocukry (UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, GDP-Fuk, CMP-NANA) są bezpośrednimi donorami reszt sacharydowych.

III-1. Biosynteza monoheksozyloceramidów

Badania prowadzone przez Basu i wsp. (46—48) wykazały, że w mózgach embrionów kurzych monoheksozyloceramidy powstają przez przyłączenie cukru do ceramidu. Opisano reakcje prowadzące do powstania glukozylu i galaktozyloceramidu:



W innych pracach stwierdzono, że reszty cukrowe mogą być przyłączane także bezpośrednio do sfingozyn (49, 50). Zaproponowano następujący mechanizm biosyntezy galaktozyloceramidu w mózgu szczura (49):



Ponieważ w obecności enzymów tkankowych wolna sfingozyna jest w znacznie większym stopniu przekształcana w ceramid niż w psychozynę, wydaje się że przedstawiony powyżej schemat (reakcje I i II) nie stanowi głównej drogi biosyntezy glikosfingolipidów (50).

Dwa główne monosacharydoceramidy komórek zwierzęcych to glukozylo i galaktozyloceramid (2). W ludzkiej tkance nowotworowej opisano nietypowy związek zawierający fukozę przyłączoną bezpośrednio do ceramidu (51). Monosacharydoceramidy, mimo iż służą w biosyntezie glikosfingolipidów jako akceptory następnych reszt cukrowych, mogą występować w komórkach w postaci wolnej.

III-2. Biosynteza złożonych glikosfingolipidów

W wyniku przyłączenia cząsteczki galaktozy do glukozyloceramidu powstaje laktozyloceramid (46, 52, 53):



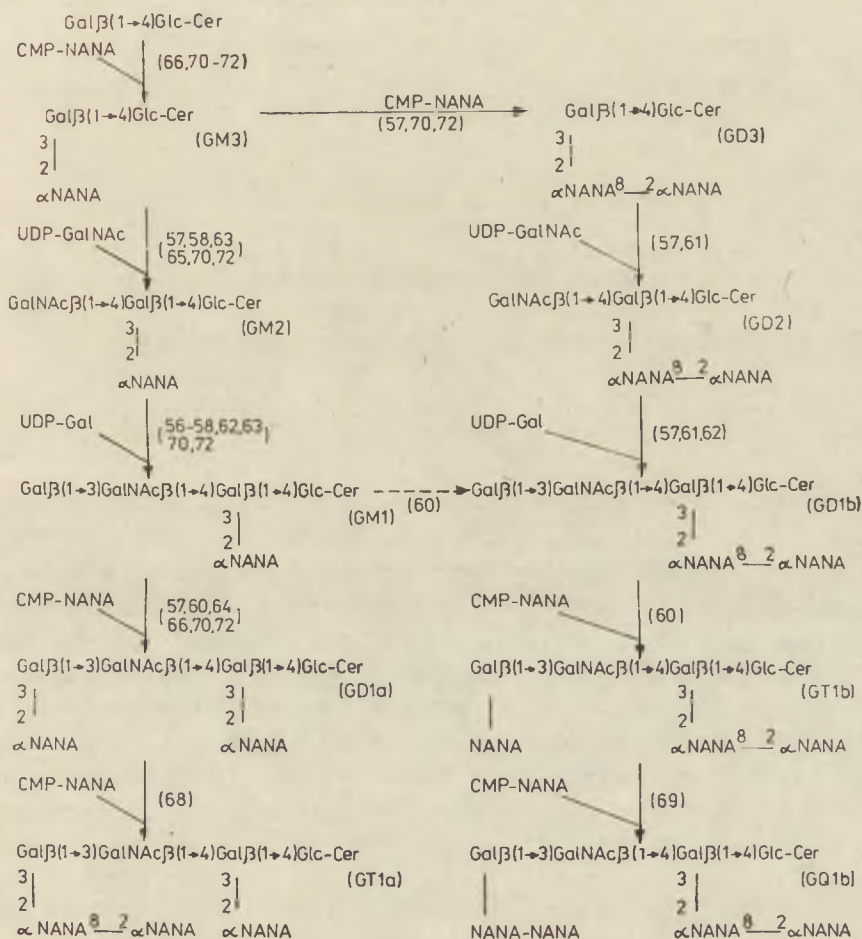
Laktozyloceramid występuje powszechnie w tkankach i płynach ustrojowych ludzi i zwierząt (2). Jest to związek kluczowy w biosyntezie glikosfingolipidów. Laktozyloceramid jest prekursorem glikosfingolipidów typu „ganglio”, „globo”, „globoizo”, „lakto” i „laktoneo” (2, 3), (Tabela 1).

Do glikosfingolipidów typu „ganglio” zaliczana jest liczna rodzina gangliozydów, z których najbardziej znane są gangliozydy GM3, GM2, GM1, GD1a, GD1b i GT1 (54, 55). Gangliozydy grupy „ganglio” występują głównie w mózgu, choć wykrywa się je także w innych tkankach. Do najbardziej rozpowszechnionych gangliozydów tkanek pozamózgowych należą GM3 i GD3 (2, 56).

Hipotetyczny schemat biosyntezy gangliozydów mózgowych zaproponowany został po raz pierwszy przez grupę Rosemana (57, 58). Przedstawiono ciąg reakcji w którym GM3 przekształcany był w GM2, a GM2 w GM1. Sugerowano, że GD3 jest prekursorem GD2, a GD2 prekursorem GD1. GM1 przekształcał się następnie w dwusjalozylogangliozyd GD1a, zaś GD1b w trójsjalozylogangliozyd GT1b. Szczegółowe prace wykazały, że enzymy biorące udział w proponowanych reakcjach obecne są w ko-

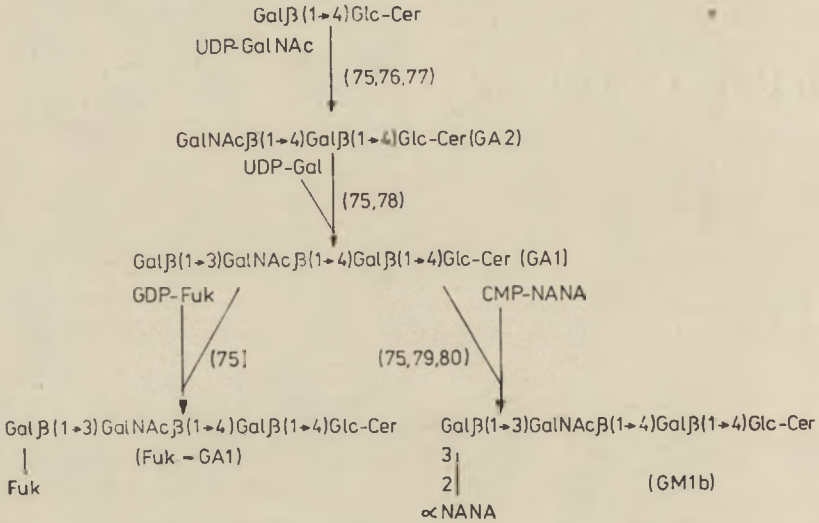
mórkach mózgowych (59—70) oraz pozamózgowych (71—73) różnych zwierząt. Wykryto także sjałozylotransferazę przekształcającą gangliozyd GD1a w GT1a (69) oraz enzym dołączający kwas sjałowy do gangliozydu GT1b z wytworzeniem gangliozydu GQ1b (70), (Ryc. 3).

W komórkach zwierzęcych obecne są również, choć w niewielkich ilościach, glikosfingolipidy „ganglio” nie zawierające kwasu sjałowego (74—76). Enzymatyczne przyłączenie N-acetylo-galaktozaminy do laktozyloceramidu z wytworzeniem gangliotrójheksozyloceramidu przeprowadzili *in vitro* Basu i wsp. (77). Także inni autorzy (78, 79) wykryli enzymy biorące udział w biosyntezie asjałogangliozydów takich jak asjało



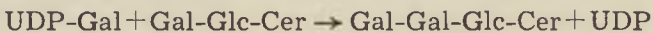
Ryc. 3. Biosynteza gangliozydów mózgowych. Strzałki oznaczają kierunek reakcji. W nawiasach podano odnośniki literaturowe do prac, w których poszczególne reakcje zostały opisane. Linia przerywana oznacza szlak hipotetyczny. Cyfry umieszczone przy liniach łączących jednostki cukrowe określają atomy węgla w pierścieniu cukrowym biorące udział w wytwarzaniu wiązań glikozydowych. Litery greckie α i β oznaczają konfigurację wiązań glikozydowych.

GM2 (GA2), czy asjalo GM1 (GA1). Opisano również transferazę kwasu sjałowego przekształcającą GA1 do gangliozydu GM1b (80, 81) oraz transferazę fukozy syntetyzującą fukozylo-GA1 (76). Schemat biosyntezy glikosfingolipidów typu „ganglio” przebiegającej przy udziale asjałogangliozydów przedstawia ryc. 4. Wszystkie enzymy tego szlaku znaleziono w szpiku kostnym królika (76).



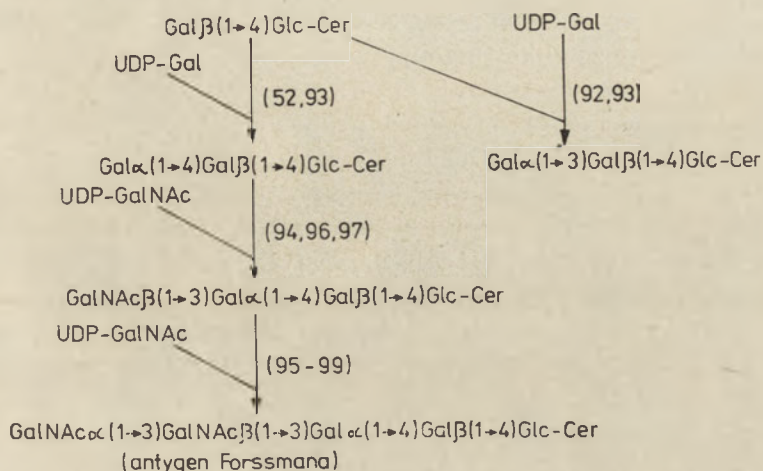
Ryc. 4. Biosynteza glikosfingolipidów „ganglio” przebiegająca drogą asjałogangliozydów. Oznaczenia jak na ryc. 3.

Glikosfingolipidy zaliczane do grupy „globo” i „globoizo” (tabela 1) są szeroko rozpowszechnione w komórkach ludzkich i zwierzęcych (2). Globotetraglikozyloceramid jest głównym glikosfingolipidem erytrocytów człowieka (82, 83) i świni (84). Związek ten opisany został jako krwinkowy antygen grupowy P (85—87). Jego prekursor globotrójheksozyloceramid charakteryzuje się aktywnością grupową P^k (85—87). Znanym glikosfingolipidem typu „globo” jest także antygen Forssmana wykrywany w komórkach wielu zwierząt. Antygen Forssmana jest głównym glikosfingolipidem krwinek czerwonych owcy (89) i kozy (90). Globoizotetraglikozylceramid znaleziono w nerce szczura (91) oraz w tkance nowotworowej wywodzącej się z komórek szczura (92). Biosyntezę trójheksozyloceramidu przeprowadzili *in vitro* Hilderbrandt i Hauser (53), stosując jako źródło enzymu homogenaty śledziony szczura. W reakcji tej transferaza galaktozy przenosiła resztę galaktozy na laktozyloceramid. Typu wiązań w otrzymanym produkcie nie ustalono.



Później wykazano, że mikrosomy śledziony i szpiku kostnego szczura zawierają enzym dołączający galaktozę do laktozyloceramidu wiązaniem

$\alpha(1-3)$, (93). W mikrosomach nerki szczura wykryto enzymy syntetyzujące zarówno „globo” jak i „globoizo” trójheksozyloceramid zawierające wiązanie pomiędzy terminalną i wewnętrzną galaktozą typu (1—4) i (1—3), (94). Transferazę przenoszącą N-acetylogalaktozaminę na globotrójheksozyloceramid z wytworzeniem wiązania glikozydowego typu *beta* znaleziono w mózgu embrionów kurzych (95). W wyniku przyłączenia reszty N-acetylogalaktozaminy do globotetraglikozyloceramidu z wytworzeniem wiązania α powstaje antygen Forssmana. Reakcję syntezy antygeny Forssmana odtwarzano *in vitro* wielokrotnie (96—100). Schemat biosyntezy glikosfingolipidów typu „globo” i „globoizo” przedstawia ryc. 5.



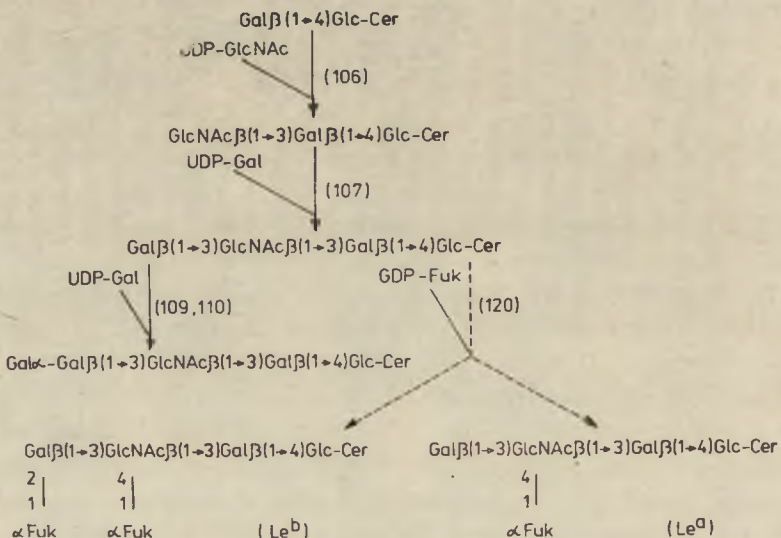
Ryc. 5. Biosynteza glikosfingolipidów „globo” i „globoizo”. Z lewej strony ryciny przedstawiono reakcje prowadzące do powstania glikosfingolipidów „globo”, z prawej — „globoizo”. Oznaczenia jak na ryc. 3.

Do grupy „lakto” i „laktoneo” (tabela 1) zalicza się glikosfingolipidy charakteryzujące się aktywnościami serologicznymi ABH, Le^a , Le^b (101), P_1 (102) oraz Ii (103, 104). Większość z nich to fukoglikosfingolipidy. Wśród glikosfingolipidów „laktoneo” znajdują się gangliozydy zawierające w łańcuchu cukrowym N-acetyloglukozoaminę (105) oraz poliglikozyloceramidy charakteryzujące się obecnością w cząsteczce od 20 do 60 reszt sacharydowych (103, 104, 106). Biosyntezę trójheksozyloceramidu oraz tetraglikozyloceramidu przeprowadzili *in vitro* Basu i wsp. (107) oraz Basu i Basu (108). Dokładnej struktury wiązań glikozydowych w otrzymanych produktach nie udało się autorom ustalić. W surowicy ludzkiej Zieleski i Koscielek (109) wykryli transferazę przenoszącą galaktozę na lakto-trójheksozyloceramid z wytworzeniem wiązania $\beta(1-4)$. Enzym ten zidentyfikowany został jako komponenta A syntazy laktozy (EC 2.4.1.90). Transferazy biorące udział w biosyntezie glikosfingolipidów grupowych układu ABO i Lewis opisano w kilku laboratoriach. W szpiku kostnym

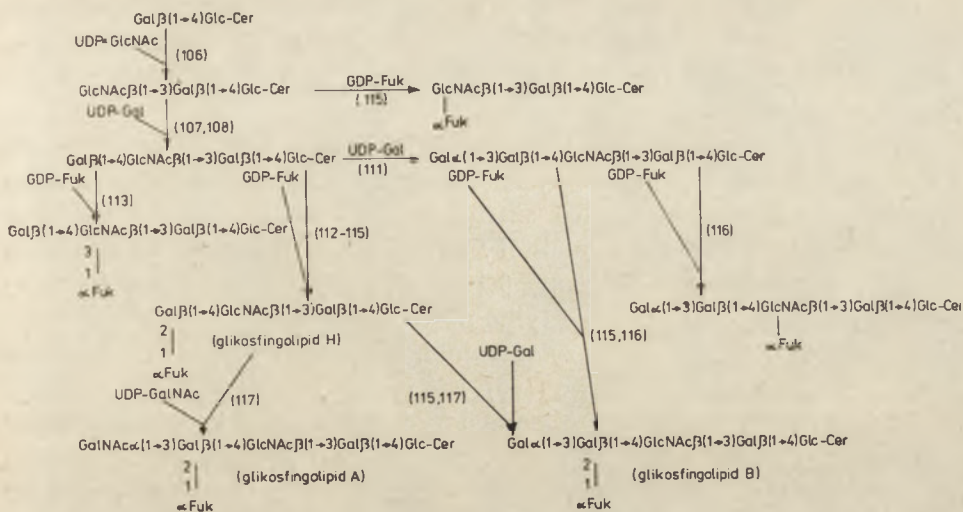
królika a także w innych tkankach zwierzęcych znaleziono enzym przenoszący resztę galaktozy na terminalny cukier laktotetraglikozyloceramidu z wytworzeniem wiązania glikozydowego typu α (110—113). Powstający w tej reakcji pentaglikozyloceramid, mimo braku fukozy wykazuje aktywność grupową B. Biosyntezę glikosfingolipidu grupowego H prześledzono w innych pracach. Transferazę fukozy przenoszącą fukozę na terminalną galaktozę laktoneotetraglikozyloceramidu z wytworzeniem wiązania $\alpha(1 - 2)$ znaleziono w tkankach ludzkich i zwierzęcych (112, 114—116). Przez przyłączenie fukozy wiązaniem $\alpha(1 - 2)$ do przedostatniej galaktozy laktoneopentaglikozyloceramidu otrzymano glikosfingolipid grupowy B (117). Antygeny A i B zsyntetyzowano także przenosząc enzymatycznie odpowiednio resztę N-acetylalaktozoaminy i galaktozy na terminalną galaktozę glikosfingolipidu grupowego H (118).

Komórki zwierzęce zawierają oprócz $\alpha(1 - 2)$ fukozylotransferazy biorącej udział w tworzeniu antygenów grupowych ABH, enzymy dołączające fukozę do N-acetylglukozaaminy związków akceptorowych. Antygeny Lewis (Le^a i Le^b), które zaliczane są do grupy „lakto” charakteryzują się obecnością fukozy przy węglu 4 N-acetylglukozaaminy (4, 119, 120). Związki te otrzymano przenosząc enzymatycznie fukozę na glikosfingolipidy izolowane z krwinek ludzkich (121). Znane są także przypadki przyłączania fukozy do N-acetylglukozaaminy glikosfingolipidów grupy „laktoneo” z wytworzeniem wiązania (1 — 3), (114, 117, 122). Schemat biosyntezy glikosfingolipidów „lakto” i „laktoneo” przedstawiają ryc. 6 i 7.

Odrębną grupę glikosfingolipidów stanowią sulfatydy zawierające w łańcuchach cukrowych reszty siarczanowe (2, 123). Najbardziej znanym sulfatydem jest siarczan galaktozyloceramidu obecny w dużych ilościach

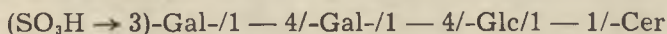


Ryc. 6. Biosynteza glikosfingolipidów „lakto”. Oznaczenia jak na ryc. 3.

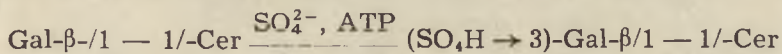


Ryc. 7. Biosynteza glikosfingolipidów „laktoneo”. Oznaczenia jak na ryc. 3.

w mózgu człowieka i zwierząt (2, 123, 124) oraz w gruczołach solnych ptaków (125). Komórki zwierzęce zawierają także sulfatydy będące pochodnymi dwu i trójheksosyloceramidów. W nerce psa wykryto siarczan dwugalaktozyloceramidu (126). Z narządów mięsowych człowieka wyizolowano siarczan laktozyloceramidu (127). Bogatym źródłem sulfatydów jest śluzówka żołądka świni, która obok siarczanu mono i dwuheksosyloceramidu zawiera siarczan trójheksosyloceramidu o budowie (128):



W biosyntezie sulfatydów bierze udział sulfotransferaza, która przenosi resztę siarczanową na węgiel 3 terminalnej galaktozy związku akceptorowego. Siarczan nieorganiczny przed wejściem w reakcję ulega aktywacji przy udziale ATP. Powstający 3-fosfoadenozyl-5-fosfosiarczan jest bezpośrednim donorem reszt siarczanowych. Reakcję opisano na przykładzie glikosfingolipidów zawierających jedną i dwie reszty cukrowe w cząsteczce (129—132):



Odrębny problem stanowi biosynteza glikosfingolipidów wysokocząsteczkowych. Dużo uwagi poświęca się aktualnie enzymom rozgałęziającym złożone łańcuchy cukrowe do których należą β(1 — 3) i β(1 — 6) glukozaminylotransferazy (133—139). B a s u i wsp. (134) dołączyli enzymatycznie N-acetyloglukozaminę do laktoneotetraozyceramidu otrzymując dwa pentaglikozyloceramidy zawierające terminalne sekwencje cukrowe GlcNAc β(1 — 3)-Gal i GlcNAc β(1 — 6)-Gal. Identyczne struktury cukrowe uzyskali Zieleński i Kościelak (138) przy zastosowa-

niu laktozy jako substratu. Ci sami autorzy zsyntetyzowali enzymatycznie czterocukier o budowie GlcNAc $\beta(1 - 6)$ -[GlcNAc $\beta(1 - 3)$]-Gal $\beta(1 - 4)$ -Glc (139). Związek ten zawiera rozgałęzienie typowe dla złożonych glikosfingolipidów.

Wydaje się, że wydłużanie łańcuchów cukrowych drogą przyłączenia pojedynczych reszt sacharydowych obowiązuje w biosyntezie glikosfingolipidów niezależnie od ciężaru cząsteczkowego tworzącego się związku. Wykazano, że transferaza galaktozy przenosząca galaktozę na glukozaminę z wytworzeniem wiązania $\beta(1 - 4)$, obecna w surowicy ludzkiej wykorzystuje jako substrat nie tylko niskocząsteczkowy laktotrójheksozyloceramid, ale także poliglikozyloceramid, w którym chemicznie usunięto końcowe ugrupowania cukrowe (109). Nie można jednak wykluczyć możliwości biosyntezy łańcuchów oligosacharydowych poliglikozyloceramidów lub ich fragmentów przy udziale związków pośredniczących. Wiadomo, że w biosyntezie pewnych glikoprotein (patrz rozdział IV.5) łańcuchy cukrowe przenoszone są na peptydy w postaci gotowych fragmentów oligosacharydowych, syntetyzowanych przy udziale fosforanów dolicholi (140—142). Ciekawe byłoby zbadanie, czy poliglikozyloceramidy i poliglikozylopeptydy (143—145) syntetyzowane są przez te same kompleksy enzymatyczne.

Innym zagadnieniem jest udział glikozydaz w biosyntezie łańcuchów cukrowych glikokoniugatów. Wiadomo, że hydroliza enzymatyczna wiązania glikozydowego jest reakcją odwracalną. W zależności od warunków reszta cukrowa może być przenoszona przez enzym bądź na cząsteczkę wody, bądź też na inny cukier. Aktywność transferazową glikozydaz opisano na przykładzie szeregu enzymów (146, 147). W mózgu szczura znaleziono β -galaktozydazę, która wykorzystując jako donory różne β -galaktozydy przenosiła resztę galaktozy na ceramid (147). W świetle współczesnych badań nie wydaje się jednak, by transglikozylacja katalizowana przez enzymy hydrolityczne odgrywała znaczącą rolę w biosyntezie glikosfingolipidów.

IV. Miejsce biosyntezy glikosfingolipidów w komórce oraz transport glikosfingolipidów do błony plazmatycznej

Przedstawione w rozdziałach II i III szlaki biosyntezy glikosfingolipidów ustalano na podstawie badań enzymatycznych prowadzonych głównie przy zastosowaniu homogenatów tkankowych oraz frakcji subkomórkowych. W wielu laboratoriach pracuje się obecnie nad poznaniem zjawisk towarzyszących biosyntezie glikosfingolipidów w żywej komórce. W tym ujęciu biosynteza glikosfingolipidów staje się zagadnieniem bardzo szerokim, powiązany bezpośrednio z problemem biogenezy błony plazmatycznej.

IV-1. Rozmieszczenie glikosfingolipidów w komórce

Obszerna literatura wskazuje, że glikosfingolipidy występują w komórce na powierzchni błony komórkowej (148—154). Fragmenty ceramidowe służą zakotwiczeniu glikosfingolipidów w błonie, podczas gdy reszty oligosacharydowe wystają do środowiska zewnętrznego tworząc razem z innymi glikokoniugatami warstwę, za pośrednictwem której komórka kontaktuje się z otoczeniem (153, 154).

Badania nad subkomórkowym rozmieszczeniem gangliozydów w komórkach hodowanych *in vitro* wykazują, że około 70-80% tych związków znajduje się w błonie plazmatycznej (155). Powierzchniowe umiejscowienie gangliozydów wykazano znakując bezpośrednio błonę plazmatyczną nadjodanem oraz neuraminidazą, a także drogą pośrednich wyliczeń opartych na reakcji wiązania toksyny cholery przez gangliozyd GM1. Wydaje się, że glikosfingolipidy błony plazmatycznej nie stanowią sztywnych struktur lecz mogą ulegać przemieszczaniu w płaszczyźnie horyzontalnej tworząc mniejsze lub większe skupiska (tzw. *patches* i *caps*, 14). Jest także prawdopodobne, że podatność glikosfingolipidów na działanie czynników zewnętrznych może się zmieniać dzięki obecności glikoprotein maskujących (156—158). Niedawno wykazano, że egzogeny gangliozyd GM1 włączany do błony plazmatycznej komórek neuroblastoma ulega endocytozie (159). Pozostaje sprawą niejasną, czy receptory glikosfingolipidowe wnikają do wnętrza komórek razem z ligandami i czy są wielokrotnie wykorzystywane do celów transportowych. Proces ten opisano na przykładzie receptorów białkowych (160, 161).

Niewielkie ilości glikosfingolipidów występują stale we wnętrzu komórek. W komórkach NIL glikosfingolipidy obojętne oraz hematozyd znalaziono nie tylko w błonie plazmatycznej, lecz także w jądrach komórkowych, mitochondriach i siateczce endoplazmatycznej (162). W wątrobie szczura gangliozydy wykryto w siateczce endoplazmatycznej w mitochondriach, w aparacie Golgiego i w cytosolu (163). Gangliozydy cytosolowe opisano w komórkach mózgowych szczura i cielęcia (164, 165). Metodami histochemicznymi stwierdzono obecność galaktozyloceramidu w cytoplazmie kilku różnych linii komórkowych (166). Przypuszcza się, że glikosfingolipidy wewnątrzkomórkowe są odzwierciedleniem procesów biosyntezy i degradacji, być może jednak iż pełnią one jakąś specyficzną funkcję biologiczną.

IV-2. Rozmieszczenie transferaz cukrowych w komórce

Transferazy cukrowe biorące udział w budowie łańcuchów cukrowych glikosfingolipidów zlokalizowano głównie w błonach wewnątrzkomórkowych (3, 167). W największych ilościach występują one w siateczce endo-

plazmatycznej i w aparacie Golgiego, który uważany jest za główne miejsce glikozylacji. Tu znaleziono enzymy związane z biosyntezą glikosfingolipidów obojętnych, gangliozydów i glikosfingolipidów siarczanowych. Aparat Golgiego wątroby szczura zawiera wszystkie transferazy niezbędne do przekształcenia laktozyloceramidu w gangliozyd GD1a (71, 72) oraz sialozylotransferazę dołączającą kwas sialowy do gangliozydu GM3 z wytworzeniem gangliozydu GD3 (168). Komplet enzymów syntetyzujących gangliozyd GD1a z laktozyloceramidu występuje także w aparacie Golgiego tarczycy wołowej (73). Z tym samym przedziałem komórkowym związane są enzymy szlaku biosyntetycznego glikosfingolipidu grupowego B (169) oraz pochodnej siarczanowej galaktozyloceramidu (170). W aparacie Golgiego komórek nowotworowych znaleziono enzymy biorące udział w biosyntezie antygeny Forssmana (98). Z drugiej strony w tarczycy wołowej enzym przenoszący kwas sialowy na gangliozyd GM3 występuje we frakcjach komórkowych nie zawierających aparatu Golgiego (73). Podobne spostrzeżenia zanotowano odnośnie enzymu przenoszącego galaktozę na ceramid w nerce szczura (171). Wydaje się, że glikozylacja glikosfingolipidów zachodzić może w kilku miejscach komórki.

Niewielkie ilości transferaz cukrowych występują na powierzchni komórek (172). Transferazom powierzchniowym przypisuje się rolę regulatorkową. Stwierdzono, że aktywność powierzchniowa galaktozylotransferazy w jelicie szczura wzrasta w komórkach dzielących się (173). Wykazano także, że powierzchniowe galaktozylotransferazy uczestniczą w procesie aglutynacji komórek (174, 175). Według *R o s e m a n a* (176) enzymy błony plazmatycznej poprzez interakcje z akceptorami cukrowymi komórek sąsiadujących biorą udział w takich procesach jak adhezja komórkowa czy utrata hamowania kontaktowego w komórkach nowotworowych. Nie wydaje się by transferazy cukrowe błony plazmatycznej uczestniczyły w biosyntezie. Sprawą kontrowersyjną pozostaje także biosynteza gangliozydów w synaptosomach. Transferazy reszt cukrowych w błonach synaptycznych komórek nerwowych opisywano w różnych laboratoriach (64, 177, 178). *N g i D a i n* (68) uważają jednak, że obecność tych enzymów we frakcjach zawierających błony synaptyczne wynikać może z niedoskonałości metod frakcjonowania komórkowego.

IV-3. Biosynteza glikosfingolipidów w komórce

Najczęściej stosowaną metodą badania biosyntezy glikosfingolipidów w żywej komórce jest znakowanie glikosfingolipidów radioaktywnymi prekursorami i następnie ich analiza.

M a c c i o n i i wsp. (179) podawali młodym szczurom znakowaną *N*-acetyloglukozoaminę i śledzili wzrost radioaktywności w gangliozydach mózgowych. Nie zaobserwowano, by gangliozydy o niższych masach czą-

steczkowych pojawiły się w komórkach wcześniej niż gangliozydy o wyższych masach cząsteczkowych. Wbrew oczekiwaniom wykazano wcześniejsze włączanie znaku do gangliozydów bardziej złożonych. Nie stwierdzono także różnic we wzroście radioaktywności właściwej wewnętrznej i terminalnej reszty kwasu sjałowego w dwusjałozjologangliozydach. Desjalizacja gangliozydów którą uzyskiwano działając neuraminidazą na preparaty błonowe nie zmieniała endogennej zdolności błon do przyłączania grup sjałowych (180). Na podstawie tych i innych wyników sugerowano, że gangliozydy syntetyzowane są przy udziale kompleksów enzymatycznych w sposób uniemożliwiający mieszanie się nowo powstałych gangliozydów prekursorowych z główną pulą gangliozydów obecną w błonie plazmatycznej (179, 181). Eksperymenty wskazywały także, że biosynteza różnych gangliozydów przebiegać może przy udziale różnych kompleksów enzymatycznych (155, 179, 181). Nieco inne wyniki uzyskano po podaniu komórkom neuroblastoma NB14A radioaktywnej mannozoaminy (182). Znakowany gangliozyd GM3 pojawiał się po czasie krótszym niż 10 minut, gangliozyd GM2 wykrywano po 30 minutach od momentu podania radioaktywnego prekursora, zaś gangliozyd GM1 odnajdywano po 60—90 minutach.

Dodatkowych danych wskazujących na obecność wewnątrzkomórkowej puli gangliozydów prekursorowych nie mieszających się z gangliozydami błonowymi dostarczyły badania nad wewnątrzkomórkowym transportem gangliozydów. Stwierdzono, że w komórkach nerwowych nowo powstałe gangliozydy pojawiają się najpierw w perikarionie, po czym wędrują do wypustek nerwowych (183). W innej serii badań wykazano, że nowo powstałe gangliozydy pojawiają się we wnętrzu komórek, następnie zaś w błonie komórkowej (184).

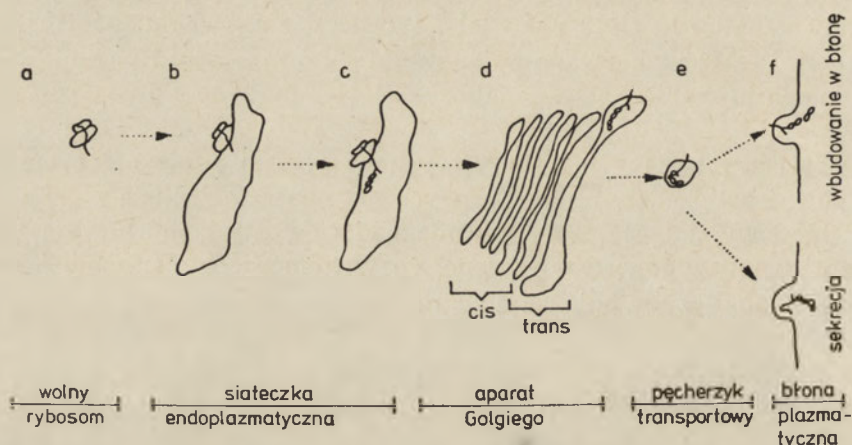
IV-4. Transport gangliozydów z miejsca glikozylacji do powierzchni komórki

Transport gangliozydów z miejsca biosyntezy do błony komórkowej badany był w komórkach glioma C6 i neuroblastoma N18. Opracowano metodę powierzchniowego znakowania gangliozydów dzięki której możliwe było śledzenie włączania radioaktywnej galaktozy jednocześnie do gangliozydów wewnątrz i zewnątrzkomórkowych (184). Wykazano, że wzrost radioaktywności w obu frakcjach przebiegał w początkowym okresie inkubacji w sposób liniowy z przesunięciem w czasie około 20 minut. Gangliozydy pojawiały się najpierw we wnętrzu komórek, po czym w sposób ciągły dostarczane były do błony plazmatycznej. Szybkość ujawniania się różnych gangliozydów na powierzchni komórek obu badanych linii była podobna. Obliczenia matematyczne sugerowały stałą szybkość transportu. Mechanizm transportu glikosfingolipidów z miejsca biosyntezy do błony plazmatycznej pozostaje nieznanym, wiele danych wskazuje

jednak, że jest on podobny do mechanizmu transportu innych elementów błony. Problem ten omówiony zostanie szerzej w następnym rozdziale.

IV-5. Biogeneza błony biologicznej i mechanizm transportu składników błonowych z miejsca biosyntezy do powierzchni komórki

Najbardziej rozpowszechnioną obecnie koncepcją powstawania błony plazmatycznej jest hipoteza znana pod nazwą „*membrane flow model*” (185). Zakłada ona, że błona plazmatyczna tworzy się wewnątrz komórki w siateczce endoplazmatycznej i w aparacie Golgiego, po czym w postaci gotowych fragmentów transportowana jest ku powierzchni komórki. Hipoteza „*membrane flow model*” znajduje poparcie w badaniach nad biosyntezą białek będących istotnym składnikiem błony plazmatycznej. Ryc. 8



Ryc. 8. Schemat wewnątrzkomórkowego transportu glikoprotein błonowych i sekcyjnych (wg 140, 198, 202).

podsumowuje obecne koncepcje dotyczące biosyntezy i transportu wewnątrzkomórkowego glikoprotein zawierających połączenia cukrowo-białkowe typu glukozoamina-asparagina. Biosynteza rozpoczyna się na wolnych rybosomach (a). Według wyników prac Blobela i Dobbersteina (186, 187) N-końcowy fragment rosnącego polipeptydu zawiera tzw. sekwencję sygnałową, która powoduje związanie rybosomu z błoną siateczki endoplazmatycznej w miejscu wyznaczonym przez odpowiednie receptory (b). Polipeptyd przeciska się przez kanał wytworzony w błonie do wewnętrznych przestrzeni siateczki endoplazmatycznej, gdzie następuje wstępna glikozylacja białka (188—191) przy udziale fosforanów dolicholi (140—142), (c). Na tym etapie do polipeptydu dołączane są reszty glukozy, N-acetylogukozoaminy i mannozy. Po wstępnej glikozylacji część reszt cukrowych ulega odszczepieniu (tzw. *processing*), (192, 193), po czym

białko przemieszcza się do aparatu Golgiego (d). W aparacie Golgiego następuje końcowa glikozylacja glikoproteiny, tzn. przyłączenie odpowiednio reszt N-acetyloglukozaminy, galaktozy i kwasu sjałowego (194—196) i białko transportowane jest do błony plazmatycznej (e, f). Przedstawiony schemat biosyntezy proponuje się zarówno dla białek błonowych jak i sekrecyjnych przy założeniu, że białka sekrecyjne oddzielają się na pewnym etapie od struktur błonowych co umożliwi ich wydzielenie z komórki. Przyjmuje się, że transport zachodzi przy udziale pęcherzyków błonowych, które zlewają się z błoną na powierzchni komórki drogą fuzji. Wewnątrzkomórkowy transport w pęcherzykach błonowych jest obecnie dobrze udokumentowany dla białka wirusa VSV (197).

Aparat Golgiego wykazuje budowę niesymetryczną (198—202). Glikozylotransferazy biorące udział w końcowych glikozylacjach glikokoniugatów zlokalizowane są w tzw. fragmencie „trans”. Fragment „cis” obecnością wielu enzymów przypomina skład błon siateczki endoplazmatycznej. Według Rothmana (202) nowo utworzone białka błonowe (a także sekrecyjne, lizozomowe i inne) transportowane są z błon siateczki endoplazmatycznej do aparatu Golgiego razem z całą masą białek towarzyszących bądź dołączonych przypadkowo, bądź też stanowiących materiał nośny. Podczas przechodzenia przez kolejne cysterny aparatu Golgiego białka przeznaczone do dalszego transportu ulegają zagęszczeniu i oczyszczeniu, pozostałe zaś wracają do błon siateczki endoplazmatycznej. Hipotetyczny proces oczyszczania się związków w aparacie Golgiego porównuje Rothman do destylacji frakcyjnej. W części „trans” aparatu Golgiego następuje końcowa glikozylacja oraz sortowanie białek. Następnie fragmenty błon o odpowiednio uformowanym składzie odrywają się od aparatu Golgiego i wędrują do miejsca swego przeznaczenia. Niedawno przedstawiono wyniki sugerujące, że w komórkach nerwowych żaby wszystkie białka przemieszczające się do wypustek nerwowych przechodzą przez aparat Golgiego (203). Wykazano, że jonofor monensyna blokujący wewnątrzkomórkowy transport glikoprotein na poziomie aparatu Golgiego (204—207) hamuje aksonalny transport wszystkich nowo utworzonych białek w jednakowym stopniu.

Zakładając słuszność hipotezy o wewnątrzkomórkowym montażu błony plazmatycznej, losy tworzących się glikosfingolipidów powinny pozostawać w ścisłym związku z biosyntezą pozostałych elementów błony. Wydaje się, że biosynteza glikosfingolipidów podobnie jak białek rozpoczyna się w błonach siateczki endoplazmatycznej. Tu bowiem występuje wiele enzymów katalizujących biosyntezę lipidów, w tym także sfingolipidów (208, 209). Choć przyjmuje się, że łańcuchy cukrowe glikosfingolipidów powstają w aparacie Golgiego, szereg danych wskazuje, że początkowa glikozylacja ceramidu zachodzić może w innym miejscu komórki. O rozmieszczeniu transferaz cukrowych we frakcjach subkomórkowych pisano w rozdziale IV-2. Niedawno wykryto, że wiele związków zakłóca-

jących wewnątrzkomórkowy transport glikoprotein powoduje w komórkach glioma i neuroblastoma nagromadzenie się glukozyloceramidu i spadek ilości glikosfingolipidów o wyższych masach cząsteczkowych (Miller-Podraza i Fishman, praca przygotowywana do druku). Wykazano także szybsze pojawianie się w komórkach glukozyloceramidu w porównaniu z innymi, bardziej złożonymi glikosfingolipidami (210). Za hipotezą „*membrane flow model*” przemawia także fakt, że nowo utworzone gangliozydy nie przechodzą w komórkach do cytosolu, lecz pozostają związane z frakcjami błonowymi (210). Znamienne jest i to, że czas transportu gangliozydów z miejsca biosyntezy do błony komórkowej obliczony na ok. 20 minut (184) zbliżony jest do czasu transportu innych związków przenoszonych ku powierzchni błony. Obliczono na przykład, że 50% glikoproteiny wirusa VSV przemieszcza się z aparatu Golgiego do błony komórkowej w czasie 45 minut (197). W wątrobie transport sjałowych glikoprotein z miejsca glikozylacji do powierzchni komórki zajmuje 20—30 minut (211). W makrofagach glikoproteiny przebywają drogę z rybosomów do błony komórkowej w czasie 36—55 minut (212). W podobnym tempie odbywa się także transport sulfatydów w komórkach nerki (170).

Z drugiej strony szereg prac wskazuje, że wewnątrzkomórkowy transport prekursorów błonowych zachodzić może indywidualnie przy udziale związków nośnikowych. Na przykład Sonnino i wsp. (164) sugerują, że gangliozydy transportowane są do błony plazmatycznej w postaci rozpuszczalnych kompleksów lipidowo-białkowych. Kompleksy takie wyizolowano z frakcji cytosolowej mózgu cielęcia. Rozpuszczalne białka cytosolowe przyspieszające transport pomiędzy błonami biologicznymi opisano na przykładzie fosfolipidów (213—219) oraz glikosfingolipidów obojętnych i kwaśnych (220—222). Być może, że glikosfingolipidy prekursorowe przebywają drogę pomiędzy punktami biosyntezy w formie rozpuszczalnej, zaś w pełni uformowane związki transportowane są do powierzchni komórek w pęcherzykach błonowych. Nie można wykluczyć także i tego, że różne organizmy rozwiązują problem wewnątrzkomórkowego transportu związków w różny sposób.

V. Regulacja biosyntezy glikosfingolipidów

W determinowaniu struktury chemicznej glikosfingolipidów główną rolę pełnią enzymy syntetyzujące, których obecność w komórce jest wyrazem informacji genetycznej zawartej w chromosomach. O roli transferaz przenoszących kwasy tłuszczowe na sfingozynę i ich specyficzności substratowych wspomniano w rozdziale II. Enzymy rozpoczynające biosyntezę łańcuchów cukrowych glikosfingolipidów rozpoznają określone struktury we fragmencie lipidowym. W mózgu embrionów kurzych transferaza przenosząca galaktozę na ceramid wykorzystuje tylko te akceptory które za-

wierają α -hydroksykwasu C18:0 i C18:1 (47). W przypadku enzymów przenoszących reszty cukrowe na związki o wyższych masach cząsteczkowych specyficzność ogranicza się prawdopodobnie do końcowych ugrupowań cukrowych. Badania nad substancjami grupowymi krwi wskazują, że te same enzymy mogą brać udział w biosyntezie glikolipidów i glikoprotein (223). Specyficzność odnośnie terminalnego cukru tworzącego się glikokonjugatu wydaje się być jednak bardzo wysoka. Wiele danych wskazuje, że w biosyntezie łańcuchów cukrowych glikosfingolipidów każdej reakcji transferu odpowiada oddzielny enzym. Stwierdzono na przykład, że α i β galaktozylotransferazy śledziony szczura biorące udział w biosyntezie laktozyloceramidu i trójheksozyloceramidu różnią się wrażliwością na działanie temperatury i wykazują inne wymagania odnośnie jonów metali (53). Dwie różne galaktozylotransferazy z których jedna przenosiła galaktozę na trójheksozyloceramid, a druga na tetraglikozyloceramid wykryto w szpiku kostnym królika (110). $\alpha(1 - 2)$ i $\alpha(1 - 3)$ fukozylotransferazy surowicy ludzkiej są też odrębnymi białkami (114), podobnie jak α i β galaktozoaminylotransferazy syntetyzujące antygen Forssmana (99). Z drugiej strony w mózgu embrionów kurzych ta sama transferaza przenosi resztę N-acetylogalaktozoaminy na globotrójheksozyloceramid, laktozyloceramid i gangliozyd GM3 (95). W śledzienie wołowej opisano enzym dołączający fukozę do laktoneotetraozyloceramidu i pentaglikozyloceramidu B (115).

Według koncepcji Rosemana (176) transferazy cukrowe występują w błonach biologicznych w formie kompleksów wieloenzymatycznych. Istnieje szereg prac, które tę koncepcję popierają. Stwierdzono na przykładzie gangliozydów, że endogennie syntetyzowany związek jest lepszym prekursorem w biosyntezie niż glikosfingolipid dodany z zewnątrz do mieszaniny reakcyjnej (62). Badania nad biosyntezą antygeny Forssmana w komórkach chomika NIL wykazały, że α i β galaktozoaminylotransferazy przekształcają globotrójheksozyloceramid w tempie sugerującym współdziałanie enzymów (99). Wydaje się, że glikosfingolipidy prekursorowe pozostają w trakcie biosyntezy związane z błonami w których przestrzenne rozmieszczenie transferaz cukrowych umożliwia nieprzerwaną glikozylację aż do uzyskania produktu końcowego. Niedawno Kannagi i wsp. (224) zwrócili uwagę na możliwą rolę ceramidu w regulacji biosyntezy łańcuchów cukrowych glikosfingolipidów. Autorzy zakładają, że fragmenty lipidowe omawianych związków poprzez oddziaływania hydrofobowe zmieniają stopień powiązania glikosfingolipidów z kompleksami enzymatycznymi wpływając w ten sposób na przebieg glikozylacji. Powyższe rozumowanie oparte zostało na obserwacji, że w pewnych tkankach występuje zależność pomiędzy strukturą ceramidu i budową łańcuchów cukrowych glikosfingolipidów. Z drugiej strony Kościelak i wsp. (225) sugerują, że odmienność w budowie ceramidów różnych gliko-

s핑olipidów może być wynikiem różnych miejsc biosyntezy i różnej dostępności poszczególnych kwasów tłuszczowych w różnych tkankach.

Ilość glikos핑olipidów komórkowych zmieniać się może w organizmie pod wpływem różnych czynników. Bezpośrednio wpływają na aktywność transferaz cukrowych nukleotydy (226, 229). UDP na przykład aktywuje β -galaktozoaminylotransferazę biorącą udział w biosyntezie globotetraglikozyloceramidu i jednocześnie hamuje α -galaktozoaminylotransferazę katalizującą syntezę globopentaglikozyloceramidu (antygeny Forssmana), (229). Poziom transferaz cukrowych w komórce zależy od stężenia pewnych hormonów. Testosteron zmienia w komórkach myszy aktywność enzymu przenoszącego galaktozę na ceramid (230). Cortisol przyspiesza biosyntezę sulfatydu w komórkach glioma (231). Znany jest wpływ pochodnych kwasu masłowego. Maślan sodowy w komórkach HeLa zwiększa aktywność transferazy kwasu sjałowego biorącej udział w biosyntezie gangliozydu GM3 (232, 233). Badania nad biosyntezą innych związków cukrowych wykazały, że również pewne białka mogą pełnić funkcje regulatorowe w reakcjach glikozylacji. Przykładem może być wpływ α -laktoalbuminy na syntezę laktozy (234).

VI. Biosynteza glikos핑olipidów w organizmach rozwijających się oraz w tkankach nowotworowych

Poziom aktywności transferaz cukrowych zmienia się w cyklu komórkowym oraz w rozwoju osobniczym zwierząt. W ludzkich komórkach KB biosynteza glikos핑olipidów przebiega najintensywniej pod koniec cyklu komórkowego (235). Zsynchronizowanym komórkom podawano radioaktywną galaktozę i badano w czasie włączanie izotopu do glikos핑olipidów obojętnych oraz gangliozydów. Radioaktywność specyficzna obu grup związków wzrastała gwałtownie w fazie M i G1. Podobne badania prowadzono stosując jako model eksperymentalny komórki chomika NIL (236). Włączanie radioaktywnych prekursorów do glikos핑olipidów zachodziło we wszystkich fazach cyklu komórki, jednak biosynteza pewnych glikos핑olipidów wzrastała w fazie G1 i w początkach fazy S.

Aktywności enzymów syntetyzujących glikos핑olipidy zmieniają się w rozwijających się mózгах zwierzęcych (237). W mózgu kurczęcia maksymalną aktywność transferazy galaktozy związanej z biosyntezą galaktozyloceramidu obserwowano pomiędzy 17 i 21 dniem życia embrionalnego (47). Najwyższy poziom transferazy glukozy przenoszącej glukozę na ceramid wykryto w 13 i 14 dniu rozwoju (48). Stwierdzono różnicę w tempie biosyntezy gangliozydów cytosolowych i błonowych. W mózgu królika maksimum biosyntezy gangliozydów cytosolowych obserwowano w 21 i 22 dniu rozwoju, zaś maksimum biosyntezy gangliozydów błonowych stwierdzano pomiędzy 29 i 31 dniem, to znaczy w ostatniej fazie życia płodowego

(165). Wykazano, że biosynteza galaktozyloceramidu w rozwijających się mózgach zwierzęcych zbiega się z fazą mielinacji (238), podobnie jak biosynteza gangliozydu GD1a (239) i biosynteza sulfatydów (130, 238).

Biosynteza glikosfingolipidów ulega zakłóceniu w komórkach nowotworowych. W porównaniu z tkankami normalnymi tkanki nowotworowe wykazują zazwyczaj podwyższony poziom glikosfingolipidów zawierających krótkie łańcuchy cukrowe przy obniżonym poziomie glikosfingolipidów o wyższych masach cząsteczkowych. Zmiany te powodowane są brakiem lub obniżeniem aktywności pewnych transferaz cukrowych, co prowadzi do gromadzenia się w komórkach związków prekursorowych. W mysich komórkach nowotworowych obserwowano blok w biosyntezie gangliozydu GM2 (240). W komórkach chomika BHK poddanych transformacji nowotworowej zarejestrowano obniżony poziom transferazy przenoszącej kwas sjałowy na laktozyloceramid (241). Znane są przypadki supresji enzymów biorących udział w biosyntezie gangliozydu GM1 (242), a także gangliozydów zawierających dwie reszty sjałowe w cząsteczce (242, 243). Przykładów uproszczonego obrazu glikosfingolipidów w komórkach nowotworowych jest bardzo wiele (244—250), znane są jednak przypadki zwiększonej syntezy glikosfingolipidów zawierających rozbudowane łańcuchy cukrowe. Przykładem mogą być komórki 3T3sv-A26 i 3T3sv-CE56, które syntetyzują duże ilości gangliozydu GD1a kosztem gangliozydu GM3 (151). Pozostaje sprawą nierozstrzygniętą, czy zmiany w biosyntezie glikosfingolipidów obserwowane w komórkach nowotworowych powodowane są utratą kontroli nad tymi komórkami przez organizm, czy też są odbiciem nieodwracalnych zmian genetycznych.

VI. Podsumowanie

Do chwili obecnej opisano szlaki biosyntetyczne całego szeregu glikosfingolipidów obojętnych i kwaśnych. W wielu laboratoriach pracuje się nad poznaniem procesów towarzyszących biosyntezie glikosfingolipidów w komórkach żywych. Większość uzyskanych informacji dotyczy gangliozydów. Ustalono, że w biosyntezie tych związków bierze udział niewielka wewnątrzkomórkowa pula gangliozydów prekursorowych, która nie miesza się z pulą główną obecną w błonie plazmatycznej. Na podstawie rozmieszczenia subkomórkowego enzymów syntetyzujących stwierdzono, że aparat Golgiego jest głównym miejscem glikozylacji glikosfingolipidów. Biosynteza rozpoczyna się prawdopodobnie w błonach siateczki endoplazmatycznej. Transport glikosfingolipidów z miejsca glikozylacji do błony plazmatycznej prześledzono w komórkach glioma i neuroblastoma. Czas transportu obliczono na ok. 20 min. Mechanizm transportu pozostaje niewyjaśniony. Analiza literatury dotyczącej biosyntezy glikoprotein pozwala dostrzec szereg analogii pomiędzy biosyntezą tych związków i biosyntezą glikosfin-

golipidów. Pozostaje to w zgodzie z hipotezą zakładającą wewnątrzkomórkowy montaż błony plazmatycznej. Dalsze badania nad biosyntezą i wewnątrzkomórkowym transportem glikosfingolipidów przyczynić się mogą do wyjaśnienia biogenezy błony plazmatycznej.

Zaakceptowano do druku 26.03.1984

PIŚMIENNICTWO

1. Svennerholm L., (1970), w *Handbook of Neurochemistry*, tom III, red. Lajtha A., New York, Plenum Press, 425—452
2. Sweeley C. C., Siddiqui B. W., (1977), w *The Glycoconjugates*, tom I, red. Horowitz M. I., Pigman W., Academic Press, New York, San Francisco, London, 459—540
3. Sweeley C. C., Fung Y. K., Macher B. A., Moscal J. R., Nunez H. A., w *Glycoproteins and Glycolipids in Disease Processes*, red. Groud R. F., (1978), American Chemical Society, Washington D. C., 47—85
4. Kościelak J., (1983), w *Recent Advances in Haematology, Immunology and Blood Transfusion*, red. Hollan S. R. i inni, Budapeszt, 61—87.
5. Ledley F. D., Lee G., Kohn L. D., Habig W. H., Hadergree M. C., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 4049—4055
6. Kitamura M., Iwamori M., Nagai Y., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **628**, 328—335
7. Mullin B. R., Pacuszka T., Lee G., Kohn L. D., Brady R. O., Fishman P. H., (1978), *Science*, **199**, 77—79
8. Lee G., Aloj S. M., Kohn L. D., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 434—441
9. Besancon F., Ankel H., (1974), *Nature*, **252**, 478—480
10. Kleinman H. K., Martin G. R., Fishman P. H., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 3367—3371
11. Bergelson L. D., Bukrinskaya A. L., Prokazova N. V., Shaposhnikova G. I., Kocharov S. L., Schevchenkov P., Kornilava V., Fomina-Ageeva E. V., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **128**, 467—474
12. Kolb H., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 1488—1495
13. Rahman H., Probst W., Mühleisen M., (1982), *Japan. J. Exp. Med.*, **52**, 275—286
14. Spiegel S., Wilchek M., (1981), *J. Immunol.*, **127**, 572—575
15. Sela B. A., (1981), *Eur. J. Immunol.*, **11**, 347—349
16. Schwarting G. A., Summers A., (1980), *J. Immunol.*, **124**, 1691—1694
17. Habu S., Fukui H., Shimmamura K., Kasai M., Nagai Y., Okumura K., Tamaoki N., (1981), *J. Immunol.*, **127**, 34—38
18. Krishnamurti C., Ankel H., (1982), *Journal of Interferon Research*, **2**, 245—251
19. Zabin I., Mead J. F., (1954), *J. Biol. Chem.*, **211**, 87—93
20. Sprinson D. B., Coulon A., (1954), *J. Biol. Chem.*, **207**, 585—592
21. Brady R. O., Koval G. J., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 26—31
22. Braun P. E., Snell E. E., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **58**, 298—303
23. Braun P. E., Snell E. E., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3775—3783
24. Brady R. N., DiMari S. J., Snell E. E., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 491—496

25. Stoffel W., (1971), *Annu. Rev. Biochem.*, **40**, 57—82
26. Morell P., Braun P., (1972), *J. Lipid Res.*, **13**, 293—310
27. DiMari S., Brady R. N., Snell E. E., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 553—565
28. Stoffel W., Bister K., (1974), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 911—923
29. Stoffel W., LeKim D., Sticht G., (1967), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 1570—1574
30. Stoffel W., LeKim D., Sticht D., (1968), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **349**, 664—670
31. Braun P. E., Morell P., Radin N. S., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 335—341
32. Stoffel W., (1970), *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 139—158
33. Snell E. E., DiMari S. J., Brady R. N., (1970), *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 116—138
34. Greene M. L., Kaneshiro T., Law J. H., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 582—588.
35. Weiss B., Stiller R. L., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 2903—2908
36. Polito A. J., Sweeley C. C., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4178—4187
37. Kulmacz R. J., Schroepfer G. J. Jr., (1978), *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3963—3964
38. Martensson E., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **116**, 296—308
39. Sribney M., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **125**, 542—547
40. Morell P., Radin N. S., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 342—350
41. Ullman M. D., Radin N. S., (1972), *Archiv. Biochem. Biophys.*, **152**, 767—777
42. Stoffel W., Melzner L., (1980), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**, 755—771
43. Yavin E., Gatt S., (1969), *Biochemistry*, **8**, 1692—1697
44. Stoffel W., Krüger S., Melzner I., (1980), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**, 773—779
45. Singh I., Koshimoto Y., (1980), *Archiv. Biochem. Biophys.*, **202**, 93—100
46. Basu S., Kaufman B., Roseman S., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5802—5804
47. Basu S., Schultz A. M., Basu M., Roseman S., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4272—4279
48. Basu S., Kaufman B., Roseman S., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1388—1394
49. Brady R. O., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, PC2416—PC2417
50. Curtino J. A., Caputti R., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**, 142—147
51. Watanabe K., Matsubara T., Hakomori S. I., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2385—2387
52. Hauser G., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 502—509
53. Hilderbrand J., Hauser G., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5170—5180
54. Morgan I. G., Gombos G., Tettamanti G., (1977), w *The Glycoconjugates*, red.: Horwitz M. I., Pigman W., Academic Press, INC New York, San Francisco, London, 351—383
55. Ledeen R., (1970), *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 205—219
56. Puro K., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 401—413
57. Basu S., Kaufman B., Roseman S., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, PC4115—PC4117

58. Kaufman B., Basu S., Roseman S., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5804—5807
59. Yip G. B., Dain J. A., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **206**, 252—260
60. Arce A., Maccioni H. F., Caputto R., (1966), *Archiv. Biochem. Biophys.*, **116**, 52—58
61. Arce A., Maccioni H. J., Caputto R., (1971), *Biochem. J.*, **121**, 483—493
62. Cumar F. A., Fishman P. H., Brady R. O., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5075—5084
63. Cumar F. A., Tallman J. F., Brady R. O., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2322—2327
64. Di Cesare J. L., Dain J. A., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 403—410
65. Yip M. C. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **306**, 298—306
66. Steigerwald J. C., Basu S., Kaufman B., Roseman S., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6727—6734
67. Ng S. S., Dain J. A., (1977), *J. Neurochem.*, **29**, 1075—1083
68. Ng S. S., Dain J. A., (1977), *J. Neurochem.*, **29**, 1085—1093.
69. Yohe H. C., Yu R. K., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 608—613
70. Yohe H. C., Macala L. J., Yu R. K., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 249—252
71. Keenan T. W., Morre D. J., Basu S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 310—315
72. Richardson C. L., Keenan T. W., Morre D. J., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **488**, 88—96
73. Pacuszka T., Duffard R. O., Mishimura R. N., Brady R. O., Fishman P. H., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5839—5846
74. Taki T., Hirabayashi Y., Suzuki Y., Matsumoto M., Kojima K., (1978), *J. Biochem.*, **83**, 1517—1520
75. Hirabayashi Y., Taki T., Matsumoto M., (1979), *FEBS Lett.*, **100**, 253—257
76. Taki T., Kamada R., Matsumoto M., (1982), *Adv. Exp. Med. Biol.*, **152**, 179—193
77. Basu M., Chien J. L., Basu S., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1097—1103
78. Handa S., Burton R. M., (1969), *Lipids*, **4**, 589—598
79. Yip M. C. M., Dain J. A., (1969), *Lipids*, **4**, 270—277
80. Yip M. C. M., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 737—743
81. Stoffyn A., Stoffyn P., Yip M. C. M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **409**, 97—103
82. Yamakawa T., Suzuki S., (1952), *J. Biochem.*, **39**, 393—408
83. Hakomori S. I., Siddiqui B., Li Y. T., Li S. C., Hellerqvist C. G., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2271—2277
84. Miyatake T., Handa S., Yamakawa T., (1968), *Japan. J. Exp. Med.*, **38**, 135—138
85. Kościelak J., Miller-Podraza H., Krauze R., Cedergren B., (1976), *FEBS Lett.*, **66**, 250—253
86. Marcus D. M., Naiki M., Kundu S. K., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **73**, 3263—3267
87. Miller-Podraza H., Kościelak J., (1975), *Acta Haemat. Pol.*, **6**, 299—307
88. Sweeley C. C., Kliousky B., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, PC3148—PC3150
89. Fraser B. A., Mallette M. F., (1974), *Fed. Proc.*, **33**, 1225—1225

90. Taketomi T., Hara A., Kawamura N., Hayashi M., (1974), *J. Biochem.*, **75**, 197—199
91. Siddiqui B., Kawanami J., Li Y. T., Hakomori S., (1972), *J. Lipid Res.*, **13**, 657—662
92. Rapport M. M., Schneider H., Graf L., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **137**, 409—411
93. Stoffyn P., Stoffyn A., Hauser G., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1920—1923
94. Stoffyn A., Stoffyn P., Hauser G., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **360**, 174—178
95. Chien J. L., Williams T., Basu S., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1778—1785
96. Kijimoto S., Ischibashi T., Makita A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**, 177—184
97. Ischibashi T., Kijimoto S., Makita A., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **337**, 92—106
98. Yeung K. K., Moscal J. R., Chien J. L., Gardner D. A., Basu S., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 252—260
99. Kijimoto-Ochiai S., Yokosawa N., Makita A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 9037—9040
100. Basu M., Basu S., Schanabruch W. G., Moscal J. R., Evans C. H., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 385—392
101. Kościelak J., (1978), w *New Approaches to Genetics*, red. Kent P. W., Otiel Press, Stockfield, London, Boston 206—222
102. Naiki M., Fong J., Ledeen R., Marcus D. M., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4831—4837
103. Zdebska E., Kościelak J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **91**, 517—525
104. Kościelak J., Miller-Podraza H., Krauze R., Piasek A., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **71**, 9—18
105. Watanabe K., Powell M., Hakomori S. I., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8962—8967
106. Kościelak J., Miller-Podraza H., Zdebska E., (1978), w *Methods in Enzymology*, Tom L, część C, Academic Press, New York, San Francisco, London, 211—216
107. Basu S., Basu M., Den H., Roseman S., (1970), *Fed. Proc.*, **29**, 410—410
108. Basu M., Basu S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1489—1495
109. Zieleński J., Kościelak J., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **3**, 323—329
110. Basu M., Basu S., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1700—1706
111. Moscal J. R., Gardner D. A., Basu S., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 701—708.
112. Basu M., Moscal J. R., Gardner D. A., Basu S., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1380—1388
113. Basu M., Higashi H., Basu S., Evans C. H., (1980), *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **39**, 2184—2184
114. Pacuszka T., Kościelak J., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **64**, 499—506
115. Basu S., Basu M., Chien J. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2956—2962
116. Presper K. A., Basu M., Basu S., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **75**, 289—293
117. Presper K. A., Basu M., Basu S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 169—173

118. Stellner K., Hakomori S. I., Warner G. A., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 439—445
119. Hakomori S. I., Andrews H. D., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 225—228
120. Smith E. L., McKibbin J. M., Karlsson K. A., Pasher J., Samuelsson B. E., Li Y. T., Li S. C., (1975), *J. Biol. Chem.* **250**, 6059—6064
121. Prohaska R., Schenkel-Brunner H., Tuppy H., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 161—166
122. Yang H. J., Hakomori S. I., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1192—1200
123. Slomiany B. L., Slomiany A., Badurski J., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 319—336
124. Suzuki K., Chen G. C., (1967), *J. Lipid Res.*, **8**, 105—113
125. Karlsson K. A., Samuelsson B. E., Steen G. O., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **46**, 243—258
126. Esselman W. J., Ackerman J. R., Sweeley C. C., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7310—7317
127. Stoffyn A., Stoffyn P., Martensson E., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 353—357
128. Slomiany B. L., Slomiany A., Horowitz M. I., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **348**, 388—396
129. Balasubramanian A. S., Bachhawat B. K., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 218—220
130. McKhann G. M., Ho W., (1967), *J. Neurochem.*, **14**, 717—724
131. McKhann G. M., Levy R., Ho W., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 109—113
132. Tadano K., Ishizuka I., (1979), w *The Glycoconjugates*, Stuttgart, str. 303—304
133. Van den Eijnden D. H., Winterwerp H., Smeeman P., Schiphorst W. E. C. M., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 3435—3437
134. Basu M., Chon H. C., Brown T., Basu S., (1983), w *Glycoconjugates*, Proc. 7th Int. Symp. on Glycoconjugates, Lund-Ronneby, 17—23 lipiec, red. Chester M. A., Heinegard D., Lundblad A., Svemsson A., Rahms i Lund, 772
135. Yates A. D., Watkins W. M., (1983), w *Glycoconjugates* (patrz nr 134), 762—763
136. Piller F., Cartron J. P., (1983), w *Glycoconjugates* (patrz nr 134), 764—765
137. Van den Eijnden D. H., Schiphorst W. E. C. M., (1983), w *Glycoconjugates* (patrz nr 134), 766—767
138. Zieleński J., Kościelak J., (1983), *FEBS Lett.*, **158**, 164—168
139. Zieleński J., Kościelak J., (1983), *FEBS Lett.*, **163**, 114—118
140. Schachter H., Narasimhan S., Wilson J. R., (1978), w *Glycoproteins Glycolipids in Disease Processes*, red. Earl F., Walborg Jr., American Chemical Society, Washington D. C., 21—46
141. Lennarz W. J., (1975), *Science*, **188**, 986—991
142. Waechter C. J., Lennarz W. J., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 95—112
143. Finne J., Krusius T., Rauvala H., (1978), *FEBS Lett.*, **89**, 111—115
144. Krusius T., Finne J., Rauvala H., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 289—300
145. Rauvala H., Finne J., (1979), *FEBS Lett.*, **97**, 1—8

146. Nisizawa K., Hashimoto Y., (1970), w *The Carbohydrates*, tom IIA, red. Pigman W., Horton D., Academic Press, New York London, 241—290
147. Carter T. P., Kanfer J. N., (1976), *J. Neurochem.*, **27**, 53—62
148. Dod B. J., Gray G. M., (1968), *Biochem. J.*, **110**, 50P—50P
149. Renkonen O., Gahmberg C. G., Simons K., Kaariainen L., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **255**, 66—78
150. Keenan T. W., Morre D. J., Huang C. M., (1972), *FEBS Lett.*, **24**, 204—208
151. Yogeewaran G., Sheinin R., Wherret J. R., Murray R. K., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5146—5158
152. Weinstein D. B., Marsch J. B., Glick M. C., Warren L., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3928—3937
153. Fishman P. H., Brady R. O., (1976), *Science*, **194**, 906—915
154. Critchley D. R., Ansell S., Dilks S., (1979), *Biochemical Society Transactions*, **7**, 314—319
155. Miller-Podraza H., Fishman P. H., (1982), *Biochemistry*, **21**, 3260—3265
156. Kościelak J., Hakomori S., Jeanloz R. W., (1968), *Immunochemistry*, **5**, 441—455
157. Hakomori S. I., (1969), *Vox Sang.*, **16**, 478—485
158. Tomich J. M., Mather J. H., Keenan T. W., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **433**, 357—364.
159. Gonatas N. K., Stieber A., Gonatas J., Mommoi T., Fishman P. H., (1983), *Molecular and Cellular Biology*, **3**, 91—101
160. Stahl P., Schlesinger P. H., Sigardson E., Radman J. S., Lee Y. C., (1980), *Cell*, **19**, 207—215
161. Marshall S., Green A., Olefsky J. M., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 11464—11470
162. Critchley D. R., Graham J. M., Macpherson I., (1973), *FEBS Lett.*, **32**, 37—40
163. Matyas G. R., Morre D. J., Keenan T. W., (1982), *Fed. Proc.*, **41**, 1170—1170
164. Sonnino S., Ghidoni R., Marchesini S., Tettamanti G., (1979) *J. Neurochem.*, **33**, 117—121
165. Sonnino S., Ghidoni R., Masserini M., Aporti F., Tettamanti G., (1981), *J. Neurochem.*, **36**, 227—232
166. Sakakibara K., Momoi T., Uchida T., Nagai Y., (1981), *Nature*, **293**, 76—79
167. Sawicka T., (1981), *Post. Biochem.*, **27**, 157—179
168. Eppler C. M., Morre D. J., Keenan T. W., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 318—331
169. Presper K. A., Basu M., Basu S., (1976), *Fed. Proc.*, **35**, 1441—1441
170. Fleischer B., Zambrano F., Fleischer S., (1974), *J. Supramol. Structure*, **2**, 737—756
171. Fleischer B. (1977), *J. Supramol. Structure*, **7**, 79—89
172. Yogeewaran G., Laine R. A., Hakomori S., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 591—599
173. Weiser M. M., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2542—2548
174. Podolsky D. K., Weiser M. M., La Mont J. Th., Isselbacher K. J., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **71**, 904—908
175. La Mount J. T., Perrotto J. L., Weiser M. M., Isselbacher K. J., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **71**, 3726—3730
176. Roseman S., (1970), *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 270—297

177. Den H., Kaufman B., McGuire E. J., Roseman S., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 739—746
178. Preti A., Fiorilli A., Lombardo A., Caini L., Tettamanti G., (1980), *J. Neurochem.*, **35**, 281—296
179. Maccioni H. J., Arce A., Caputto R., (1971), *Biochem. J.*, **125**, 1131—1137
180. Maccioni H. J. F., Arce A., Landa C., Caputto R., (1974), *Biochem. J.*, **138**, 219—298
181. Landa C. A., Maccioni H. J. F., Arce A., Caputto R., (1977), *Biochem. J.*, **168**, 325—332.
182. Kemp S. F., Stoomiller A. C., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7626—7631
183. Maccioni H. J. F., Delfilpo S. S., Landa C. A., Caputto R., (1978), *Biochem. J.*, **174**, 673—680
184. Miller-Podraza H., Fishman P. H., (1982), *Biochemistry*, **21**, 3265—3270
185. Morre D. J., Kartenbeck J., Franke W. W., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 71—152
186. Blobel G., Dobberstein B., (1975), *J. Cell. Biol.*, **67**, 835—851
187. Blobel G., Dobberstein B., (1975), *J. Cell. Biol.* **67**, 852—862
188. Lawford G. R., Schachter H., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 5408—5418
189. Molnar J., Sy D., (1967), *Biochemistry*, **6**, 1941—1947
190. Cowan N. J., Robinson G. B., (1970), *FEBS Lett.*, **8**, 6—8
191. Kiely M. L., McKnight G. S., Schimke R. T., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5490—5495
192. Tabas I., Schlesinger S., Kornfeld S., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 716—722
193. Godelaine D., Spiro M. J., Spiro R. G., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10161—10168
194. Munro J. R., Narasimhan S., Wetmore S., Riordan J., Schachter H., (1975), *Archiv. Biochem. Biophys.*, **169**, 269—277
195. Schachter H., Jabbal I., Hudgin R. L., Pinteric L., McGuire E. J., Roseman S., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1090—1100
196. Letts P. J., Pinteric L., Schachter H., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **372**, 303—320
197. Rothman J. E., Bursztyń-Pettegrew H., Fine R. E., (1980), *J. Cell. Biol.*, **86**, 162—171
198. Palade G., (1975), *Science*, **189**, 347—358
199. Novikoff A. B., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **73**, 2781—2787
200. Orci L., Montesano R., Meda P., Malaisse-Lagae F., Brown D., Perrelet A., Vassali P., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **78**, 293—297
201. Bergman J., Tokuyasu K., Singer S. J., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **78**, 1746—1750
202. Rothman J. E., (1981), *Science*, **213**, 1212—1219
203. Hammerschlag R., Stone G. C., Boten F. A., Lindsey J. D., Ellisman M. H., (1982), *J. Biol. Chem.*, **93**, 568—575.
204. Tarkoff A. M., Vassali P., (1977), *J. Exp. Med.*, **146**, 1332—1345
205. Tarkoff A., Vassali P., (1978), *J. Cell. Biol.*, **79**, 694—707
206. Kaariainen L., Hashimoto K., Saraste J., Virtanen L., Penttinen K., (1980), *J. Cell Biol.*, **87**, 783—791
207. Tajiri K., Uchida N., Tanzer M. L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6036—6039

208. Jelsema C. L., Morre D. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7960—7971
209. Van Golde L. M. C., Raben J., Batenburg J. J., Fleischer B., Zambrano F., Fleischer S., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **360**, 179—192
210. Miller-Podraza H., Fishman P. H., (1983), *J. Neurochem.*, **41**, 860—867
211. Carey D. J., Hirschberg C. B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4348—4354
212. Kaplan G., Unkless J. C., Cohn Z. A., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **76**, 3224—3228
213. Witz K. W. A., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **344**, 95—117
214. Wirtz K. W. A., Zilversmit D. B., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3596—3602
215. McMurray W. C., Dawson R. M. C., (1969), *Biochem. J.*, **112**, 91—108
216. Kamp H. H., Wirtz K. W. A., Van Deenen L. L. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **318**, 313—325
217. Helkamp G. M. Jr., Harvey M. S., Wirtz K. W. A., Van Deenen L. L. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6382—6389.
218. Bloj B., Zilversmit D. B., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1613—1619
219. Van Golde L. M. G., Oldenburg V., Post M., Batenburg J. J., Poorthuis B. J. H. M., Wirtz K. W. A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6011—6013.
220. Mertz R. J., Radin S. N., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4463—4467
221. Bloj B., Zilversmit D. B., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5988—5991
222. Yamada K., Sasaki T., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **687**, 195—203
223. Watkins W. M., (1979), *Rev. Fr. Transfus. Immuno-Hematol.*, **22**, 35—57
224. Kannagi R., Nudelman E., Hakomori S. I., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **79**, 3470—3476
225. Kościelak J., Maśliński W., Zieleński J., Zdebska E., Brudzyński T., Miller-Podraza H., Cedergren B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **530**, 385—393
226. Letoublon R., Richard M., Louisot P., Got R., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **18**, 194—200
227. Ko G. K. W., Raghupathy E., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **313**, 277—285
228. Eppler C. M., Morre D. J., Keenan T. W., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 332—343
229. Ischibashi T., Alsuta T., Makira A., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 759—767
230. Gray G. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **239**, 494—500
231. Dawson G., Kernes S. M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 163—167
232. Simmons J. L., Fishman P. H., Freese E., Brady R. O., (1975), *J. Cell. Biol.*, **66**, 414—424
233. Fishman P. H., Simmons J. L., Brady R. O., Freese E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 292—299
234. Bell J. E., Beyer T. A., Hill R. L., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3003—3013
235. Chatterjee S., Sweeley C. C., Velicef L. F., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 585—592
236. Wolf B. A., Robbins P. W., (1974), *J. Cell. Biol.*, **61**, 676—687
237. Basu S., Basu M., (1982), *The Glycoconjugates*, **3**, 265—284
238. Hauser G., (1968), *J. Neurochem.*, **15**, 1237—1238
239. Suzuki K., (1965), *J. Neurochem.*, **12**, 969—979

240. Cumar F. A., Brady R. O., Kolodny R. H., Mc Farland V. W., Mora P. T., (1970), *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **67**, 757—764
241. Den H., Schultz A. M., Basu M., Roseman S., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2721—2723
242. Fishman P. H., Brady R. O., Bradley R. M., Aaronson D. S., Todaro G. J., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **71**, 298—301
243. Keenan T. W., Morre D. J., (1973), *Science*, **182**, 935—937
244. Hakomori S. I., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **417**, 55—89
245. Hakomori S., Teather C., Andrews H. D., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 563—568
246. Brady R. O., Mora P. T., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **218**, 308—319
247. Robbins P. W., Macpherson I., (1971), *Nature*, **229**, 569—570
248. Critchley D. R., Macpherson I., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **296**, 145—159
249. Kijimoto S., Hakomori S. I., (1972), *FEBS Lett.*, **25**, 38—42
250. Hakomori S., Kościelak J., Bloch H., Jeanloz R. W., (1967), *J. Immunol.*, **98**, 31—38

Spektryna erytrocytów i jej analogi w innych komórkach

Erythrocyte spectrin and its analogues in nonerythroid cells

I. Wstęp

Spis treści

- II. Spektryna głównym białkiem peryferyjnym błony erytrocytów
- III. Struktura i właściwości spektryny
 - III-1. Wyodrębnianie spektryny
 - III-2. Charakterystyka cząsteczki spektryny
 - III-3. Modyfikacje potranslacyjne
 - III-4. Oligomer utworzony z heterodimerów formą natywnej spektryny
 - III-5. Oddziaływania spektryny z innymi składnikami erytrocytu
 - III-6. Równowaga heterodimer-heterotetramer
 - III-7. Struktura przestrzenna spektryny w roztworze — spektryna niepodobna do miozyny
- IV. Poliptyd o masie cząsteczkowej 240 000 składnikiem białek szkieletu komórkowego
- V. Spektryna erytrocytów pacjentów z niektórymi anemiami hemolitycznymi
- VI. Podsumowanie

Contents

- I. Introduction
- II. Spectrin — the major peripheral protein of the erythrocyte membrane
- III. Structure and properties of spectrin
 - III-1. Isolation of spectrin
 - III-2. Properties of spectrin molecule
 - III-3. Post-translational modifications
 - III-4. Oligomer composed of heterodimers — the form of native spectrin
 - III-5. Interactions of spectrin with erythrocyte components
 - III-6. Heterodimer-heterotetramer equilibrium
 - III-7. Conformation of spectrin in solution — spectrin is unrelated to myosin
- IV. Polypeptide of molecular weight of 240 000 is the component of cytoskeletal proteins
- V. Erythrocyte spectrin in patients with certain hemolytic anemias
- VI. Concluding remarks

*) Dr., Uniwersytet Wrocławski, Instytut Biochemii, Wrocław, ul. Tamka 2
Praca dotowana z problemu MR II.1.

I. Wstęp

Singer i Nicolson [1, 2, 3] z początkiem lat siedemdziesiątych przedstawili model molekularnej organizacji lipidów i białek w błonach biologicznych uwzględniający ich termodynamiczne właściwości. Model płynnej, podwójnej warstwy lipidowej, w którą wnikają w różnym stopniu białka integralne nie uwzględniał jednak między innymi ich ograniczonej ruchliwości dyfuzyjnej. Warunkuje ona zmiany rozmieszczenia receptorów powierzchniowych oraz właściwości mechanicznych błony [4]. Szeroki przegląd tych zjawisk znajdzie czytelnik w klasycznych już dzisiaj artykułach Nicolsona [5, 6]. Niektóre zagadnienia dotyczące mechanicznych właściwości błony erytrocytów i roli szkieletu komórkowego przedstawili Ralston [7] i Kirkpatrick [8]. Udział białek peryferyjnych w kontroli właściwości i funkcji błony skupił uwagę na poznaniu ich struktury i oddziaływań z podwójną warstwą lipidową i białkami integralnymi. Szczególnie przydatną do takich badań okazała się błona erytrocytów. Jednym z elementów szkieletu komórkowego erytrocytu jest spektryna, która odgrywa ważną, aczkolwiek niewyjaśnioną w pełni rolę. W badaniach jej struktury i występowania zanotowano ostatnio znaczny postęp.

II. Spektryna głównym białkiem peryferyjnym błony erytrocytu

Na przełomie lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych pojawiło się kilka doniesień o zastosowaniu roztworów o niskiej sile jonowej do ekstrakcji białek z błon erytrocytów [9—18]. Białka wyciągu rozdzielały się podczas elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS na kilka frakcji, wśród których były dwie frakcje o małej ruchliwości elektroforetycznej określane jako wielkocząsteczkowe frakcje polipeptydowe 1 i 2 (lub też α i β) oraz aktynę (frakcja 5) [13, 14]. W zależności od warunków ekstrakcji wyciąg zawierał również inne białka [13, 16], ale zawsze większość stanowiły wielkocząsteczkowe polipeptydy 1 i 2. Białko składające się z obydwu łańcuchów polipeptydowych zostało nazwane przez jednych autorów [10] spektryną, a przez innych tektyną A [12, 18]. Później okazało się, że tektyna A jest identyczna ze spektryną [19] i występuje w erytrocytach wszystkich przebadanych gatunków [20].

Zgodnie z piśmiennictwem dotyczącym szkieletu komórkowego cząsteczkę spektryny złożoną z dwu łańcuchów polipeptydowych nazywamy dimerem, złożoną z czterech — tetramerem, a bardziej złożone — wyższymi oligomerami [21]. Jak dotąd nie ustalono, który z oligomerów stanowi funkcjonalną i strukturalną całość. Prawdopodobnie jest nią tetramer spektryny.

Spektryna jest drugim ilościowo białkowym składnikiem błony erytrocytu po głównym białku integralnym (polipeptyd 3, białko 3 pasma elektroforetycznego). Spektryna stanowi około 25% wszystkich białek błony [10—12]. W pojedynczym erytrocycie występuje około 220 000 kopii każdego z polipeptydów [20, 23]. Nicolson i wsp. [24, 25] przy pomocy przeciwciał antyspektrynowych sprzężonych z ferrytyną wykazali, że spektryna znajduje się po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej. Spektryna w erytrocytach, w przeciwieństwie do izolowanych, przepuszczalnych cieni nie ulega znakowaniu radioaktywnym jodem w reakcji laktoperyoksydazowej [26—28].

III. Struktura i właściwości spektryny

III-1. Wyodrębnianie spektryny

Krótką ekstrakcja cieni erytrocytów roztworami o niskiej sile jonowej w 37°C daje spektrynę o masie cząsteczkowej 450 000 a dłuższa, kilkunastogodzinna, w 0—4°C pozwala uzyskać spektrynę o masie cząsteczkowej około 900 000 [29—30]. W początkowym okresie stosowano do ekstrakcji spektryny bufor o pH 8.0—9.5 zawierające EDTA [11, 14, 31], gdyż uważano, że kationy dwuwartościowe ekranując ujemne ładunki w spektrynie umożliwiają jej wiązanie z błoną. Jak się później okazało, znacznie mniej zanieczyszczone hemoglobina preparaty uzyskuje się w roztworach o pH około 7 [32, 33]. Dodatek EDTA do buforu nie wpływa na uwalnianie spektryny z błony erytrocytu a nawet, jak podają niektórzy, obecność 1 mM Ca^{2+} lub Mg^{2+} nie przeszkadza w jej ekstrakcji [19]. EDTA hamuje natomiast zależną od jonów wapnia endogenną proteazę [34—36].

Oczyszczanie spektryny sprowadza się do sączenia molekularnego wyciągu z cieni erytrocytów na kolumnach wypełnionych żelami agarozowymi [30, 37]. Pierwsza frakcja zawiera kompleks spektryny z aktywną oraz polipeptydami 2.1 i 4.1, druga, w zależności od temperatury ekstrakcji, dimer lub teramer spektryny, a trzecia inne polipeptydy błony erytrocytu oraz hemoglobinę. Do oczyszczania spektryny stosuje się również ultrawiórowanie w gradiencie gęstości sacharozy [38]. Natomiast rozdzielanie polipeptydów 1 i 2 przysparza dużo trudności. Polipeptydy te mocno ze sobą oddziałują i nie różnią się istotnie wielkością i ładunkiem. Do rozdzielania polipeptydów 1 i 2 stosuje się preparatywną elektroforezę [39], sączenie molekularne [40] oraz chromatografię na kolumnie z hydroksypatytu [41] w obecności SDS lub mocznika.

III-2. Charakterystyka cząsteczki spektryny

Skład aminokwasowy spektryny oznaczono w kilku laboratoriach [11, 19, 42]. Na uwagę zasługuje względnie duża zawartość kwasu glutaminowego (około 20 M⁰/o) i asparaginowego (około 11 M⁰/o) oraz leucyny (14 M⁰/o). Monomer spektryny zawiera 21 reszt cysteiny [19], które w warunkach fizjologicznych nie tworzą mostków dwusiarczkowych. Wewnątrzkomórkowy glutation utrzymuje większość grup sulfhydrylowych w stanie zredukowanym [43]. W cieniach erytrocytów grupy sulfhydrylowe stają się podatne na utlenianie. Podczas inkubacji cieni erytrocytów w pH 4.5—5.0 spektryna ulega spontanicznemu sieciowaniu z innymi białkami błony [44] poprzez mostki dwusiarczkowe. Pod wpływem odczynników utleniających, takich jak czterotioan lub dwuamid^{*} [45—47] spektryna w erytrocytach ulega sieciowaniu oraz wiąże glutation [43].

Skład aminokwasowy polipeptydów 1 i 2 jest bardzo podobny [19, 40]. Analizy map peptydowych uzyskanych różnymi metodami [40, 42, 48—51] wykazały jednak, że polipeptyd 2 nie jest modyfikacją potranslacyjną polipeptydu 1, a zatem oba polipeptydy są produktami odrębnych genów [48, 52].

Oznaczenia aminokwasów N-końcowych wskazywały na to, że spektryna zbudowana jest z więcej niż dwóch polipeptydów [19, 53—55]. Dane te mogą wynikać z obecności zanieczyszczeń innymi białkami, lub z endogennej proteolizy. Zewnętrzne odcinki polipeptydów tworzących spektrynę są wrażliwsze na proteolizę niż wewnętrzne [43, 52]. Sugeruje się [79], że N-końcowe grupy aminowe w obu polipeptydach są zablokowane. Zastosowanie reakcji transaminacji pozwoliło na ilościowe oznaczenie tyłko N-końcowej grupy aminowej łańcucha polipeptydowego spektryny [56]. Aminokwasy N-końcowe spektryny nie zostały nadal zidentyfikowane.

Spektryna jest białkiem kwaśnym, wytrącającym się w pobliżu punktu izoelektrycznego w pH 4.5—5.5 [32, 57, 58]. Stosując metodę izoelektrycznego ogniskowania uzyskano dwie wąskie frakcje spektryny w przedziale pH 5.0—5.2 [40]. Wcześniejsze dane dotyczące reszt aminokwasów N-końcowych, punktu izoelektrycznego [53—55] oraz wieloznaczne wyniki uzyskane za pomocą krzyżowej immunoelektroforezy [59—61] budziły wiele wątpliwości co do jednorodności polipeptydów 1 i 2. Późniejsze badania przemawiają jednak za jednorodnością obu polipeptydów [20, 48, 52].

Masy cząsteczkowe polipeptydów 1 i 2 oznaczono za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS i wykazano, że masa cząsteczkowa polipeptydu 1 wynosi 240 000, a polipeptydu 2 — 220 000 [12]. Wyniki te zostały następnie potwierdzone innymi metodami [19, 32]. Żadna próba rozdzielenia polipeptydów 1 i 2 na mniejsze podjednostki nie powiodła się [11, 14, 19], są one przeto jednymi z największych polipeptydów w komórkach eukariontów [22]. W związku z tym, że polipeptydy

* dwuamid — bisdimetyloamid kwasu diazynodikarboksyłowego

1 i 2 stanowią jedyne składniki spektryny nie ulegające dalszej dysocjacji można je określać jako podjednostki spektryny.

Jak już wspomniano, spektryna traci rozpuszczalność w pobliżu punktu izoelektrycznego. Precypitację charakteryzuje bardzo duża ostrość, gdyż już przy zmianie pH o 0,1 jednostki następuje całkowite wytrącenie spektryny [32]. Dodatek jonów wapnia (10 mM) przesuną pH precypitacji do wyższych wartości. Ścisła zależność precypitacji od pH wynika z biegunowego rozmieszczenia jednoimiennych ładunków w łańcuchach polipeptydowych, które agregują ze sobą na zasadzie oddziaływań polianion-polikation [32]. Wyodrębniona spektryna wytrąca się w obecności zasadowych polipeptydów — polilizyny i histonu bogatego w lizynę [57, 58]. Wpływ kationów dwuwartościowych a szczególnie Ca^{2+} uważa się za efekt nieswoisty [21]. Pierwotnie, tworzenie agregatów [35] w obecności jonów wapnia tłumaczono udziałem tych jonów w wiązaniu spektryny z fosfolipidami błony. Jednakże stosowane wtedy preparaty spektryny zanieczyszczone były aktywną i innymi polipeptydami, a stężenia jonów wapnia przekraczały znacznie jego stężenia fizjologiczne [62]. Nie wykryto również dodatkowej grupy gamma karboksylowej w resztach kwasu glutaminowego [20], która ułatwiałaby wiązanie fosfolipidów w obecności jonów wapnia. Modyfikacja taka znana jest w przypadku niektórych białek osocza biorących udział w krzepnięciu krwi. Wiadomo, że witamina K stymuluje reakcję γ -karboksylacji, w wyniku której reszty kwasu glutaminowego zyskują drugą grupę karboksylową w pozycji gamma [63]. Modyfikacja ta ułatwia wiązanie fosfolipidów, prawdopodobnie poprzez tworzenie „mostków wapniowych”. Jak dotąd nie stwierdzono takiej modyfikacji w cząsteczce spektryny.

III-3. Modyfikacje potranslacyjne

Spektryna, podobnie jak inne białka błony erythrocytu ulega fosforylacji [64—66] przy pomocy niezależnych od cAMP kinaz białkowych erythrocytów [65, 67—72]. Może ona ulegać również defosforylacji pod wpływem endogennej fosfatazy [71]. Podjednostka 2 spektryny ulega fosforylacji podczas inkubacji z γ -[P^{32}] ATP zarówno erythrocytów jak i cieni erythrocytów [73—77]. Liczba kowalencyjnie związanych przez spektrynę reszt fosforanowych została ostatnio oceniona na 4 mole na mol podjednostki 2 [76—79]. Kinetyka fosforylacji i defosforylacji wskazuje na równorzędność wszystkich miejsc fosforylacji [79—80]. W spektrynie erythrocytów 90% miejsc fosforylacji jest zajętych przez reszty fosforanowe a pozostałe dają się enzymatycznie ufosforylować. W erythrocytach występuje nieswoista kinaza kazeiny hamowana przez jony wapnia w stężeniu wyższym od 10 mM [67, 72] oraz kinaza spektryny i polipeptydu 3 aktywowana przez jony wapnia i regulowana przez kalmodulinę [81—83]. Ta ostatnia aktywność jest również stymulowana przez norepinefrynę [83].

Mapowanie peptydów powstałych po trawieniu znakowanej radioaktywnym [^{32}P] fosforanem spektryny [79, 84] wykazało, że trzy peptydy zawierają cztery grupy fosforanowe. Peptydy te są fragmentami C-końcowego polipeptydu o masie cząsteczkowej 20 000 powstałego z podjednostki 2 po fragmentacji spektryny bromocyjanem [79]. Jeden z trzech fosfopeptydów trypsynowych zawiera zarówno fosfoserynę jak i fosfotreoninę, a pozostałe tylko fosfoserynę [79].

Fosforylacja spektryny, jak sądzono [75] ma odgrywać istotną rolę w zmianach kształtu erytrocytów, jak i ich podatności na deformację. Jednakże ostatnie doniesienia wskazują, że te właściwości erytrocytów wiążą się raczej z poziomem ATP, a nie ze stopniem ufosforylowania spektryny [85]. Są dane [86] wskazujące na to, że spektryna ulega także fosforylacji zależnej od cAMP.

Wielkość podjednostek spektryny oraz występowanie w jej hydrolizatach dwupeptydu, glutamylolizyny wskazywały na obecność kowalencyjnych wiązań ϵ -(γ -glutamylolizynowych. Początkowo zakładano, że dwupeptyd ten łączy mniejsze fragmenty w podjednostki spektryny, podobnie jak to ma miejsce w fibrynie [88—90]. Nie stwierdzono jednak takich wiązań w izolowanych podjednostkach spektryny [19].

Obecnie wiadomo, że w erytrocytach występuje latentna, aktywowana przez jony wapnia transamidaza (transglutaminaza) [91—93]. Zwiększenie przepuszczalności błony erytrocytu dla jonów wapnia przy pomocy jonoforu prowadzi do powstawania połączonych kowalencyjnie agregatów białkowych o masie cząsteczkowej przekraczającej 1×10^6 . Wiązania kowalencyjne katalizowane transglutaminazą powstają w błonach zarówno pomiędzy podjednostkami spektryny jak i pomiędzy spektryną i innymi polipeptydami błon, takimi jak polipeptyd 3, aktyna, lub polipeptyd 4.1 [91]. Potraktowanie cieni erytrocytów roztworami zawierającymi jony wapnia wywołuje również formowanie takich agregatów [91—93]. Sieciowanie białek w izolowanych błonach erytrocytów zachodzi również pod wpływem transamidazy z wątroby świnki morskiej (transglutaminaza) [94—96] lub osocza ludzkiego (fibrynoligaza — aktywny czynnik XIII) [96]. Siefiring i Lorand [91] postawili hipotezę, iż aktywowane przez jony wapnia sieciowanie białek szkieletu komórkowego prowadzi do usztywnienia błony, utraty elastyczności erytrocytów i staje się sygnałem do usunięcia takiej komórki z krążenia. Są to bowiem komórki, które nie produkują już wystarczającej ilości ATP koniecznej do wypompowania jonów wapnia z komórki.

III-4. Oligomer utworzony z heterodimerów formą natywnej spektryny

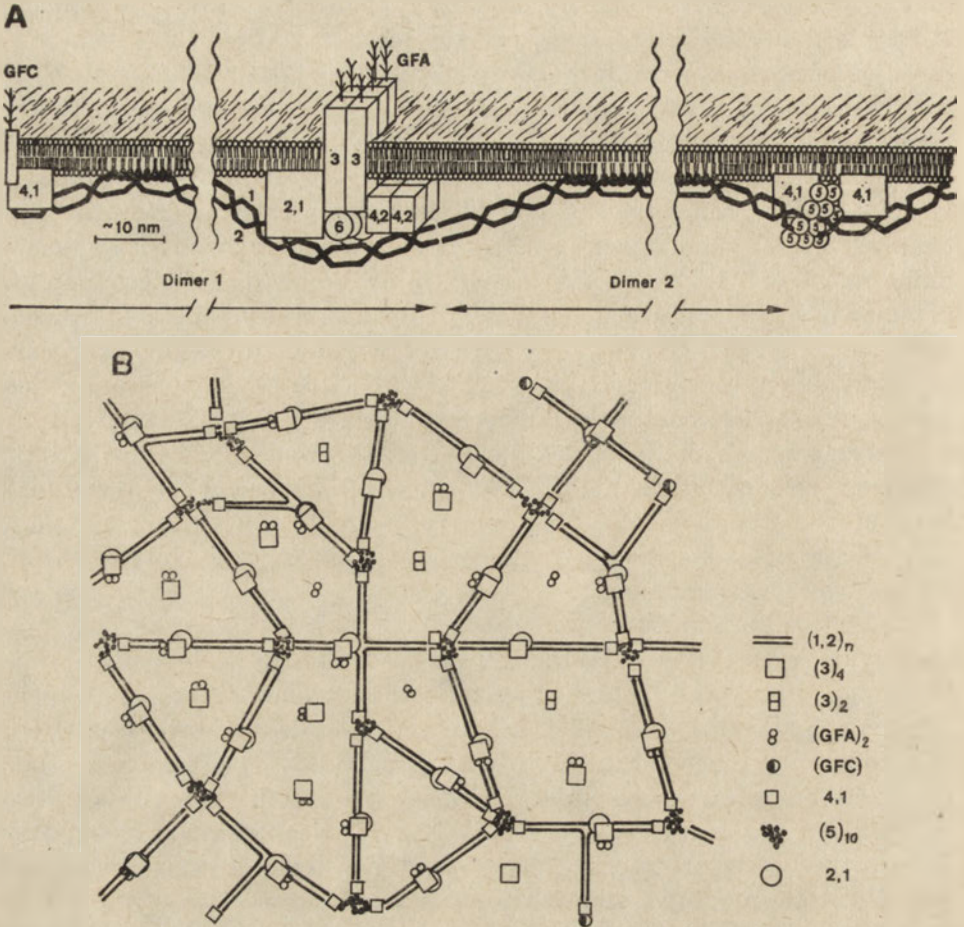
Wiele uwagi poświęcono oddziaływaniu podjednostek spektryny w komórce. Szukano mianowicie odpowiedzi na dwa pytania: czy podjednostki

tworzą hetero-, czy homodimery oraz czy w komórce spektryna występuje w formie dimerów, tetramerów, czy też bardziej złożonych oligomerów. Stosując odczynniki sieciujące [przegląd poz. 97] spodziewano się uzyskać odpowiedź na postawione pytania. Znikanie obu podjednostek po sieciowaniu [98—100] oraz pojawianie się ich po rozłożeniu wiązań sieciujących [99—102] wskazuje na to, iż dimer spektryny tworzą obie podjednostki 1 i 2. Inaczej zinterpretowano wyniki sieciowania solą miedziową fenantroliny [23, 103], zakładając że spektryna może tworzyć dwa rodzaje homodimerów „1—1” i „2—2”. Za istnieniem w komórkach heterodimerów przemawiają następujące dane: obie podjednostki występują w równomolarnych ilościach [12, 14], oraz większość wyników uzyskano przy użyciu odczynników sieciujących [99—102]. Szczególnie przekonująco przemawia za występowaniem heterodimerów udana rekonstrukcja spektryny z wyodrębnionych podjednostek 1 i 2. Renaturowane podjednostki 1 i 2 zmieszane ze sobą tworzą heterodimer o cechach natywnej spektryny [41]. Renaturowana podjednostka 1 nie tworzy homodimerów, ani nie agreguje, podczas gdy podjednostka 2 agreguje wprawdzie do wyższych oligomerów, ale nie tworzy homodimerów.

Liczba heterodimerów wchodzących w skład cząsteczki natywnej spektryny erytrocytów wzbudza, jak już wspomniano wiele kontrowersji. Wiadomo, że zarówno izolowany dimer jak i tetramer reasocjują z błoną pozbawioną spektryny [38, 104]. Z kolei najłagodniejsza ekstrakcja w 4°C daje tetramery przechodzące w 37°C w dimery [21, 33]. Badania z zastosowaniem odczynników sieciujących wskazują na występowanie tetrameru spektryny w błonie erytrocytu [105, 106]. Na podstawie dostępnych danych uważa się obecnie, że formą spektryny występującą w erytrocytach jest tetramer utworzony z dwóch heterodimerów [107]. W preparatach tetramerów mogą występować niewielkie ilości nieliniowych, heksamerycznych form spektryny [108], a nawet wyższe oligomery. Wykazano mianowicie w roztworach spektryny o stężeniu 10—20 mg/ml obecność oligomerów zawierających aż do 11 dimerów [109]. Wyższe oligomery zawierające wyłącznie spektrynę wyodrębniono z błony erytrocytów [110]. Takie oligomery spektryny w błonach erytrocytów obserwowano już wcześniej w badaniach z zastosowaniem odczynników sieciujących [97, 105, 106].

III-5. Oddziaływania spektryny z innymi składnikami erytrocytu

Jak już wspomniano, spektryna oddziałuje z błoną erytrocytu głównie poprzez polipeptyd 2.1 — ankiryne (Ryc. 1) [38, 87, 104]. Stała powinowactwa kompleksu z ankiryne wynosi $1-5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ [87]. Miejsce wiązania ankiryne znajduje się w podjednostce 2 [41]. Jedna cząsteczka tetrameru spektryny w roztworze wiąże maksymalnie dwie cząsteczki an-



Ryc. 1. Struktura błony erytrocytów — rozmieszczenie i wzajemne oddziaływania białek. A — w płaszczyźnie poprzecznej i B. — w płaszczyźnie lateralnej błony erytrocytów (bez zachowania proporcji wielkości białek integralnych).

A. — oznaczenia poszczególnych białek odpowiadają elektroforetycznym frakcjom polipeptydowym [23]; 1 — podjednostka 1 spektryny, 2 — podjednostka 2 spektryny; 2.1 — ankiryna; 3 — polipeptyd 3 (białko 3 pasma elektroforetycznego, białko transportujące aniony); GFA — glikoforyna A (PAS 1, sialoglikoproteid α); GFC — glikoforyna C (PAS 2, sialoglikoproteid β , glikonektyna); 4.1 — polipeptyd 4.1; 4.2 — polipeptyd 4.2; 5 — aktyna; 6 — dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; B. — oznaczenia poszczególnych białek błony: $(1, 2)_n$ — spektryna, ($n = 2, 3, 4$) tetramer, heksamer, oktamery; $(3)_2$ — polipeptyd 3, dimer; $(3)_1$ — polipeptyd 3, tetramer; $(GFA)_2$ — glikoforyna A, dimer; GFC — glikoforyna C; 4.1 — polipeptyd 4.1; $(5)_{10}$ — aktyna, dekamer; 2.1 — ankiryna. Na rycinie zaznaczono schematycznie ważniejsze oddziaływania: polipeptyd 3 w formie tetramery będącego w równowadze z dimerem [111] tworzy kompleks z dimeryczną glikoforyną A będącą w równowadze z wolnym dimerem [112–114]. Tetramer polipeptydu 3 wiąże tetramer polipeptydu 4.2 oraz polipeptyd 6 [23, 115, 116]. Około 40% tetramery polipeptydu 3 oddziałuje z ankiryną [117, 118]. Ankiryna łączy się ze spektryną występującą w postaci heterotetramerów i wyższych oligomerów [87, 105, 106, 108, 109]. Spektryna oddziałuje z dekamerem aktyny [119]. W połączeniach spektryny z aktyną pośredniczy polipeptyd 4.1 [120, 122]. Polipeptyd ten bierze również udział w połączeniach spektryny z glikoforyną C [123, 124]. Spektryna oddziałuje również z fosfolipidami cytoplazmatycznej warstwy błony wykazując powinowactwo do fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanalaminy [125]. Na schemacie nie zaznaczono wyższych niż oktamery oligomerów spektryny ani wyższych niż dekamery polimerów aktyny [126].

kiryny. Ze stężenia ankiryiny i spektryny wynika, że w erytrocytach jeden heterotetramer spektryny wiąże jedną cząsteczkę ankiryiny (Ryc. 1). Fragmenty ankiryiny (polipeptydy 2.2, 2.3... 2.6, syndeiny), powstałe w wyniku endogennej proteolizy również wiążą spektrynę [127]. Ankiryna wiąże się również z cytoplazmatycznym odcinkiem polipeptydu 3. Tworzą one w roztworze kompleks o stałej powinowactwa $1.3-2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ [117, 118]. Z porównania ilości cząsteczek polipeptydu 3 i ankiryiny w erytrocytach wynika, że około 40% polipeptydu 3 wiąże się ze szkieletem komórkowym poprzez ankiryinę [117, 118].

Spektryna dystalnymi końcami tetrameru wiąże się z aktyną, drugim białkiem strukturalnym szkieletu komórkowego [119]. Aktyna błony występuje w postaci dekamerów o długości około 26 nm [119]. Należy dodać, że ostatnio pojawiły się dane o występowaniu aktyny w błonie erytrocytów w postaci polimerycznej [126]. Kompleks spektryny z aktyną powstaje w obecności polipeptydu 4.1 o masie cząsteczkowej 78 000 [120—122]. Dodatek tego białka aktywuje wiązanie F-aktyny z pęcherzykami błon erytrocytów pozbawionych uprzednio spektryny i aktyny [128—130]. Obydwie podjednostki spektryny niezbędne są do utworzenia kompleksu z aktyną i polipeptydem 4.1 [41]. Każdy heterotetramer zawiera dwa miejsca wiążące polipeptyd 4.1 [120]. Polipeptyd 4.1 odgrywa także rolę w wiązaniu spektryny w błonie erytrocytu. Tworzy on mianowicie kompleks z glikoforyną C (Rys. 1) [123, 124] (sialoglikoproteid β , PAS 2) nazywaną glikonektyną. Ze względu na małą ilość glikonektyny [13] w błonie erytrocytów ilość takich kompleksów jest znacznie mniejsza niż kompleksów spektryny z ankiryną i polipeptydem 3.

Oprócz oddziaływań z białkami integralnymi spektryna oddziałuje również z fosfolipidami błony erytrocytów [125]. W układach modelowych obserwuje się interakcję spektryny z liposomami sporządzonymi zarówno z dodatnio jak i ujemnie naładowanych fosfolipidów. Oddziaływanie spektryny z dodatnio naładowanymi liposomami jest natury elektrostatycznej, gdyż zanika pod wpływem podwyższonej siły jonowej. Oddziaływanie spektryny z ujemnie naładowanymi fosfolipidami jest natury hydrofobowej, gdyż nie eliminuje go podwyższenie siły jonowej [132, 133]. Oddziaływania elektrostatyczne dodatnich grup obecnych w cząsteczce spektryny z ujemnie naładowanymi resztami fosfolipidów odgrywają jednak pewną rolę, gdyż zubożenie ujemnych ładunków spektryny (obniżenie pH) zwiększa jej wnikanie do monowarstwy lipidowej w układzie modelowym [134]. Ilość wiązanej spektryny zwiększa się wtedy, gdy zamiast liposomów z czystej fosfatydyloseryny zastosuje się jej mieszaninę z innym fosfolipidem. Liposomy sporządzone z mieszaniny fosfatydyloseryny z fosfatydyloetanoliną wiążą najwięcej spektryny [135]. Oddziaływanie spektryny z fosfolipidami jakkolwiek znacznie słabsze (stała powinowactwa dla fosfatydyloseryny wynosi $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ [135]) od oddziaływania z białkami integralnymi ma istotne znaczenie w kształtowaniu struktury

i funkcji błony. Wiązanie spektryny z pęcherzykami błon erytrocytów, pozbawionych jej uprzednio, wpływa na wzrost uporządkowania warstwy lipidowej [137]. Badania nad sieciowaniem spektryny w erytrocytach przy użyciu dwuamidu i czterotionianu wykazały, że spektryna oddziałuje z fosfolipidami wewnętrznej warstwy błony i wpływa na właściwości całej błony. Interakcja spektryny z fosfolipidami jest czynnikiem utrzymującym ich asymetryczne rozmieszczenie w błonie [47, 125, 138]. Fosfatydyloetanolamina, fosfolipid charakterystyczny dla wewnętrznej warstwy błony, po utlenieniu grup -SH spektryny staje się dostępna dla dodanej do zawiesiny całych erytrocytów fosfolipazy [138]. Utratę asymetrii poprzedza znaczny wzrost ruchliwości poprzecznej (transwersalnej, *flip-flop*) lipidów [139]. Asymetria tych lipidów zanika także po usunięciu spektryny z błony erytrocytów [140]. Usieciowanie spektryny wpływa także na wzrost płynności zewnętrznej warstwy błony spowodowany zapewne wzrostem ilości fosfatydyloetanolaminy w tej warstwie [141]. Innymi efektami usieciowania spektryny w erytrocytach są: wyraźne usztywnienie erytrocytów [142], spadek ruchliwości lateralnej białek integralnych [143], agregacja cząstek wewnątrz błonowych [144, 145] oraz utworzenie „porów” wodnych [146].

Potraktowanie erytrocytów difluorodinitrobenzenem, odczynnikiem sieciującym grupy aminowe powoduje związanie spektryny z fosfatydyloseryną i fosfatydyloetanolaminą [147]. W wyniku sieciowania cząsteczka spektryny wiąże kowalencyjnie 38 cząsteczek fosfolipidów [147]. Za częściowym wnikaniem spektryny do wnętrza warstwy lipidowej przemawia znakowanie jej w erytrocytach hydrofobowymi znacznikami — aryloizotiocyanianami [148, dane własne niepublikowane]. Uważa się, że powinowactwo spektryny do fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy w błonie erytrocytów wynika z większej od innych fosfolipidów „ściśliwości” wynikającej z większej powierzchni zajmowanej przez te fosfolipidy w błonie, a spowodowanej znacznym nienasyceniem ich składowych kwasów tłuszczowych [134].

Podjednostka 1 spektryny zawiera obszar wiążący podjednostkę 2. Ograniczona proteoliza spektryny trypsyną pozwala otrzymać stabilny fragment o masie cząsteczkowej około 80 000, pochodzący z podjednostki 1 [149, 150]. Fragment ten tworzy kompleksy zarówno z dimerem, jak i z tetramerem spektryny oraz hamuje jej tetrameryzację [149—151]. Sądzi się [151], że podjednostka 1 zawiera niewysyczone miejsce mogące wiązać więcej niż jedną podjednostkę 2. W dimerze może ona wiązać następny dimer tworząc tetramer, a ten z kolei następny tworząc heksamer.

Spektryna w obecności jonów wapnia wiąże kalmodulinę [152—154], a miejsce jej wiązania znajduje się w podjednostce 1 spektryny. Szczegółowy opis struktury i funkcji kalmoduliny znajdzie czytelnik w artykule Kuźnickiego i Drabikowskiego [155]. Nie znany jest wpływ kalmoduliny na spektrynę. Wiadomo, że spektryna jest zdolna wiązać

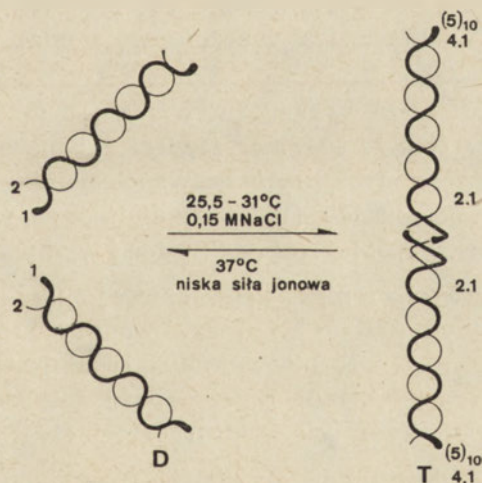
około 97% kalmoduliny erythrocytu, podczas gdy zależna od jonów wapnia Ca^{2+} -ATP-aza, która ulega aktywacji w obecności kalmoduliny, pozostała 3% [153]. Nie wiadomo jednak czy w komórce, gdzie stężenie jonów wapnia jest bardzo niskie (poniżej $1 \mu\text{M}$) spektryna wiąże kalmodulinę.

Być może wiązanie kalmoduliny stanowi funkcjonalne połączenie szkieletu komórkowego z „pompą wapniową”. W erythrocytach występuje Ca^{2+} -ATP-aza aktywowana przez spektrynę, a niezależna od kalmoduliny i „pompy wapniowej”. Spektryna tworzy kompleks z tą ATP-azą w stosunku 1:1 [156, 157].

Spektryna zawiera także 14 miejsc wiążących 2,3-dwufosfoglicerynian. Stała powinowactwa tego kompleksu wynosi $1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ [158]. Uważa się, że interakcja ta ułatwia transport tlenu. Metabolit ten hamuje fosforylację spektryny [159].

III-6. Równowaga heterodimer-heterotetramer spektryny

Heterotetramer spektryny o masie cząsteczkowej około 900 000 i stałej sedymentacji S_{20W} 11.5—12.2 [37] w roztworach o niskiej sile jonowej w 37°C przechodzi w heterodimer o masie cząsteczkowej około 460 000 i stałej sedymentacji S_{20W} około 9,5 S [21, 33]. W niskiej temperaturze i w roztworach o umiarkowanej sile jonowej zarówno heterotetramer jak i heterodimer są względnie stabilne i wykazują niewielką tendencję do wzajemnych przejść [21, 33]. Przejście heterotetramery w heterodimer w 37° osiąga równowagę po około 30 minutach w roztworze o umiarko-



Ryc. 2. Schemat struktury heterodimerów (D) i heterotetramerów (T) spektryny.

Dimer (D) stanowi podwójną spiralę ułożonych równolegle do siebie podjednostek 1 i 2 o długości około 100 nm [107, 177, 179]. Heterotetramer o długości dwa razy większej tworzą dwa heterodimery łącząc się liniowo według symetrii „głowa—głowa” [179]. Na schemacie zaznaczono miejsca wiązania ankiryny (2.1), polipeptydu 4.1 i aktyny (5) [107, 179]. W roztworze, w 37°C i niskiej sile jonowej dimer jest składnikiem uprzywilejowanym. W temperaturze $25,5-31^\circ\text{C}$ i umiarkowanej sile jonowej dimer asocjuje do tetramery [21].

wanej sile jonowej (0.15 M NaCl) (Ryc. 2). Dysocjacja tetrameru do dimeru spełnia warunki reakcji I rzędu. Asocjacja dimeru do tetrameru zachodzi w temperaturze 25,5—31°C w obecności 0.15 M NaCl. Szybkość tej reakcji zależy od stężenia substratów i spełnia warunki reakcji II rzędu. Stała równowagi tego przejścia w 0.15 M NaCl w temperaturze 29,5°C wynosi $1,5 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$. Wysoka energia aktywacji tego procesu (około 290 kJmol⁻¹) wskazuje na zmiany konformacji spektryny podczas asocjacji. Szybkość asocjacji dimer — tetramer zmniejsza się wraz z obniżaniem siły jonowej. Stąd w niskiej sile jonowej dimer staje się formą uprzywilejowaną (Ryc. 2). Stała równowagi przejścia tetramer — dimer w 37°C i niskiej sile jonowej jest dużo mniejsza niż $1 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$. Na równowagę układu dimer-tetramer nie wpływa stan ufosforylowania podjednostki 2 spektryny [21].

III-7. Struktura przestrzenna spektryny w roztworze — spektryna niepodobna do miozyny

W obecności detergentów lub mocznika wyodrębniony heterodimer spektryny daje monomery o stałej sedymentacji 4.4 S [32] lub 5.5 S (w dezoksyholanie) [160]. Wyodrębnione w obecności mocznika lub SDS [39—41] podjednostki, po usunięciu czynnika denaturującego, odzyskują strukturę spiralną w stopniu przypominającym strukturę heterodimeru, co świadczy o tym, że ich interakcja nie decyduje o strukturze natywnej spektryny. Z przebiegu denaturacji dimerów spektryny mocznikiem wynika, że dysocjacja podjednostek znacznie wyprzedza ich rozfałdowanie [161].

Spektryna w roztworze wykazuje w większości (około 70%) strukturę spiralną [32, 162], z tym że tetramer zawiera jej nieco więcej niż dimer. Nie wykazano obecności struktury beta. Współczynniki sedymentacji i zawartość struktury *alfa* spiralnej [162, 163] obniżają się w roztworach o niskiej sile jonowej wskazując na rozprostowanie i wydłużenie cząsteczki.

Białko to w roztworze o niskiej sile jonowej charakteryzuje się przejściem temperaturowym (20—50°C) obserwowanym zarówno w rotacji optycznej jak i kalorymetrii różnicowej. W 0.15 M NaCl przejście to jest ostre w temperaturze 49°C [162]. Należy dodać, że podobnie ostre przejście temperaturowe obserwuje się w erytrocytach [164].

Początkowo doszukiwano się podobieństw zarówno w strukturze jak i funkcji spektryny i miozyny mięśniowej. Uważano, że cząsteczka spektryny wykazuje strukturę pałeczkowatą [165—171]. Pojawiło się nawet doniesienie o słabej, aczkolwiek swoistej reaktywności spektryny z przeciwciałami antymiozynowymi [169], a także o dużym podobieństwie własności hydrodynamicznych i optycznych obu białek [166]. Badania porównawcze

map peptydowych [50], jak też struktury przestrzennej nie potwierdziły tych przypuszczeń. Właściwości fizyczne hetero-dimerów i heterotetramerów (Tabela 1) wykazały, że są to cząsteczki o niskiej lub umiarkowanej

Tabela 1.

Niektóre właściwości fizyko-chemiczne spektryny erytrocytów

Właściwość	Monomer	Dimer	Tetramer	Piśmien- nictwo
Absorpcja w UV, $E_{280}^{1\% \cdot 1\text{cm}}$	11.5			[29]
Masa cząsteczkowa $\times 10^3$	240*) 220**)	460—470	960—970	[12, 32, 33, 37]
Stała sedimentacji S_{20W} [S]	4.4	9.3	12.2	[29, 32, 33, 37, 162, 163]
Promień Stokesa [A]	—	115—140	195—201	[29, 163]
Stosunek osi a/b	—	7.2	4.0	[29, 163]

*) podjednostka 1

***) podjednostka 2

asymetrii: stosunek osi w dimerze wynosi 7 [128] a w tetramerze 4 [29]. Tetramer zbliża się w swej asymetrii do cząsteczki albuminy surowicy wołu. W cząsteczce miozyny stosunek osi wynosi około 100 [172]. Właściwości hydrodynamiczne dimeru nie odpowiadają ani cząsteczce globularnej ani cząsteczce o formie sztywnej pałeczki [163]. Badania rozpraszania światła [173] wskazują, że promień żyracji dimeru 22 nm po obniżeniu stężenia soli do około 1 mM wzrasta do około 40 nm, co wskazuje na to, że dimery spektryny są elastycznymi, wydłużonymi cząsteczkami o długości 76—140 nm. Dane te potwierdzają również pomiary dwójłomności elektrycznej [174—176]. Na podstawie fizycznych własności dimerów *Dunbar* i *Ralston* [163] wnioskuje, że struktura spektryny odpowiada modelowi elastycznej lub skręconej pałeczki. Preparaty dimerów sporządzone techniką niskokątowego, rotacyjnego cieniowania obserwowane w mikroskopie elektronowym wykazały obecność wielu różnych struktur, co potwierdza dane o elastyczności cząsteczki [177]. Oczekiwana długość dimeru spektryny wynikająca z istnienia struktury alfa spiralnej w oznaczonej proporcji powinna przekraczać 200 nm. Dalsze badania przy użyciu mikroskopu elektronowego wskazują, że heterodimer spektryny jest asymetryczną cząsteczką o długości tylko 100 nm utworzoną z dwóch ułożonych równolegle do siebie i skręcających się w luźną podwójną spiralę monomerów. Stosunek osi dimeru wyznaczony tą metodą wynosi około 5 [177—179]. Przebieg denaturacji dimeru wskazuje na obecność niezależnie od siebie rozwijających się domen przedzielonych odcinkami o struktu-

rze elastycznej i nieglobularnej [161]. Odcinki te charakteryzują się dużą wrażliwością na proteolizę [48, 52]. Widma wysokorozdzielczego protonowego rezonansu jądrowego wykazały, że około jedną piątą cząsteczki spektryny charakteryzuje znaczny stopień hydrofobowości [161]. Znaczny wpływ siły jonowej na promień Stokes'a przemawia również za taką strukturą dimeru. Prawdopodobnie odcinki hydrofobowe w spektrynie nie są równomiernie rozłożone wzdłuż cząsteczki, ale skupiają się w kilku miejscach zawierających reszty tryptofanu i wiążące bromowane kwasy tłuszczowe, za czym przemawia wygaszanie fluorescencji wszystkich reszt tryptofanu [180].

Mapowanie peptydów uzyskanych po trawieniu spektryny trypsyną w 0°C pozwala wnioskować, że cząsteczka spektryny zawiera 9 różnych domen względnie niewrażliwych na proteolizę (podjednostka 1 — pięć, a podjednostka 2 — cztery domeny [181]). Domeny zorientowane są przypuszczalnie równoległe do długiej osi cząsteczki, o czym świadczą niekowalencyjne oddziaływania pomiędzy wyodrębnionymi fragmentami obu podjednostek. Domeny różnią się od siebie opornością na trawienie trypsyną. W dalszych badaniach [182] uzyskano serię monoklonalnych przeciwciał dla podjednostki 1, przy pomocy których potwierdzono występowanie pięciu różnych domen w tej podjednostce.

Badania hydrodynamiczne tetrameru spektryny wskazują, że jest on cząsteczką bardziej symetryczną od dimeru [29, 163]. Stąd zakładano, że tetramer ma strukturę „krzyża” [7, 30]. Badania przy użyciu mikroskopu elektronowego jednakże wykazały, że tetramer powstaje z dwóch dimerów połączonych ze sobą według symetrii „głowa-głowa”. Tworzy on cząsteczkę o długości około 200 nm [178, 179]. Kompleksy z ankiryną i polipeptydem 4.1 pozwoliły ustalić, że miejsca wiązania ankiryny leżą w każdym heterodimerze w odległości około 20 nm od środka heterotetrameru a miejsca wiązania polipeptydu 4.1 i aktyny znajdują się przy obu końcach tetrameru [179] (Ryc. 2). Nie wyjaśnioną sprawą pozostaje wzrost symetrii tetrameru w stosunku do dimeru obserwowany w badaniach hydrodynamicznych [163]. Uważa się, że dłuższa cząsteczka staje się podatniejsza na zgięcia i skręcenia co zwiększa jej symetrię. Domieszka drobnych ilości nieliniowych, wyższych oligomerów [108—110] będzie również wpływać na oznaczany wzrost symetrii cząsteczek spektryny.

IV. Polipeptyd o masie cząsteczkowej 240 000 składnikiem białek szkieletu komórkowego

Do niedawna uważano, że spektryna jest swoistym białkiem erytrocytów [184, 185]. Zwracano uwagę na podobieństwa jakie zachodzą pomiędzy spektryną i innymi białkami wiążącymi aktynę takimi jak filamina, czy białko makrofagów wiążące aktynę [186—189]. Białka te wykazują pewne

podobieństwa strukturalne do spektryny — cząsteczki ich są również wydłużone, spiralne i elastyczne [188]. Podobieństwo to jest jednak bardzo ograniczone. Białka te zbudowane są z jednego rodzaju podjednostek o masie cząsteczkowej około 250 000. Mają one strukturę pojedynczej spirali [188—190] i nie wiążą kalmoduliny [190]. Przeciwciała antyfilaminowe reagują z białkiem wiążącym aktynę z makrofagów [191] a nie reagują ze spektryną [190].

W ostatnim czasie pojawiło się jednak kilka doniesień skłaniających do weryfikacji poglądów o występowaniu spektryny wyłącznie w erytrocytach. Przeciwciała uzyskane przeciw podjednostce 1 spektryny erytrocytów kurzczenia reagują ze spektryną erytrocytów ssaków [192]. Badania immunofluorescencyjne wykazały, że przeciwciała te reagują z białkami położonymi blisko cytoplazmatycznej powierzchni błony komórkowej komórek różnych organów kurcząt [192]. Podobnie przeciwciała skierowane przeciw spektrynie erytrocytów ludzkich reagują z białkami o podobnej masie cząsteczkowej błon komórkowych nerek, wątroby, jąder i mózgu świni [193]. Embrionalne miocyty serca kurzczenia, mysie fibroblasty linii 3T3, transformowane wirusem SV-40 fibroblasty 3T3 oraz komórki hepatoma szczura zawierają białko zbudowane z dwóch polipeptydów o masie cząsteczkowej 230 000 i 240 000 wykazujące znaczne podobieństwo w strukturze pierwszorzędowej do spektryny [194].

Fracje błon komórkowych mózgu są najbogatszym źródłem nazwanej przez *Bennetta* i wsp. [193] „spektryny mózgowej”. Prawdopodobnie tego samego białka dotyczą doniesienia mówiące o fodrynie, kalspektynie lub białku wiążącym kalmodulinę [194—203]. Spektrynopodobne białka ekstrahują się z błon komórkowych mózgu zarówno roztworami o wysokiej jak i niskiej sile jonowej [193, 198, 203] i podobnie jak spektryna nie ekstrahują się roztworami Tritonu X-100 [198]. Fodryna i kalspektyna zbudowane są z dwóch podjednostek o masie cząsteczkowej 240 000 i 235 000 [193, 196—198, 203]. Przeciwciała uzyskane przeciw zdenaturowanej fodrynie pozwoliły na jej lokalizację w korowej strefie cytoplazmy neuronów techniką immunofluorescencji [192]. Dalsze badania wykazały, że jest ona w około 70% związana z błonami komórek nerwowych, a w około 30% występuje w cytozolu [197, 198]. Najbogatszym źródłem kalspektyny są synaptosomy, a w szczególności ich błony [196, 202].

Innym białkiem spektryno-podobnym jest tzw. białko TW 260/240 komórek nabłonka jelita z rąbkiem prążkowanym (nabłonka szczoteczkiowego). Białko to jest jednym z głównych składników siateczki granicznej (*terminal web*) komórek nabłonka jelita. Szkielet mikrokosmków stanowią uporządkowane wiązki filamentów rdzeniowych połączonych leżącymi poniżej nich filamentami siateczki granicznej. Białko TW 260/240 jest heterotetramerem zbudowanym z dwóch rodzajów podjednostek o masie cząsteczkowej 260 000 i 240 000 [190].

Fodryna i TW 260/240 mają wiele cech wspólnych ze spektryną (Ta-

bela 2). Stanowią bowiem równomolarny kompleks dwóch podobnych podjednostek, wiążą i sieciują F-aktynę. W mikroskopie elektronowym strukturalnie przypominają spektrynę; wykazują strukturę elastycznych, podwójnie spiralnych cząsteczek różniących się długością. Dimery w tetramerze, podobnie jak w spektrynie łączą się według symetrii „głowa—głowa” [190, 197, 198, 203]. Podjednostki fodryny mają podobny do spektryny skład aminokwasowy [203]. Spektryna mózgowa wiąże się z błonami erytrocytów w miejscu wiązania spektryny wykazując jednak około dwukrotnie mniejsze powinowactwo [193]. Tetramer fodryny wykazuje sztywniejszą strukturę na co wskazuje niższy w porównaniu ze spektryną współczynnik sedymentacji — około 11 S [198, 203]. Tetramer fodryny wykazuje także większą stabilność w porównaniu z tetramerem spektryny, gdyż przechodzi w dimer podczas inkubacji w 37°C w obecności 1 M NaBr [193] lub 0.6 M KCl [198].

Kalspektyna podobnie jak spektryna ulega w błonach synaptycznych, niezależnej od cAMP endogennej fosforylacji. W wyodrębnionych błonach tylko podjednostka 2 o masie cząsteczkowej 235 000 ulega fosforylacji [204]. Obie podjednostki są fosforylowane w dodanej kalspektynie [205]. Dwie kinazy fosforylujące obie podjednostki kalspektyny wyodrębniono z błon komórkowych mózgu. Jedna z nich o masie cząsteczkowej 800 000 jest aktywna w obecności jonów wapnia i kalmoduliny, a druga o masie 80 000 jest aktywna niezależnie od kalmoduliny i jonów wapnia, ale dodatek jonów wapnia zwiększa jej aktywność [205]. Różnice w fosforylacji kalspektyny związanej z błonami i izolowanej wynikają z przestrzennego usytuowania podjednostek i różnic w dostępności dla kinaz [205].

Reaktywność tych białek z przeciwciałami antyspektrynowymi jest różnie interpretowana. Jedna z hipotez [193] zakłada, że homologia spektryny erytrocytów i jej mózgowego analogu jest rzędu 20%, na co wskazuje ograniczona reaktywność z przeciwciałami antyspektrynowymi oraz porównanie map peptydowych obu białek. Ograniczona homologia może być jedną z przyczyn niepowodzeń w wykrywaniu analogów spektryny w innych komórkach [193]. Spektryny stanowią wielogenową rodzinę białek o wspólnym pochodzeniu [193]. Spektryna erytrocytów jest najbardziej oddalona ewolucyjnie ze względu na funkcjonalną specjalizację erytrocytów [193]. Według innej, lepiej udokumentowanej hipotezy białka te zawierają wspólną podjednostkę o masie cząsteczkowej 240 000 [154, 203]. Przeciwciała uzyskane przeciw fodrynie i TW 260/240 reagują krzyżowo z podjednostkami o masie cząsteczkowej 240 000 obu białek a także z podjednostką 1 spektryny [154]. Podjednostka ta wiąże kalmodulinę [154, 190, 196—198]. Druga podjednostka każdego z tych białek jest przypuszczalnie swoista dla typu komórki (154, 203). W tabeli 2 porównano niektóre właściwości tych białek. Ograniczoną homologię z podjednostką 1 spektryny wykazuje również białko 2 izolowane z mózgu, wiążące się z mikrotubulami (MAP2) [206, 207]. Nie poznano, jak dotąd, ani udziału

Tabela 2.

Niektóre właściwości białek spektryno-podobnych

Nazwa	Źródło	Masa cząsteczkowa pojedynczy- stek $\times 10^3$	Stopień oligome- ryzacji	Wiązanie aktywne	Siecjo- wanie aktywne	Wiązanie kalmo- duliny		Reakcja z przeciw- ciałami anty- spektrynowymi		Oddziały- wanie z błoną erytrocy- tów	Pismien- nictwo
						cała cząste- czka	podjedno- stka 240 000	cała cząste- czka	podjedno- stka 240 000		
Fodryna	Mózg kurczęcia, świni	240 i 235	tetramer	+	+	+	+	+	+	brak danych	[154, 190, 203]
Kalspek- tyna	Błony komórek nerwowych, błony synaptyczne mózgu wołu	240 i 235	tetramer	+	+	+	+	brak danych	brak danych	brak danych	[196— 198]
Spektryna mózgowa	Błony komórkowe mózgu świni	260 i 265	tetramer	+	+	brak danych	brak danych	+	brak danych	+	[193]
-TW 260/ /240	Komórki nabłonka jelita kurczęcia	260 i 240	tetramer	+	+	+	+	—	+	brak danych	[154, 190]

białek spektryno-podobnych innych komórek w tworzeniu szkieletu komórkowego, ani także ich interakcji z błoną komórkową. Nie wszystkie cechy tych białek są wspólne. Rozbieżności w ocenie zawartości białek spektryno-podobnych i stopnia ich homologii ze spektryną erytrocytów nasuwają wątpliwości, czy białka mózgu przypominające spektrynę są identyczne.

V. Spektryna erytrocytów pacjentów z niektórymi anemiami hemolitycznymi

Niektóre anemie hemolityczne objawiające się między innymi nienormalnym kształtem erytrocytów są prawdopodobnie uwarunkowane uszkodzeniami cząsteczek białek tworzących szkielet komórkowy [208].

Spektryna osób z eliptycytozą jest podatna na denaturację cieplną [209] oraz wykazuje zaburzoną asocjację dimer-tetramer [210]. Spektryna krwinek tych osób wykazuje zwiększoną wrażliwość na trypsynę [211]. W niektórych przypadkach (typ I) uzyskuje się zmienione mapy peptydowe w wyniku strawienia spektryny trypsyną [212, 213]. Obserwuje się wzrost zawartości fragmentu o masie cząsteczkowej 73 000 i równocześnie spadek ilości fragmentu o masie cząsteczkowej 80 000. U pacjentki z dziedziczną eliptycytozą wykryto obecność wariantu podjednostki 2 spektryny o masie cząsteczkowej 214 000 występującej obok normalnej podjednostki 2 [213]. Obecność tej zmienionej podjednostki (wariant *beta* — Le Puy) nie ulegającej fosforylacji powoduje zmienioną interakcję dimerów [213].

Dziedziczna pyropoikiloza jest rzadkim schorzeniem, które charakteryzuje nieprawidłowy kształt erytrocytów i ich wzmożona podatność na fragmentację pod wpływem podwyższonej temperatury [214] spowodowaną prawdopodobnie dziedzicznie uszkodzoną spektryną [215, 216]. Spektryna krwinek osób z tym schorzeniem wykazuje również zwiększoną podatność na denaturację cieplną [216].

Inną anemią z tej grupy jest dziedziczna sferocytoza. Błony erytrocytów myszy z ostrą anemią sferocytyczną spowodowaną obecnością alleli recesywnych wykazują obniżoną zawartość spektryny [217]. W opisanych dwóch przypadkach ostrej sferocytozy błony erytrocytów zawierały najwyżej połowę normalnej ilości spektryny, z tym że ubytek podjednostki 1 był nieco większy niż podjednostki 2 [218]. Erytrocyty charakteryzowała bardzo duża wrażliwość osmotyczna. Przypadki ostrej, homozygotycznej sferocytozy są bardzo rzadkie. Przypuszcza się, że nawet małe obniżenia ilości spektryny spowodowane defektami genetycznymi prowadzącymi bądź do obniżenia syntezy, bądź do modyfikacji potranslacyjnej może powodować cały wachlarz zmian obserwowanych w dziedzicznej sferocytozie [218]. Sporo danych dotyczy innych uszkodzeń szkieletu komórkowego [208, 219, 220], na przykład obniżenia ilości ankiryiny lub polipeptydu 4.1.

VI. Podsumowanie

Za spektrynę uważa się białko błon erytrocytów zbudowane z łańcuchów polipeptydowych 1 i 2 analizowanych elektroforetycznie w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS. Masa cząsteczkowa podjednostek spektryny wynosi 240 000 i 220 000. Punkt izoelektryczny podjednostek 1 i 2 mieści się w przedziale pH 5.0-5.2. Podjednostka 2 spektryny ulega niezależnej od cAMP fosforylacji. W podjednostce tej znajduje się miejsce wiążące ankiryne. W podjednostce 1 znajduje się miejsce wiążące podjednostkę 2 odpowiadające za tworzenie oligomerów spektryny. Podjednostka 1 wiąże kalmodulinę. Obydwie podjednostki niezbędne są do utworzenia kompleksu z aktyną i polipeptydem 4.1. W natywnych komórkach występują tetramery i wyższe oligomery spektryny utworzone z heterodimerów. Spektryna, zarówno tetrameryczna jak i dimeryczna jest elastyczną cząsteczką o strukturze podwójnej spirali i umiarkowanej asymetrii. Spektryna występuje w erytrocytach wszystkich zbadanych gatunków zwierząt. Podjednostka 1 spektryny okazała się białkiem bardzo podobnym lub nawet identycznym z podjednostkami o masie cząsteczkowej 240 000 białek szkieletu komórkowego innych komórek. W przypadkach niektórych anemii hemolitycznych stwierdza się występowanie w erytrocytach zmienionej podjednostki 2 lub znaczne zmniejszenie ilości spektryny.

Autor serdecznie dziękuje Pani Profesor dr Wandzie Mejbaum-Katzenellenbogen za pomoc w redakcji tej pracy oraz za życzliwe uwagi i dyskusję a dr A. Kozubkowi za dyskusję i graficzne opracowanie ryc. 1

Zaakceptowano do druku 9.03.1984

PIŚMIENNICTWO

1. Singer S. J., (1971), The Molecular Organization of Membranes, w "Structure and Function of Membranes" (Rothfield L. I. — wyd.) Acad. Press, New York, str. 146—222.
2. Singer S. J., Nicolson G. L., (1972), *Science*, **175**, 720—731.
3. Singer S. J., (1972), *Annals N.Y. Acad. Sci.*, **195**, 16—23.
4. Juliano R. L., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **300**, 341—378.
5. Nicolson G. L., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 57—108.
6. Nicolson G. L., Poste G., (1976), *New England J. Med.*, **293**, 197—203.
7. Ralston G. B., (1978), *TIBS*, **3**, 195—198.
8. Kirkpatrick F. H., (1976), *Life Sci.*, **19**, 1—18.
9. Hoogeven J. T., Juliano R. L., Coleman J., Rothstein A., (1970), *J. Membr. Biol.*, **3**, 156—172.
10. Marchesi V. T., Steers E. Jr., (1968), *Science*, **159**, 203—204.
11. Marchesi S. L., Steers E., Marchesi V. T., Tillack J. W., (1970), *Biochemistry*, **9**, 50—57.
12. Clarke M., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1063—1070.

13. Steck T. L., Fairbanks G., Wallach D. F. H., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2617—2621.
14. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2606—2617.
15. Trayer M. R., Nozaki Y., Reynolds J. A., Tanford C., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4485—4488.
16. Rosenberg S. A., Guidotti H. G., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 1985—1992.
17. Maddy A. H., Kelly P. G., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 290—301.
18. Mazia D., Ruby A., (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 1005—1012.
19. Fuller G. M., Boughter M., Morazzani M., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3036—3041.
20. Marchesi V. T., (1979), *J. Membr. Biol.*, **51**, 101—131.
21. Ungewickell E., Gratzer W. B., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **88**, 379—385.
22. Gwynne J. T., Tanford C., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3269—3271.
23. Steck T. L., (1974), *J. Cell. Biol.*, **62**, 1—19.
24. Nicolson G. L., Marchesi V. T., Singer S. J., (1971), *J. Cell. Biol.*, **51**, 265—272.
25. Nicolson G. L., Singer S. J., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 942—945.
26. Shin B. C., Carraway K-L., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **345**, 141—153.
27. Mueller T. J., Morrison M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7568—7574.
28. Boxer D. M., Jenkins R. E., Tanner M. J. A., (1974), *Biochem. J.*, **137**, 531—534.
29. Ralston G. B., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 163—172.
30. Ralston G. B., (1978), *J. Supramol. Str.*, **8**, 361—373.
31. Reynolds J. A., (1972), *Annals N.Y. Acad. Sci.*, **195**, 75—85.
32. Gratzer W. B., Beaven G. H., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **58**, 403—409.
33. Ralston G. B., Dunbar J. C., White M. D., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **491**, 345—348.
34. Morrison W. L., Neurath H., (1953), *J. Biol. Chem.*, **200**, 39—51.
35. Carraway K-L., Triplett R. B., Anderson D. R., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 571—581.
36. Siegel D. L., Goodman S. R., Branton D., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **598**, 571—581.
37. Ralston G. B., (1975), *Austr. J. Biol. Sci.*, **28**, 297—317.
38. Bennett V., Brauton D., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2753—2763.
39. Lemay A., (1979), *Anal. Biochem.*, **92**, 130—135.
40. Hsu C. J., Lemay A., Eshdat Y., Marohesi V. T., (1979), *J. Supramol. Str.*, **10**, 227—239.
41. Calvert R., Bennett P., Gratzer W. B., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **107**, 355—361.
42. Eshdat Y., Lemay A., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **577**, 360—370.
43. Haest C. W. M., Kamp D., Plaza G., Deuticke B., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **469**, 226—230.
44. Liu S. C., Fairbanks G., Palik J., (1977), *Biochemistry*, **16**, 4066—4074.
45. Haest C. W. M., Kamp D., Deuticke B., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **557**, 369—371.
46. Haest C. W. M., Deuticke B., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **436**, 353—363.
47. Haest C. W. M., Plasa G., Kamp D., Deuticke B., (1980), w "Membrane Transport in Erythrocytes", Alfred Benzon Symp. 14, (Lassen U. W., Using H. H., Wieth J. O. wyd.) Munksgaard Kopenhaga, str. 108—123.
48. Anderson J. M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 939—944.
49. Maddy A. H., Dunn M. J., (1978), *J. Supramol. Str.*, **8**, 465.

50. Zweig S. F., Singer S. J., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 1147—1152.
51. Calvert R., Gratzer W. B., (1978), *FEBS Lett.*, **86**, 247—249.
52. Speicher D. W., Morrow J. S., Knowles W. J., Marchesi V. T., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5673—5677.
53. Dunn M. J., Maddy A. H., (1973), *FEBS Lett.*, **36**, 79—82.
54. Knufermann H., Bhakdi S., Schmidt-Ullrich R., Wallach D. F. H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **330**, 356—361.
55. Dunn M. J., McBay W., Maddy A. H., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **386**, 107—119.
56. Hudson J. R., Ralston G. B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **535**, 169—177.
57. Elgsaeter A., Shotton D. M., Branton D., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 101—122.
58. Yu J., Branton D., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3891—3895.
59. Bhakdi S., Knufermann H., Wallach D. F. H., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **345**, 448—457.
60. Bjerrum O. J., Bhakdi S., Bøg-Hansen T. C., Knufermann H., Wallach D. F. H., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **406**, 489—504.
61. Green J. R., Dunn M. J., Spooner R. L., Maddy A. H., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **373**, 51—57.
62. Anderson D. R., Davis J. L., Carraway K-L., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6617—6623.
63. Kopeć M., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 3—28.
64. Palmer F. P., Verporte J. A., (1971), *Can. J. Biochem.*, **49**, 337—347.
65. Avruch J., Fairbanks G., (1974), *Biochemistry*, **13**, 5507—5514.
66. Hosey M. M., Tao M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 102—109.
67. Fairbanks G., Avruch J., Dino J. E., Patel V. P., (1978), *J. Supramol. Str.*, **9**, 97—112.
68. Hosey M. M., Tao M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **482**, 348—357.
69. Hosey M. M., Tao M., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1561—1566.
70. Avruch J., Fairbanks G., Grapo L. M., (1976), *J. Cell. Physiol.*, **89**, 815—826.
71. Graham C., Avruch J., Fairbanks G., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 701—708.
72. Clari C., Michielin E., Moret V., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 240—252.
73. Rubin C. S., Rosen O. M., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 421—429.
74. Roses A. D., Appel S. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1408—1411.
75. Birchmeier W., Singer S. J., (1977), *J. Cell Biol.*, **73**, 647—659.
76. Dunbar J. C., Ralston G. B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **510**, 283—291.
77. Wolfe L., Lux S. E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3336—3342.
78. Waxman L., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 300—314.
79. Harris H. W., Lux S. E., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11512—11520.
80. Harris H. W. Jr., Levin N., Lux S. E., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11521—11525.
81. Nelson M. J., Ferrell J. E., Huestis W. H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **558**, 136—140.
82. Nelson M. J., Huestis W. H., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 398—405.
83. Nelson M. J., Daleke D. L., Huestis W. H., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **686**, 182—188.

84. Wyatt J. L., Greenquist A. C., Shohet S. B., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1279—1285.
85. Patel V. P., Fairbanks G., (1981), *J. Cell. Biol.*, 88, 430—440.
86. Lutz H. V., (1982), 3rd Meeting of Europ. Red Cell Club, Bern, Szwajcaria.
87. Bennett V., Stenbuck P. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 2533—2541.
88. Maticic S., Loewy A. G., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24, 858—870.
89. Pisano J. J., Finlayson J. S., Peyton M. R., (1969), *Biochemistry*, 8, 87—93.
90. Lorand L., Downey J., Gotch T., Jacobsen A., Tokura S., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31, 222—230.
91. Siefiring G. E., Lorand L., (1978), w *Erythrocyte Membranes: Recent Clinical and Experimental Advances*", str. 25—32, Alan R. Liss, Inc. New York.
92. Chung S. J., Folk J. E., (1975), *Fed. Proc.*, 34, 259, (234),
93. Siefiring G. E., Apostol A. B., Velasco P. T., Lorand L., (1978), *Biochemistry*, 17, 2598—2604.
94. Dutton A., Singer S. J., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 2568—2572.
95. Lorand L., Shishido R., Parameswaran K. N., Steck T. L., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 67, 1158—1169.
96. Shishido R., Parameswaran K. N., Lorand L., (1976), *Fed. Proc.*, 35, 475, (1488).
97. Ji T. H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 539, 39—69.
98. Steck T. L., (1972), *J. Mol. Biol.*, 66, 295—305.
99. Hulla F. W., Gratzner W. B., (1972), *FEBS Lett.*, 25, 275—278.
100. Aizawa S., Kurimoto F., Yokono O., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75, 870—878.
101. Wang K., Richards F. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, 249, 8005—8018.
102. Kiehm D. J., Ji T. H., (1977), *J. Biol. Chem.*, 252, 8524—8531.
103. Yu J., Steck T. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 9170—9175.
104. Goodman S. R., Weidner S. A., (1980), *J. Biol. Chem.*, 255, 8082—8086.
105. Middaugh C. R., Ji T. H., (1980), *Eur. J. Biochem.*, 110, 581—592.
106. Ji T. H., Kiehm D. J., Middaugh C. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, 255, 2990—2993.
107. Branton D., Cohen C. M., Tyler J. M., (1981), *Cell*, 24, 24—32.
108. Tyler J. M., Reinhardt B. N., Branton D., (1980), *J. Biol. Chem.*, 255, 7034—7039.
109. Morrow J. S., Marchesi V. T., (1981), *J. Cell Biol.*, 88, 463—468.
110. Morrow J. S., Haigh W. B., Marchesi V. T., (1981), *J. Supramol. Struct.*, 17, 275—281.
111. Nakashima M., Nagakawa Y., Makino S., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 643, 509—518.
112. Marchesi V. T., (1979), *Semin. Hematol.*, 16, 3—20.
113. Nigg E. A., Bron C., Girardet M., Cherry R. J., (1980), *Biochemistry*, 19, 1887—1893.
114. Lutz M. V., von Daniken A., Semenza G., Bachi T., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 552, 262—280.
115. Jones M. N., Nickson J. H., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 650, 1—20.
116. Yeltman D. R., Harris R. G., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, 199, 186—196.
117. Bennett V., Stenbuck P. J., (1979), *Nature*, 280, 468—473.
118. Hargreaves W. R., Giedd K. N., Verkleij A., Branton D., (1980), *J. Biol. Chem.*, 255, 11965—11972.
119. Brenner S. L., Korn E. D., (1980), *J. Biol. Chem.*, 255, 1670—1676.

120. Tyler J. M., Hargreaves W. R., Branton D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5192—5196.
121. Tyler J. M., Reinhardt B. N., Branton D., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7034—7039.
122. Cohen C. M., Foley S. F., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 691—701.
123. Mueller T. J., Morrison M., (1981), w "Erythrocyte Membranes 2, Recent Clinical and Experimental Advances" str. 95—112, Alan R. Liss Inc., New York.
124. Owens J. W., Mueller T. J., Morrison M., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **204**, 247—252.
125. Haest C. W. M., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **694**, 331—352.
126. Atkinson A. L., Morrow J. L., Marchesi V. T., (1982), *J. Cell. Biochem.*, **18**, 483—505.
127. Yu J., Goodman S. R., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2340—2344.
128. Fowler V. M., Luna E. J., Hargreaves W. R., Taylor D. J., Branton D., (1981), *J. Cell Biol.*, **88**, 388—393.
129. Fowler V., Taylor D. L., (1980), *J. Cell Biol.*, **85**, 361—376.
130. Cohen C. M., Korsgren C., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 1429—1435.
131. Furthmayr H., (1978), *J. Supramol. Str.*, **9**, 79—95.
132. Sweet C., Zull J. E., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 135—141.
133. Mombbers C., Verkleij A., deGier J., van Deenen L. L. M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **551**, 271—281.
134. Mombbers C., de Gier J., Demel R. A., van Deenen L. L. M., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **603**, 52—62.
135. Mombbers C., (1982), Praca doktorska, Uniwersytet Utrecht.
136. Schubert D., Herbst F., Marie H., Rudloff V., (1981), *Protides Biol. Fluids*, Proc. 29th Colloquium, Pergamon Press.
137. Sikorski A. F., (1978), III Zjazd P. T. Biofiz. Wrocław, str. 103.
138. Haest C. W. M., Plasa G., Kamp D., Deuticke B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 21—32.
139. Dressler V., Bergmann W., Haest C. W. M., Deuticke B., (1982), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **363**, 896.
140. Haest C. W. M., Erusalimsky J., Dressler V., Plasa G., (1982), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **363**, 898.
141. Williamson P., Bateman J., Kozarsky K., Matticks K., Hermanowicz L. N., Choe H-K., Schlegel R. N., (1982), *Cell*, **30**, 725—733.
142. Fisher T. M., Haest C. W. M., Stohr N., Kamp D., Deuticke B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **510**, 270—282.
143. Smith D. K., Palek J., (1982), *Nature*, **297**, 424—425.
144. Mohandas W., Wyatt J., Mel S. F., Rossi M. E., Shohet S. B., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6537—6543.
145. Kuratsin-Mills J., Lessin L. S., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **641**, 81—129.
146. Deuticke B., Poser B., Lutkemeier P., Haest C. W. M., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **731**, 196—210.
147. Marinetti G. V., Crain R. C., (1978), *J. Supramol. Str.*, **8**, 191—213.
148. Sikorski A. F., Kuczek M., (1983), XIX Zjazd. P. T. Biochem. Szczecin, str. 222.
149. Morrow J. S., Speicher D. W., Knowles W. J., Hsu C. J., Marchesi V. T., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6592—6596.
150. Hanspal M., Ralston G. B., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **669**, 133—139.
151. Hanspal M., Ralston G. B., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **709**, 105—109.

152. Sobue K., Fujita M., Muramoto Y., (1980), *Biochem. International*, **1**, 561—566.
153. Sobue K., Muramoto Y., Fujita M., Kakiuchi S., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 1063—1070.
154. Glenney J. R. Jr., Glenney P., Weber K., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4002—4005.
155. Kuźnicki J., Drabikowski W., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 265—290.
156. Graf E., Penniston J. T., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **210**, 257—262.
157. Baskin G., Langdon R. G., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5428—5435.
158. Shaklai N., Benitez L., Ramey H. M., (1978), *Am. J. Physiol.*, **234**, C36—C40.
159. Conway R. G., Tao M., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 11932—11938.
160. Schechter N. M., Sharp M., Reynolds J., Tanford C., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1897—1914.
161. Calvert R., Ungewickell E., Gratzer W., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **107**, 363—367.
162. Ralston G. B., Dunbar J. C., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **579**, 20—30.
163. Dunbar J. C., Ralston G. B., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **667**, 177—184.
164. Brandts J. F., Erickson L., Lysko K., Schwartz A. T., Taverna B. D., (1977), *Biochemistry*, **16**, 3450—3454.
165. Reynolds J. A., Trayer H., (1976), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7337—7342.
166. Kam Z., Josephs R., Eisenberg H., Gratzer W. B., (1977), *Biochemistry*, **16**, 5568—5572.
167. Guidotti G., (1972), *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 731—752.
168. Marchesi V. T., Furthmayr M., Tomita M., (1976), *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 667—698.
169. Painter R. G., Sheetz M., Singer S. J., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1359—1361.
170. Elgsaeter A., Branton D., (1974), *J. Cell Biol.*, **63**, 1018—1030.
171. Sheetz M., Painter R. G., Singer S. J., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4486—4492.
172. Tanford C., (1961), *Physical Chemistry of Macromolecules*, J. Wiley, New York.
173. Elgsaeter A., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **536**, 245—251.
174. Mikkelsen A., Elgsaeter A., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **536**, 245—251.
175. Mikkelsen A., Elgsaeter A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **668**, 74—80.
176. Roux B., Casoly R., (1982), *Biophys. Chem.*, **16**, 193—198.
177. Shotton D., Thompson K., Wofsy L., Branton D., (1978), *J. Cell Biol.*, **76**, 512—531.
178. Shotton D., Burke B., Branton D., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **536**, 313—317.
179. Shotton D., Burke B. E., Branton D., (1979), *J. Mol. Biol.*, **131**, 303—329.
180. Isenberg H., Kenna I. G., Green N. M., Gratzer W. B., (1981), *FEBS Lett.*, **129**, 109—112.
181. Speicher D. W., Morrow J. S., Knowles W. J., Marchesi V. T., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9093—9101.
182. Yurchenco P. D., Speicher D. W., Morrow J. S., Knowles W. J., Marchesi V. T., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9102—9107.
183. Stokke B. T., Elgsaeter A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 640—645.
184. Cohen C. M., Tyler J. M., Branton D., (1980), *Cell*, **21**, 875—883.

185. Hiller G., Weber K., (1977), *Nature*, **266**, 181—183.
186. Wang K., Ash J. F., Singer S. F., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4483—4486.
187. Hartwig J. H., Stossel T. P., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5706—5712.
188. Tyler J. M., Anderson J. M., Branton D., (1980), *J. Cell Biol.*, **85**, 489—495.
189. Hartwig J. M., Stossel T. P., (1981), *J. Mol. Biol.*, **145**, 563—581.
190. Glenney J. R. Jr., Glenney P., Osborn M., Weber K., (1982), *Cell*, **28**, 843—854.
191. Wallach D., Davies P. J. A., Pastan J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3328—3335.
192. Respasky E. A., Granger B. L., Lazarides E., (1982), *Cell*, **29**, 821—833.
193. Bennett V., Davis J., Fowler W. E., (1982), *Nature*, **299**, 126—131.
194. Goodman S. R., Zagon I. S., Kulikowski R. R., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7570—7574.
195. Levine J., Willard M., (1981), *J. Cell Biol.*, **90**, 631—643.
196. Sobue K., Muramoto Y., Yamazaki R., Kakiuchi S., (1979), *FEBS Lett.*, **105**, 105—109.
197. Kakiuchi S., Sobue K., Fujita M., (1981), *FEBS Lett.*, **132**, 144—148.
198. Kakiuchi S., Sobue K., Kanda K., Morimoto K., Tsukita S., Tsukita S., Ishikawa H., Kurokawa M., (1982), *Biomed. Res.*, **3**, 400—410.
199. Shimo-Oka T., Watanabe Y., (1981), *J. Biochem.*, **90**, 1297—1307.
200. Davies P. J. A., Klee C. B., (1981), *Biochem. International*, **3**, 203—212.
201. Earlin R. K., Grab D. J., Siekevitz P., (1980), *J. Cell Biol.*, **89**, 449—455.
202. Kakiuchi S., Sobue K., Kanda K., (1982), *Biochem. International*, **5**, 755—762.
203. Glenney J. R. Jr., Glenney P., Weber K., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9781—9787.
204. Sobue K., Kanda K., Kakiuchi S., (1982), *FEBS Lett.*, **150**, 185—190.
205. Sobue K., Kanda K., Yamagami K., Kakiuchi S., (1982), *Biomed. Res.*, **3**, 561—570.
206. Davis J., Bennett V., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5816—5820.
207. Bennett V., Davis J., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7550—7554.
208. Cohen C. M., Branton D., (1981), *TIBS*, **6**, 266—268.
209. Tomaselli M. B., John K. M., Lux S. E., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1911—1915.
210. Liu S. C., Palek J., Prchal J. T., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2072—2076.
211. Coetzer T., Zail S. S., (1981), *J. Clin. Invest.*, **67**, 1241—1248.
212. Liu S. C., Lawler J., Prchal J., Palek J., (1981), *Blood*, **58**, Suppl. 1, 45a. Abstr.
213. Dhermy D., Lecomte M. C., Garbarz M., Bournier O., Galand C., Gautero H., Feo C., Alloisio N., Delaunay J., Boivin P., (1982), *J. Clin. Invest.*, **70**, 707—715.
214. Zarkowsky H. S., Mohandas N., Speaker C. B., Shohet S. B., (1975), *British J. Haematol.*, **29**, 537—542.
215. Chang K., Williamson J. R., Zarkowsky H. S., (1979), *J. Clin. Invest.*, **64**, 326—328.
216. Liu S. C., Palek J., Prchal J., Castleberry R. P., (1981), *J. Clin. Invest.*, **68**, 597—605.

217. Greenquist A. L., Shohet S. B., Berstein S. E., (1978), *Blood*, **51**, 1149—1155.
218. Agre P., Orringer E. P., Bennett V., (1982), *New England J. Med.*, **306**, 1155—1161.
219. Tchernia G., Mohandas N., Shohet S. B., (1981), *J. Clin. Invest.*, **68**, 454—460.
220. Agre P., Orringer E. P., Chui D. H. K., Bennett V., (1981), *J. Clin. Invest.*, **68**, 1566—1576.

W okresie od złożenia artykułu do druku pojawiły się doniesienia dotyczące fosforylacji obu podjednostek spektryny przy pomocy egzogennej, zależnej od cAMP kinazy białkowej (221), nowe dane dotyczące równowagi dimer-tetramer (222) oraz sekwencji jednej z domen spektryny (223, 224). Ostatnio stwierdzono, że poszczególne elementy szkieletu komórkowego są syntetyzowane jednocześnie na wolnych polirybosomach i potranslacyjnie wbudowane w strukturę szkieletu (225). Białko transportujące aniony wbudowywane jest kontraslacyjnie do błony retikulum endoplazmatycznego i transportowane do błony cytoplazmatycznej (226). Autorzy (227, 228) zaproponowali mechanizm receptorowej regulacji powstawania i stabilizacji szkieletu komórkowego, w którym ilość wbudowanego białka transportującego aniony określa ilość przyłączonej ankiryiny, a ta z kolei ilość przyłączonej spektryny. Elementy szkieletu komórkowego syntetyzowane w nadmiarze i nie połączone z nim ulegają degradacji.

221. Lutz H. W. (1984) *FEBS Lett.* **169**, 323—329.
222. Morris M., Ralston G. B. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, **788**, 132—137.
223. Speicher D. W., Davis G., Yurchenco P. D., Marchesi V. T., (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 14931—14937.
224. Speicher D. W., Davis G., Marchesi V. T. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 14938—14947.
225. Moon R. T., Lazarides E., (1983) *Nature* **305**, 62—64.
226. Braell W. A., Lodish H. P., (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 11337—11344.
227. Lazarides E., Moon R. T. (1984) *Cell*, **37**, 354—536.
228. Moon R. T., Lazarides E., (1984) *J. Cell. Biol.* **98**, 1899—1904.

ANDRZEJ CHIMIĄK *)

Siderofory — nośniki jonu żelazowego

Siderophores — Transport Agents of Ferric Ion

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Jon żelazowy
- III. Terminologia
- IV. Klasyfikacja sideroforów
- V. Biosynteza sideroforów
- VI. Kompleksy sideroforów
- VII. Funkcja biologiczna sideroforów
- VIII. Budowa, własności i syntezy chemiczne sideroforów
 - VIII-1. Siderofory fenolowe
 - VIII-2. Siderofory — kwasy hydroksamowe
- IX. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Ferric ion
- III. Terminology
- IV. Classification of siderophores
- V. Biosynthesis of siderophores
- VI. Complexes of siderophores
- VII. Biological function of siderophores
- VIII. Structure, properties and chemical synthesis of siderophores
 - VIII-1. Phenol siderophores
 - VIII-2. Siderophores — hydroxamic acids
- IX. Final remarks

I. Wstęp

Już od dawna z hodowli mikroorganizmów izolowano niskocząsteczkowe związki, tworzące barwne kompleksy z żelazem. Rola ich nie była znana. Niektóre z nich, jak wykrytą już w 1912 r., jako czynnik wzrosto-

*) Prof. dr hab., Zakład Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska, ul. Maja-kowskiego 11/12, 80-952 Gdańsk

wy *Mycobacterium paratuberculosis*, mykobaktynę (1) zbadano dokładnie dopiero w roku 1965 (2). Zwrotnym punktem, który pozwolił połączyć pozornie odległe spostrzeżenia w spójną całość, było wyizolowanie krystalicznego kompleksu żelaza, zwanego ferrichromem z kultury grzyba *Ustilago sphaerogena* w roku 1952 (3). W tym samym czasie w laboratorium firmy Lederle stwierdzono, że inny szczep grzybów *Pilobolus kleinii* wymaga do wzrostu ekstraktu nawozowego, lub jak później ściślej określono, koprogeny — kompleksu żelaza, zawartego w kulturze *Penicillium* (4). Jednocześnie w Kanadzie pracowano nad czynnikiem wzrostowym, określonym jako artrobaktyna (5), a w Anglii izolowano inny czynnik — pierwszą z grupy mykobaktyn. Siedem lat później grupa Keller-Schierleina rozpoczęła prace nad ferrioksaminy — rodziną związków zawierających żelazo (6). Związki te okazały się antagonistami antybiotyków znanych jako syderomycyny*. W roku 1960 Neilands wykrył w cząsteczce ferrichromu obecność wiązania N-hydroksyamidowego (7) a grupa Keller-Schierleina (8, 9) potwierdziła to odkrycie, stwierdzając, że zarówno ferrichrom, jak i ferrioksamina B są kompleksami żelaza i kwasu trihydroksamowego. Obserwacją Neilandsa o fundamentalnym znaczeniu było stwierdzenie, że wysokie stężenie jonu żelazowego w pożywce zmniejsza syntezę ferrichromu (10). Dalszy rozwój badań pozwolił na stworzenie obecnie dość już przejrzystej całości, obejmującej sprawy dotyczące transportu żelaza do komórki drobnoustrojów. Zasadnicze elementy tej konstrukcji logicznej są przedmiotem niniejszego artykułu.

Wiadomo, że żelazo jest niezbędnym elementem procesów biochemicznych, a enzymy zawierające ten pierwiastek biorą udział w wielkich cyklach biochemicznych, w całej gamie organizmów żywych, od najprostszych do bardzo złożonych. Żelazo jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych pierwiastków skorupy ziemskiej. Tylko tlen, krzem i glin są bardziej pospolite. Wprawdzie w krystalicznej strukturze skał występuje ono w postaci jonu żelazawego i żelazowego, jednakże w roztworach wodnych i osadach poddanych działaniu tlenu atmosferycznego występuje jedynie jako żelazo na trzecim stopniu utlenienia. Ten stan rzeczy związany jest ze stopniową przemianą atmosfery ziemskiej z beztlenowej w utleniającą, co miało miejsce 3-4·10⁹ lat temu. Żelazo w wodzie najczęściej spotyka się w postaci stabilnego koloidu lub hydrosolu, zdyspergowanego jako uwodniony wodorotlenek żelaza Fe(OH)₃·nH₂O. Iloczyn rozpuszczalności tego połączenia jest skrajnie niski, K = 10^{-88,7} (11). W przeciwieństwie do tego, związki żelaza dwudodatniego są lepiej rozpuszczalne. Stopniowa przemiana jonów żelazawych w żelazowe w biosferze ziemskiej prowadziła, w toku ewolucji, do coraz trudniejszego przyswajania żelaza przez komórki drobnoustrojów. Proste, pierwotne systemy transportu żelaza musiały prze-

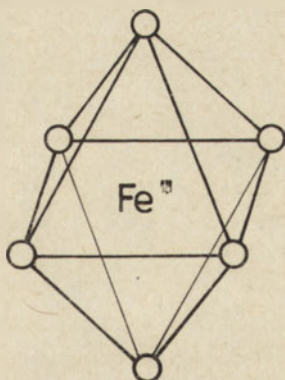
* Porównaj rozdział III

kształcić się w złożony, wysokospecyficzny system umożliwiający uzyskiwanie żelaza ze skrajnie trudno rozpuszczalnych substratów.

Obecnie ustalono, że system ten obejmuje: biosyntezę niskocząsteczkowego, specyficznego dla jonów żelazowych ligandu, zwanego dalej sideroforem, dyfuzję jego poza komórkę, kompleksowanie jonu żelaza przez siderofor i aktywny transport tego jonu do wnętrza komórki z wykorzystaniem specyficznych receptorów białkowych błony komórkowej. Poniżej będą omówione poszczególne elementy tego układu ze szczególnym uwzględnieniem sideroforów.

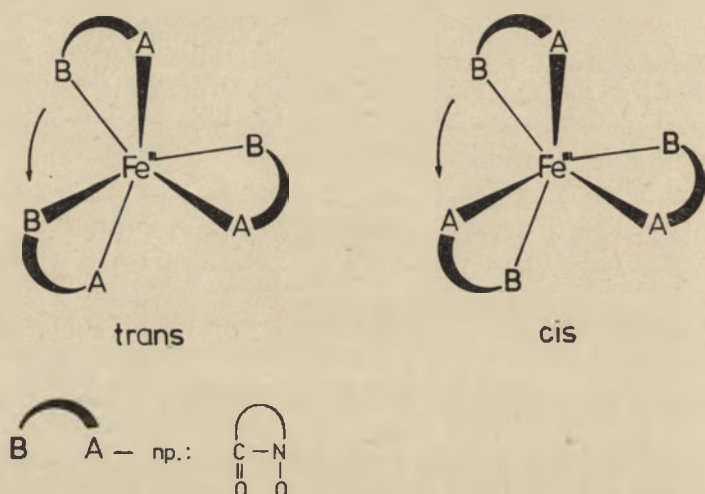
II. Jon żelazowy

Przyczyną szczególnej roli żelaza w biokatalizatorach jest fakt jego występowania na dwóch trwałych stopniach utlenienia, ze stosunkowo szerokim zasięgiem potencjału utleniająco-redukującego około 1 Volt. Może on się wahać bowiem od +300 mV w cytochromach typu A do -500 mV w ferredoksynach (12). Preferowaną geometrią kompleksów żelazowych jest koordynacja oktaedryczna, gdzie centralnie położony jon żelaza jest otoczony przez sześć atomów. Żelazo jako pierwiastek przejściowy ma niewypełnione orbitale d. Ligandy wchodząc w sferę koordynacji rozszczepiają zdegenerowany poziom d na dwa poziomy. Ze słabymi donorami elektronów jak np. z jonami chlorkowymi tworzy się tzw. kompleks wysokospinowy, który zawiera pięć niesparowanych elektronów. Odmiennie — ligandy o silnym polu dają kompleksy niskospinowe, zawierające w przypadku żelaza jeden elektron niesparowany. Siderofory, jako ligandy, tworzą z żelazem kompleksy wysokospinowe d^5 (13) o niskiej energii stabilizacji pola krystalicznego, które nie mają dozwolonych przejść typu d-d. Widma UV tych kompleksów charakteryzują się intensywnymi pasmami przeniesienia ładunku przy 400-420 nm.

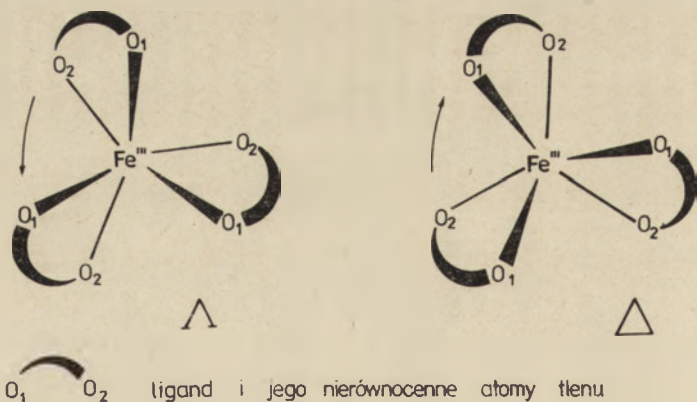


Ryc. 1. Oktaedryczna koordynacja i kompleks jonu żelazowego.

Interesująca jest również stereochemia kompleksów oktaedrycznych żelaza. W wypadku ligandu dwukleszczowego, lecz niesymetrycznego, tj. zawierającego dwa atomy A i B lub dwie jednakowe lecz nierównocenne grupy (np. dwie grupy fenolowe kwasu 2,3-dihydroksybenzoesowego) — może powstać teoretycznie aż 16 różnych izomerów geometrycznych i optycznych. Zwykle jednak ta mnogość jest ograniczona a izomery o małym stopniu symetrii, typu trans — przeważnie nie występują. Bardzo istotne są natomiast izomery optyczne. Jak wykazały badania chiralno-optyczne — CD (14), kompleksy sideroforów mogą mieć na atomie żelaza dwie odmienne konfiguracje, które odpowiadają lewo i prawoskrętnej trójłopatkowej śrubie. Tego typu chiralne układy o osi symetrii C_3 , ozna-



Ryc. 2. Izomeryczne kompleksy cis i trans jonu żelazowego z dwukleszczowym, niesymetrycznym ligandem. Konfiguracja wokół żelaza Δ .



Ryc. 3. Enancjomeryczna para kompleksów cis: Λ i Δ o przeciwnej konfiguracji wokół żelaza.

czane jako Δ i Λ , można łatwo określać przez badanie krzywej CD w zakresie 400—500 nm. Konfiguracja Δ charakteryzuje się ujemną, a Λ dodatnią krzywą CD (15).

Inny punkt widzenia na trwałość kompleksów żelaza daje teoria Pearsona (16), preferująca jako najbardziej trwałe pary: twardy-twardy lub miękki-miękki. I tak jon żelazowy, jako twardy, będzie preferować twardy atom tlenu w sideroforze, a po redukcji bardziej miękki jon żelazawy tworzyć będzie stabilniejsze kompleksy z atomem siarki w układach wewnątrzkomórkowych.

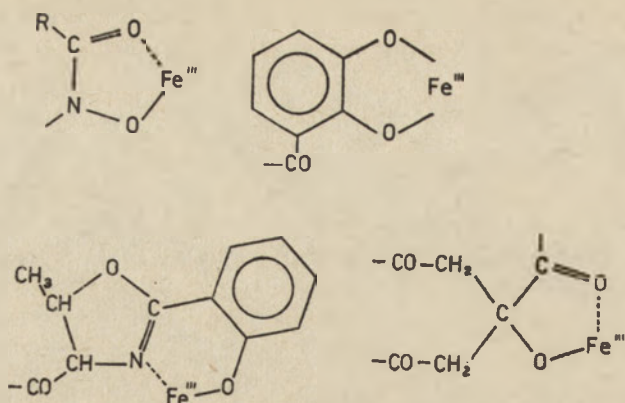
III. Terminologia

Nazwa siderofor, wybrana dla specyficznego jonoforu jonów żelazowych (żelazoforu), wywodzi się od greckiej nazwy żelaza — *sidero*. Termin siderofor*, wprowadzony ostatecznie w roku 1973 przez Lankforda (17), zastąpił wcześniej używany i jednoznaczny z nim termin syderochrom (18) oraz wchłoniął proponowane przez grupę Kellera-Schierleina (6) pojęcia: syderamin i syderomycyn, stosowane uprzednio odpowiednio do czynników wzrostowych typu amin oraz do antybiotyków. Niestety w literaturze spotyka się jeszcze często dowolności terminologiczne, np. kompleks z żelazem jakim jest ferrichrom nazywa się też niekiedy sideroforem. Lecz w tej pracy określenie siderofor będzie konsekwentnie używane jedynie w odniesieniu do ligandu pochodzenia naturalnego specyficznego dla jonu żelazowego. Desferri-ferrichrom (cząsteczkę ferrichromu bez jonu żelaza) wygodniej będzie nazwać ligandem ferrichromu.

IV. Klasyfikacja sideroforów

Obecnie można zasadniczo siderofory zaliczyć do dwóch głównych klas: pochodnych fenoli i kwasów hydroksamowych (18). Obie te klasy gromadzą związki będące słabymi kwasami ($pK_a = 9$) i w ich kompleksach zwykle tylko atomy tlenu są w sferze koordynacyjnej żelaza. Najbardziej typowymi przedstawicielami tych obu grup są: ligand ferrichromu (tab. 4) i enterobaktyna (wzór I). Klasyfikacja ta jest uproszczona, bowiem przykładowo: mykobaktyna (wzór XXIII) jest hybrydem, w którym ligand koordynuje żelazo zarówno ugrupowaniem kwasów hydroksamowych, jak i atomami tlenu reszt fenolowych, a ponadto atomem azotu układu oksazolinu.

* Autor świadomie wprowadza nazwę polską najbardziej zbliżoną do oryginału (ang.: siderophore), uwzględniając wymogi współczesnych systemów informatycznych.

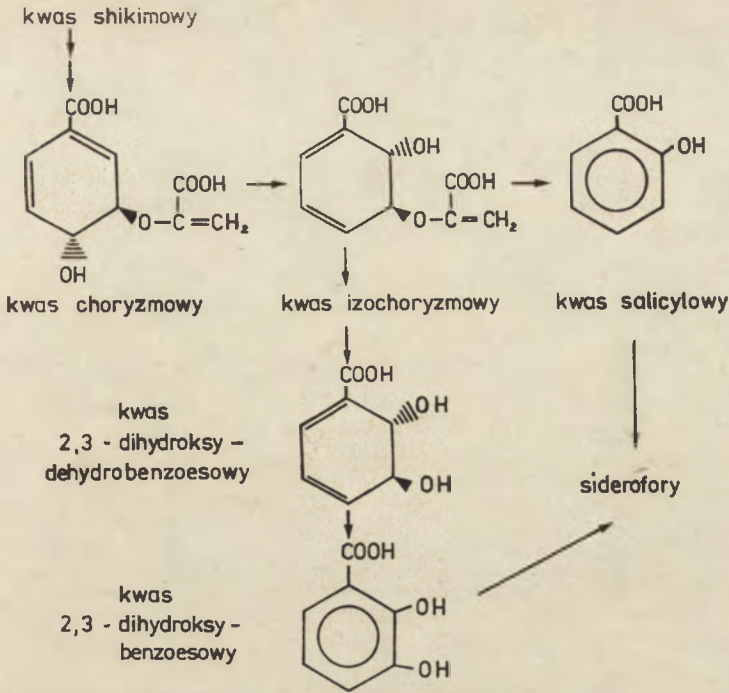


Ryc. 4. Dwukleszczowe fragmenty ligandów (sideroforów) w sferze koordynacyjnej żelaza.

V. Biosynteza sideroforów

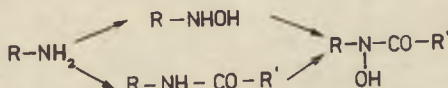
Jednym z najistotniejszych czynników, wpływających na proces tworzenia się sideroforów jest niskie stężenie żelaza w środowisku. Optymalnie wynosi ono 10^{-7} gat/dcm³. Wzrost jego poziomu do około 10^{-5} gat/dcm³ powoduje stopniowe zahamowanie syntezy ligandu sideroforowego (18). Całkowity brak żelaza wstrzymuje jednak również wzrost drobnoustrojów. Drogi biosyntezy sideroforów zależą od typu ich budowy. Synteza sideroforów pochodnych fenoli związana jest ze szlakiem metabolicznym aromatycznych aminokwasów, opartym na syntezie kwasu choryzmowego. Ten ostatni izomeryzuje do kwasu izochoryzmowego, z którego tworzy się kwas 2,3-dihydroksydehydrobenzoesowy, bezpośredni prekursor kwasu 2,3-dihydroksybenzoesowego, którego reszty acylowe są popularne wśród ligandów sideroforowych (19). Kwas izochoryzmowy jest również prekursorem kwasu salicylowego, ważnego składnika budowy sideroforów (20).

Interesujący jest problem biosyntezy wiązania N-hydroksyamidowego, charakterystycznego dla sideroforów — kwasów hydroksamowych. Faworyzowana termodynamicznie możliwość utlenienia grupy aminowej do pochodnej hydroksyloaminy, obserwowana w biosyntezie ferrichromu i hadacydyny (21, 22), konkuruje z logicznie bardziej akceptowaną możliwością utlenienia wiązania amidowego, którą obserwuje się na przykładzie kwasu aspergiloowego (23). W procesie pierwszym, końcowym etapem jest oczywiście acylowanie pochodnej hydroksyloaminy. Dokładniej zbadano (24) biosyntezę kwasu rodotorulowego, stosując spektrometrię masową. Stwierdzono przy użyciu izotopu tlenu, że enzymatyczne utlenienie zachodzi przy udziale tlenu atmosferycznego. Stwierdzono, że ω -acetylo- ω -N-hydroksyornityna jest prekursorem wielu sideroforów z grupy diketopiperazyn i ferrichromów (25).



Ryc. 5. Droga biosyntezy sideroforów pochodnych fenoli.

Jest pewne, że prawie wszystkie typy aerobowych i częściowo aerobowych komórek drobnoustrojów wytwarzają siderofory lub korzystają z sideroforów. Jedynie u takich beztlenowców jak *Clostridia*, czy bakterie kwasu mlekowego — nie wykryto tych związków (26). Siderofory z grupy fenoli, wytwarzane są głównie przez komórki prokariotyczne. U prokariotów spotyka się również siderofory z grupy kwasów hydroksamowych, pochodne kwasu cytrynowego. Organizmy z pogranicza bakterii i grzybów jak: *Actinomycetes* i *Streptomyces* posługują się ligandami ferrioksamin — N-hydroksyamidami kwasu bursztynowego, podczas gdy u drożdży i grzybów przeważają siderofory typu peptydowego — ligandy ferrichromów i fuzaryniny, stanowiące pochodne ω -N-acylo-L- ω -N-hydroksy-L-ornityny. Wyższy homolog tego aminokwasu ω -N-hydroksy-L-lizyna występuje w mykobaktynach z *Mycobacterium* i w aerobaktynie z *Aerobacter aerogenes* (27). W świetle tych faktów nie jest dziwne, że siderofory wykrywa się zarówno w glebie (28), jak i w dolnych partiach przewodu pokarmowego zwierząt wyższych (29).



Ryc. 6. Możliwości biosyntezy kwasów hydroksamowych.

Tabela 1.

Występowanie sideroforów

Mikroorganizm	Siderofor
<i>Escherichia coli</i>	enterobaktyna
<i>Salmonella typhimurium</i>	enterobaktyna
<i>Bacillus megaterium</i>	schizokinen
<i>Mycobacteriae</i>	mykobaktyny
<i>Micrococcus denitrificans</i>	parabaktyna
<i>Cyanobacteriae</i>	schizokinen
<i>Streptomyces sp.</i>	ferrioksaminy ^{a)}
<i>Ascomycetes</i>	ferrichromy ^{a)}
<i>Basidiomycetes</i>	ferrichromy
<i>Aspergilli</i>	ferrichromy
<i>Neurospora</i>	ferrichromy
<i>Penicillia</i>	ferrichromy
<i>Fusaria</i>	fuzaryniny

a) kompleksy sideroforów z żelazem

VI. Kompleksy sideroforów

Większość badań nad kompleksami sideroforów prowadził Raymond (30, 31, 32). Ważną, lecz niekorzystną, cechą wysokospinowych kompleksów żelaza jest bardzo duża szybkość wymiany jonu centralnego (33), co utrudniało badania. Dlatego też w początkowym okresie posłużono się kinetycznie inertnymi, modelowymi, kompleksami sideroforów z chromem (30). Kompleksy sideroforów mogą być obdarzone potrójnym ładunkiem ujemnym, jak w kompleksie enterobaktyny, lub być jego pozbawione, jak w ferrichromie. Nie ładunek jednak determinuje rolę kompleksu sideroforu. Najważniejszą cechą tych kompleksów są ich stałe trwałości, które osiągają niezwykle wysokie wartości 10^{80} , a nawet, jak w przypadku kompleksu enterobaktyny 10^{52} . Są to najtrwalsze, znane kompleksy żelaza. Ta cecha pozwala na wiązanie jonów żelazowych przez siderofory wydzielane przez komórkę do środowiska zewnętrznego (osocze, woda morska, gleba),

Tabela 2.

Stale trwałości kompleksów z żelazem wybranych sideroforów (31)

Siderofor	lg stałej trwałości
enterobaktyna	52,0 ^{a)}
ferrioksamina B	30,6
ferrichrom	29,1
aerobaktyna	22,9
kwas rodotorulowy	31,2
kwas acetylohydroksamowy	22,9

a) kompleks pochodnej fenolu

nawet gdy zawarte w nim żelazo znajduje się w bardzo trudno dostępnej formie. Przykłady stałych trwałości wybranych kompleksów sideroforów ilustruje tabela 2, w której widać, że kompleksy kwasów hydroksamowych mają niższe stałe, niż kompleksy fenoli. Rozważania nad stałymi trwałości mają szczególny sens w odniesieniu do białkowych kompleksów żelaza, jak ferrytyna i transferyna (34). Wiąże się to bowiem z możliwością usuwania żelaza z transferyny przez bakterie, wydzielające w osoczu siderofory, lub przez podawanie do organizmu sideroforopodobnych leków. Taką terapię sideroforową stosuje się przy niekorzystnych stanach przeładowania żelazem, występujących po częstych transfuzjach u ludzi cierpiących na tzw. anemię Cooley'a. W użyciu klinicznym znalazła zastosowanie sól ligandu ferrioksaminy B (35). Również usuwanie aktynowców z organizmu, przy użyciu syntetycznych analogów sideroforów, stało się przedmiotem obszernych programów badawczych (36).

Kompleksy sideroforów z żelazem są barwne. Barwa zmienia się od złoto-żółtej do purpurowo-czerwonej a zależy od ligandu, pH i składu kompleksu. Ta absorpcja jest znaczna w świetle widzialnym i w ultrafiolecie.

Proces tworzenia kompleksu wiąże się z głębokimi zmianami konformacji sideroforowego ligandu, który przechodzi od nieuporządkowanej struktury do postaci stabilizowanej niekiedy kilkoma mostkami wodorowymi, jak to np. ustalono, badając rentgenograficznie strukturę kryształu ferrichromu A (37). Tą techniką badano również kilka innych kompleksów sideroforów jak: ferrichryzynę (38), ferrioksaminy E (39) oraz kompleksy triacetylofuzaryny (40) i mykobaktyny P (41). Niezwykle istotną sprawą stała się możliwość ustalenia konfiguracji ligandów wokół atomu żelaza. W związkach grupy ferrichromu określono ją jako cis Λ . Ustalenia rentgenograficzne stały się jedną z podstaw do prawidłowych odczytów chiralności z krzywych CD (32). Tak udało się określić kompleksy kwasu rodotorulowego (15) i enterobaktyny, jako cis Δ (42). Ostatnio podano, że konfiguracja wokół atomu żelaza wiąże się w sposób wyraźny z aktywnością biologiczną (43). Kompleks o układzie Λ utworzony z agrobaktyną i parabaktyną nie pobudza wzrostu *E. coli*, a wpływa na wzrost *P. denitrificans*. Odwrotnie, kompleks enterobaktyny: Δ pobudza wzrost *E. coli*.

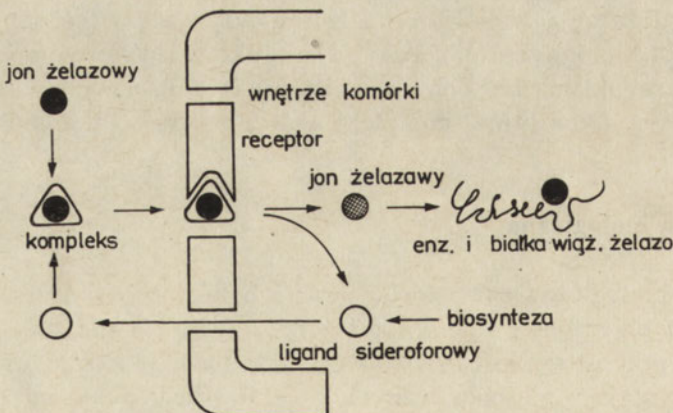
VII. Funkcja biologiczna

Funkcję biologiczną sideroforów oraz ich udział w aktywnym transporcie żelaza przez błonę komórkową przedstawia Neilands (44). Podaje on, że przy stosunkowo wysokich stężeniach jonów żelaza drobnoustroje korzystają z niespecyficznego procesu jego przyswajania, które są mało zbadane. Natomiast przy niskich stężeniach główną rolę w procesie asymilacji żelaza odgrywa wyskospecyficzny, sideroforowy system

transportowy. System ten udoskonalił się w toku ewolucji, pozwalając na przeżycie mikroorganizmów w środowiskach o niskich stężeniach żelaza, np. w wodzie morskiej lub w glebach. Jak wspomniano, ten system transportu składa się z dwóch zasadniczych części: ligandów, zwanych sideroforami oraz specyficznych dla kompleksu: siderofor — jon żelazowy, białkowych receptorów błony komórkowej. Obecne prace nad wyizolowaniem i identyfikacją tych białek receptorowych prowadzi się głównie na bakteriach *E. coli* i *Salmonella typhimurium* (45). U *E. coli*, która nie wytwarza ferrichromu, lecz korzysta z enterobaktyny stwierdzono dwa różne receptory: receptor ferrichromu, białko o masie cząsteczkowej 78 000 (kodowane przez gen *ton A* lub *fhu A* (46) oraz dość labilny receptor enterobaktyny o masie cząsteczkowej 81 000 (gen *cbr* lub *fep A* (47). Receptor ferrichromu jest też receptorem fagów T₁, T₅, ϕ 80, kolicyny M oraz antybiotyku albomycyny.

Przypuszcza się, że biosynteza enterobaktyny ma negatywną regulację ekspresji genów. Przy dużym stężeniu żelaza w komórce, spowodowanym transportem aktywnym przy udziale sideroforu, tworzy się kompleks: żelazo — aporepresor. Blokuję on operon genów, wstrzymując transkrypcję i syntezę białek enzymatycznych, niezbędnych do syntezy sideroforu. Synteza sideroforu zmniejsza się lub ustaje. W toku obecnie prowadzonych prac ustala się położenie genów, kodujących enzymy enterobaktyny, w chromosomie *E. coli* (44).

Dotąd nie są całkowicie wyjaśnione wszystkie sprawy związane z mechanizmem sideroforowego transportu żelaza. Siderofor, wydzielony na zewnątrz komórki, wytwarza kompleks, wykorzystując trudno dostępne źródło żelaza. Kompleks przyłącza się do receptora. Dalsze etapy transportu żelaza różnią się w zależności od ligandu. Ferrichrom wnika do komórki poprzez błonę, zwykle z udziałem permeaz. Wewnątrz komórki następuje redukcja jonu żelazowego. Kompleks rozpada się, a siderofor



Ryc. 7. Wysokospecyficzny system transportu jonów żelazowych poprzez błonę biologiczną.

zostaje ponownie użyty (48). Można by sądzić, że ten mechanizm jest typowy dla większości sideroforów. W przypadku jednak kwasu rodotorulowego, kompleks przekazuje żelazo na powierzchni komórki, ale siderofor jest też ponownie użyty (49). Uwolnienie żelaza łączy się z jego redukcją, gdyż kompleksy żelazawe sideroforów nie są trwałe. Dlatego też określono potencjały redoksove kompleksów kilku sideroforów, które z wyjątkiem kompleksu enterobaktyny (-750 mV), znajdują się w zasięgu reduktorów komórkowych (50). Najbardziej dyskusyjny jest mechanizm transportu z udziałem enterobaktyny. Nie naruszony kompleks wnika do komórki. Z uwagi na niski potencjał dawniej przyjmowano lizę ligandu esterazą (51) i następnie redukcję. Obecnie jednak ta koncepcja jest podważana (52), tym bardziej, że i cykliczne analogi enterobaktyny bez wiązania estrowego wykazują też aktywność sideroforową. Ligand enterobaktyny użyty jest jednorazowo.

Od kilkunastu lat panuje opinia, że nadmiar łatwo osiągalnego żelaza w organizmach zwierzęcych sprzyja infekcjom (53). Stężenie nie wiążanego żelaza w osoczu jest bardzo niskie (10^{-1} μ Molowe) i dlatego też tylko bakterie zdolne do syntezy sideroforów mogą mnożyć się w organizmie gospodarza i uzyskiwać żelazo z transferyny (54). Znamienne jest, że patogenne szczepy *E. coli* nie korzystają z enterobaktyny, ale stosują do transportu żelaza aerobaktynę (55).

VIII. Budowa, właściwości i syntezy chemiczne sideroforów

Jak wspomniano, siderofory mogą być pochodnymi fenoli lub kwasami hydroksamowymi. Niezależnie od tego należy omówić siedem grup związków: fenole, grupę ferrichromów, grupę kwasu rodotorulowego, pochodne kwasu cytrynowego, fuzaryniny, mykobaktyny oraz ferrioksaminy.

Tabela 3.

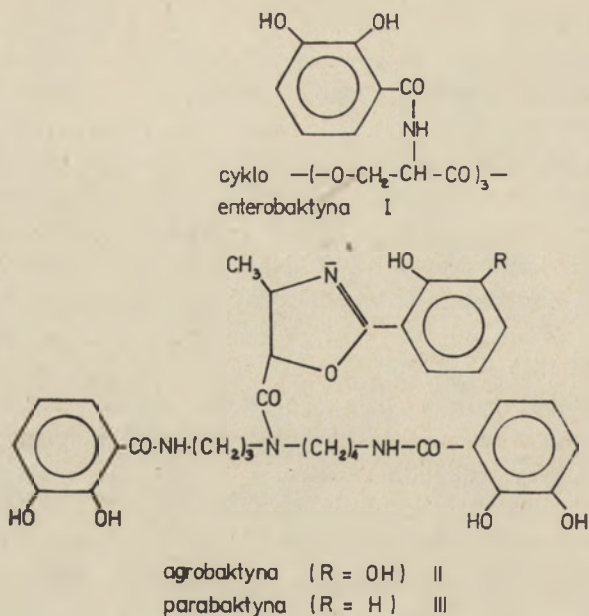
Klasyfikacja sideroforów

Pochodne fenoli	Kwasy hydroksamowe
enterobaktyna agrobaktyna, parabaktyna i wibriobaktyna poch. aminokwasów	ferrichromy ^{a)} kwas rodotorulowy, dimerowy i koprogen fuzaryniny A, B, C aerobaktyna, schizokinen mykobaktyny ferrioksaminy ^{a)}

a) kompleksy z żelazem

VIII-1. Siderofory fenolowe

Ta grupa sideroforów jest stosunkowo mało liczna i obejmuje enterobaktynę (wzór I), pochodne 2,3-dihydroksybenzoilowe kilku aminokwasów

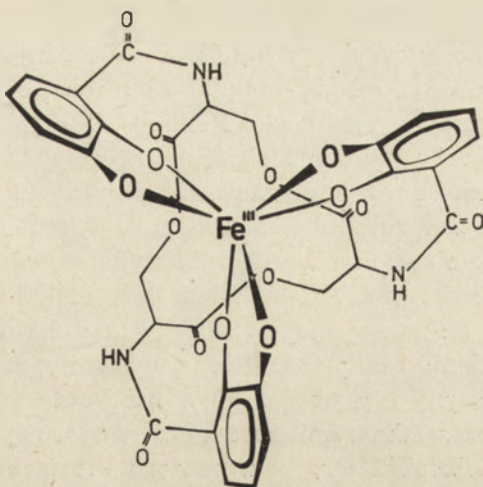


Ryc. 8. Siderofory — pochodne fenoli.

oraz także pochodne spermidyny: agrobaktynę, parabaktynę (wzory II i III) i wibriobaktynę.

Cyklodepsipeptyd tri-(2,3-dihydroksybenzoilo-N-serynę) — wyizolowano niezależnie: jako enterobaktynę (56) i jako enterochelinę (19). Związek ten jest popularnym sideroforem bakterii jelitowych i występuje u *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Aerobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* i *Klebsiella pneumoniae*. Nierozpuszczalny w wodzie ligand można uzyskać przy niskim pH przez prostą ekstrakcję brzeczeki octanem etylu. Pomiarzy chiralooptyczne kompleksów enterobaktyny wykazały, że 12 członowy policykliczny ester układu się w konfigurację Δ wokół atomów chromu i żelaza (42). Przez analizę widm elektronowych i techniką Ramana udowodniono, że żelazo jest koordynowane wyłącznie przez układy wicynalnych dioli tego sideroforu (57).

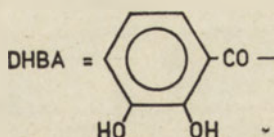
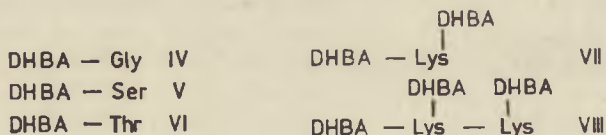
Badania przy użyciu ^{13}C NMR — izostrukuralnego wobec kompleksu żelaza, trwałego kompleksu galu wykazały drastyczne zmiany konformacji cząsteczki enterobaktyny w tym kompleksie (58). Technika spektroskopii Mössbauera potwierdzono możliwość istnienia kompleksu enterobaktyny, zarówno z jonami żelazowymi, jak i żelazowymi. Dlatego przypuszcza się, że redukcja jonów żelazowych kompleksu może być konieczna dla jego przejścia przez błonę cytoplazmatyczną (59). Znane są dwie złożone syntezy enterobaktyny (60, 61). Otrzymano również jej enancjomer (61), którego kompleks o odwrotnej tj. Λ konfiguracji nie jest wykorzystywany przez *E. coli*. Celem lepszego zrozumienia wpływu elementów



Ryc. 9. Budowa kompleksu enterobaktyny.

budowy enterobaktyny na stałe trwałości jej kompleksów i działanie, otrzymano jej aktywny analog karbocykliczny (62). Inne cykliczne syntetyki, oparte budową na układzie pierścienia benzenowego (63, 64), tworzą kompleksy z żelazem o bardzo wysokich stałych trwałości 10^{46} i są zdolne do usuwania żelaza z transferyny. Otrzymano też serię analogów z dodatkową grupą sulfonową i stwierdzono ich przydatność do usuwania aktynowców z organizmu (36).

Z różnych kultur bakteryjnych hodowanych przy niskim stężeniu żelaza wyodrębniono cały szereg prostych pochodnych aminokwasów. I tak, kwas itoikowy: (wzór IV) wyodrębniono jako pierwszy siderofor fenolowy z *Bacillus subtilis* (65), z *E. coli* wyizolowano N-2,3-dihydroksybenzoiloserynę (wzór V) a z *Klebsiella oxytoca* także pochodną treoniny (wzór VI) (66, 67). α -N- ω -N-di(2,3-dihydroksybenzoilo)-lizyna (wzór VII) jest prawdopodobnie sideroforem *Azobacter vinelandii* (68). Biorąc to pod uwagę otrzymano analog sideroforu (wzór VIII), z sześcioma grupami chelatującymi, który jednak okazał się nieaktywnym (69).



Ryc. 10. Pochodne 2,3-dihydroksybenzoilowe (DHBA) aminokwasów.

Niektóre pochodne spermidyny też mogą działać jako siderofory. Z *Mikrococcus denitrificans* wyodrębniono (70) parabaktynę, określając pierwotnie jej budowę jako N¹,N⁸-bis-/2,3-dihydroksybenzoilo-/—N⁴-/salicyloilotreonilo-/—spermidynę, jednakże Neilands skorygował tę strukturę stwierdzając obecność pierścienia oksazolinowego (71). Ta korekta sugerowana była ustaleniem przez tego autora (72) budowy agrobaktyny, sideroforu izolowanego z *Agrobacterium tumefaciens*, organizmu powodującego „rakopodobne” zmiany u roślin. Agrobaktyna, podobnie jak parabaktyna — tworzy kompleks typu Λ z udziałem pary elektronów azotu oksazolininy i tlenu grupy fenolowej, odpowiednio reszty 2,3-dihydroksybenzoilu lub salicyloilu. Badania rentgenograficzne wykazały, że płaska cząsteczka kompleksu agrobaktyny o grubości 3,8 Å ma konformację stabilizowaną pięcioma wewnątrzcząstkowymi mostkami wodorowymi (73). Ostatnio ustalono budowę wibriobaktyny — sideroforu *Vibrio cholerae* (69, 73a).

VIII-2. Siderofory — kwasy hydroksamowe

Grupę ferrichromu trzeba uznać za jedną z najważniejszych grup kompleksów sideroforów, zarówno z uwagi na podkreślone już znaczenie historyczne, jak i na wielką ilość prac jej poświęconych. Klasyczny „prototyp” wszystkich kompleksów sideroforów — ferrichrom został wyodrębniony z grzyba *Ustilago sphaerogena* (3) zaś inne związki tej grupy spotyka się u *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* i *Fungi imperfecti*. Ferrichromy i związki podobne izolowano też z kultur *Aspergillus*, *Penicillium* (w tym i z *Penicillium requeforti*), *Neurospora*, *Ustilago*. Należy podkreślić, że heksapeptydów ferrichromowych nie wyodrębniano z komórek prokariotycznych.

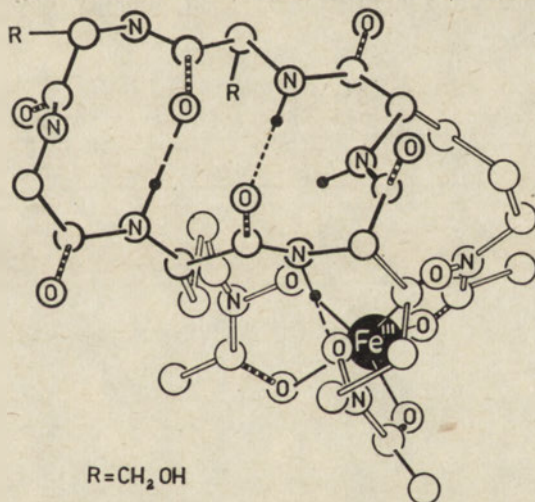
Tabela 4•

Budowa ligandów grupy ferrichromu

Nazwa	Cykloheksapeptyd
ferrichrom (18)	cyklo-Gly-Gly-Gly-Orn ^x -Orn ^x -Orn ^x -
ferrichrom A (8)	cyklo-Ser-Ser-Gly-Orn ^y -Orn ^y -Orn ^y -
ferrirubina (8)	cyklo-Ser-Ser-Gly-Orn ^z -Orn ^z -Orn ^z -
ferrirodina (8)	cyklo-Ser-Ser-Gly-Orn ^{z'} -Orn ^{z'} -Orn ^{z'} -
ferrichryzyna (75)	cyklo-Ser-Ser-Gly-Orn ^z -Orn ^z -Orn ^x -
ferrikrocyna (18)	cyklo-Gly-Ser-Gly-Orn ^z -Orn ^z -Orn ^x -
barwnik wina Sake (76)	cyklo-Ser-Ala-Gly-Orn ^z -Orn ^z -Orn ^x -
ferrichrom C (76)	cyklo-Gly-Ala-Gly-Orn ^z -Orn ^z -Orn ^x -
malonichrom (74)	cyklo-Gly-Ala-Gly-Orn ^m -Orn ^m -Orn ^m -
	pozycja 3 2 1 6 5 4

gdzie: x = ω -N-OH- ω -N-acetyly = ω -N-OH- ω -N-trans-HOOC-CH₂CH₂C(CH₃)=CH-CO-z = ω -N-OH- ω -N-trans-HO-CH₂CH₂C(CH₃)=CH-CO-z' = ω -N-OH- ω -N-cis- jak wyżejm = ω -N-OH- ω -N-cis-HOOC-CH=CH-CO-

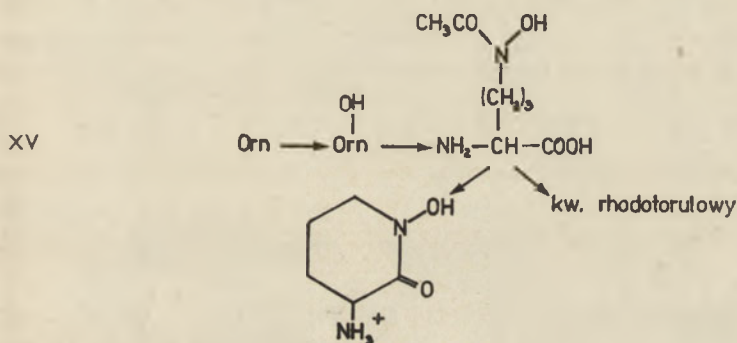
Ferrichromy są kompleksami z żelazem cyklicznych heksapeptydów, zawierających, co jest dla nich charakterystyczne, następujące po sobie 3 reszty ω -N-acylo-N-hydroksyornityny. Acylem może być acetyl, maleinyl (74) lub acyl kwasu trans- β -metyloglutakonowego (7). Pozostałymi trzema resztami aminokwasów są reszty glicyny, alaniny i seryny. Obecność reszty glicynowej w pozycji 1 jest niezbędna dla zapewnienia właściwej konformacji całej cząsteczki kompleksu sideroforu. Badania rentgenograficzne kryształu ferrichromu A (37, 77) wykazały, że kompleks ten zawiera pierścień heksapeptydowy z charakterystyczną dla peptydów glicyny pętlą konformacyjną (β -zgięcie), spięty tylko jednym, bardzo krótkim transanularnym mostkiem wodorowym, pomiędzy grupą karbonylową reszty seryny w pozycji 3 a protonem wiązania amidowego glicylo-N-hydroksy-ornityny. Drugi wewnątrzcząsteczkowy mostek wodorowy łączy azot amidowy drugiej reszty ω -N-hydroksyornityny z tlenem N-hydroksy-amidu tego aminokwasu. Podobne wyniki otrzymano, badając kryształy ferrichryzyny (38) i ferrichromu (78) oraz roztwory kompleksów glinu ligandu ferrichromu techniką NMR (79, 80). Sam ligand ferrichromowy ma odmienną od kompleksu płaską konformację typową dla cykloheksapeptydu, stabilizowaną dwoma transanularnymi mostkami wodorowymi (79). Ostatnio w oparciu o analizę widm dichroizmu kołowego uważa się,



Ryc. 11. Budowa cząsteczki ferrichromu A (37).

że ferrichromy mogą dodatkowo kompleksować jon magnezowy, działając jako jonofory tego jonu (81). Ferrichromy doczekały się trzech syntez. Pierwszą przeprowadzono budując heksapeptyd z reszt ω -nitrowaliny (wzór IX) i stosując redukcję (82). Druga synteza oparta była na pracy z resztą ω -N-tozylo- ω -N-benzyloksyornityny (wzór X) (83). W syntezie trzeciej otrzymano enancjoferrichrom poprzez oksazirydiny (wzór XI)

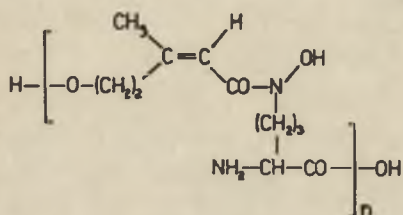
Kwas rodotorulowy jest diketopiperazyną ω -N-acetylo-L- ω -N-hydroksyornityny, krystalizującą bezpośrednio po oddzieleniu komórek i zagęszczeniu brzezki. Fermentacja pozwala otrzymać bardzo znaczne ilości tego związku (3—4 g/dcm³ brzezki). Biosynteza kwasu rodotorulowego przebiega przez stadium N-hydroksyornityny, która może cyklizować na piperidon (wzór XV) przy niskim pH (87). Kompleksy żelazowe kwasu rodotorulowego badał Raymond (15). Stwierdził on, że w zakresie pH 4—11 istnieje obojętny kompleks wielordzeniowy, zbudowany z dwóch jonów żelazowych i trzech cząsteczek ligandu. Przy pH niższym od 4 dysocjuje on na jednododatni monomeryczny kation, w którym dwie grupy hydroksyamidowe koordynują jeden atom żelaza. Badanie krzywych CD obojętnego kompleksu wykazało, że ma on absolutną konfigurację Δ wokół jonu żelaza. Był to pierwszy znany tego typu neutralny kompleks w grupie



Ryc. 14. Biosynteza kwasu rodotorulowego.

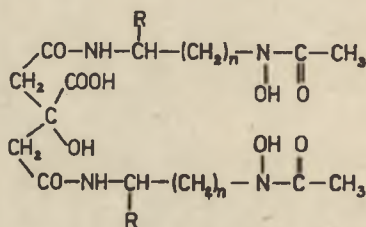
sideroforów. Dotychczas opisano trzy syntezy kwasu rodotorulowego, wszystkie poprzez cyklizację odpowiedniego dipeptydu. W pierwszej z nich stosowano redukcję nitropochodnej (88), dwie inne wprowadzają ugrupowanie hydroksyloaminowe zbenzyloksyaminy (89, 90). Najprostszą pochodną ω -N-hydroksyornityny wyodrębniono (91) ze szczepu *Fusarium roseum*, nazywając ją cis-fuzaryniną (wzór XVI). Związek ten nie ma ani własności czynnika wzrostowego ani też własności antybiotycznych, ale jest prawdopodobnie prekursorem bardziej złożonych sideroforów. Sideroforem okazał się natomiast kwas dimerowy, izolowany obok fuzaryniny z *Fusarium dimerum*, będący diketopiperazyną trans-fuzaryniny (92). Budowę jego potwierdziła synteza (88). Innymi zbliżonymi strukturalnie i metabolicznie czynnikami transportującymi żelazo są jego kompleksy: koprogen B (92) i koprogen (4) — estry kwasu dimerowego i fuzaryniny, bądź acetylofuzaryniny, znalezione w kulturach *Penicillia* i *Neurospora crassa*. Koprogen występuje też u *Epicocceum pupurasceus* wraz z inhibitorem komórek rakowych, prostszym sideroforem triornicyną, w której acetyl zastępuje złożony acyl (93).

Sideroforami są również proste, nietrwałe di- i tridepsipeptydy, zawierające dwie lub trzy reszty cis-fuzaryny, połączone wiązaniami estrowymi, które wyodrębniono z *Fusarium* i oznaczono jako fuzaryninę A, B, C (wzory XVII, XVIII, XIX) (94). Sądzi się, że ostatnia z nich, zwana fusigenem — jest jonoforem żelaza u *Fusarium roseum* (95). Obecność α,β -nienasyconej reszty acylowej w serii wymienionych związków potwierdziły widma UV i wyodrębnienie nienasyconego δ -laktonu. Sideroforem jest także N,N',N''-triacetylofuzarynina C (triacetylofusigen), wyizolowana jako trwałe indywiduum chemiczne z *Penicillium* nieokreślonego szczepu (96). Analiza rentgenograficzna jej kompleksu z jonem żelazowym wykazała, że jest to cząsteczka prawie płaska o grubości ok. 4,5 Å. Wszystkie grupy acetylowe leżą w płaszczyźnie pierścieni, a wiązania N-hydroksyamidowe są również płaskie. Konfiguracja na atomie żelaza jest cis Λ tylko w kryształach otrzymanym z mieszaniny etanol-benzen. Krystalizacja z chloroformu daje diastereoizomer o konfiguracji Δ . Znamienne jest, że kinetycznie labilny kompleks w roztworze wodnym ulega przemianom $\Delta \rightleftharpoons \Lambda$ z przewagą formy Δ (40).



Cis fuzarynina	n=1	XVI
fuzarynina A, dimer	n=2	XVII
fuzarynina B, trimer	n=3	XVIII
fuzarynina C, cykliczny trimer		XIX

Ryc. 15. Fuzaryny.



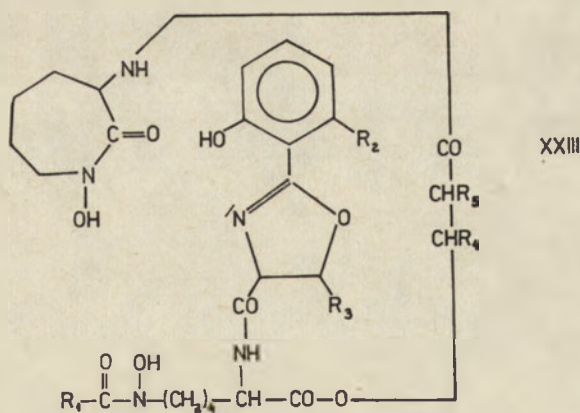
aerobaktyna	R=COOH	n=4	XX
arthrobaktyna	R=H	n=4	XXI
schizokinen	R=H	n=2	XXII

Ryc. 16. Pochodne kwasu cytrynowego.

Siderofory — symetryczne pochodne kwasu cytrynowego to aerobaktyna, artrobaktyna i schizokinen (wzory XX, XXI, XXII). Pierwsza z nich — aerobaktyna — wyizolowana z *Aerobacter aerogenes* (97) jest pochodną ω -N-acetylo- ω -N-hydroksy-L-lizyny. Oznaczone potencjometrycznie wartości pK_a 3.11, 3.48, 4.31 — odpowiadają grupom karboksylowym, a 8.93 i 9.44 — protonom wiązań N-hydroksyamidowych (98). Symetryczną budowę ma również artrobaktyna (5), zawierająca dwie reszty 1-amino-5-N-acetylo-N-hydroksyaminopentanu. Kompleks żelazowy artrobaktyny znany był dawniej jako „terregens factor”. Znacznie krótsze odległości pomiędzy chelatującymi grupami występują w schizokinenie (99). Związek ten wyodrębniono z *Bacillus megatherium*, lecz także z sinicy *Anabena* sp. (100), co wskazuje na znaczną rolę sideroforów

w morzu. Podano dokładniejszą charakterystykę kompleksu aerobaktyny (98), określając elektrochemicznie jej potencjał redoksy przy pH 7 na -336 mV, ustalając konfigurację absolutną na jonie żelazowym jako Λ , oraz podając stałe trwałości obserwowanych czterech równowag metal-ligand. Wykorzystując pochodne 1,3-dioksolan-4-onu, otrzymano niedawno aerobaktynę (101), a z estrów kwasu cytrynowego schizokinen (102).

Mykobaktyny są najdawniej badaną i jedną z najliczniejszych grup sideroforów. Obszerny jej opis podał Snow (103). Dziewięć głównych mykobaktyń (wzór ogólny XXIII) oznaczanych od rodzajów szczepów literami P, T, M, N, A, F, H, R i S — jest zwykle mieszaniną dwóch lub trzech homologów, nie zawsze wyizolowanych w stanie czystym. Dobrze scharakteryzowano główny siderofor *Mycobacterium phlei* — mykobaktynę P-18-cis- Δ_2 . Hydroliza jedynego wiązania estrowego u różnych mykobaktyń daje różne kwasy mykobaktynowe i alkohole: kobaktyny. Prócz hydroliz i badań NMR bardzo użyteczne okazały się widma masowe glinowych kompleksów mykobaktyń. Ustalono, że mykobaktyny można podzielić na dwa typy. Typ P zawiera kwasy mykobaktynowe, zbudowane z reszt kwasu salicylowego lub 6-metylo-salicylowego, seryny lub treoniny, ω -N-hydroksylizyny tworzącej N-hydroksy- ϵ -laktam i α,β -nienasyconej reszty kwasu tłuszczowego. W mykobaktynach typu M zamiast tej ostatniej, występuje acetyl lub priopionyl. Kobaktyny, oprócz drugiej reszty ω -N-hydroksylizyny, tworzącej N-hydroksy- ϵ -laktam, zawierają amidowo związane γ -metylo- β -hydroksy-kwas, który w mykobaktynach typu M ma dość długi łańcuch boczny. Struktura kompleksu mykobaktyny P była badana rentgenograficznie (41). Jon żelazowy koordynowany jest przez dwa wiązania N-hydroksy-amidowe, tlen fenolowy i atom azotu oksazolinu, po-



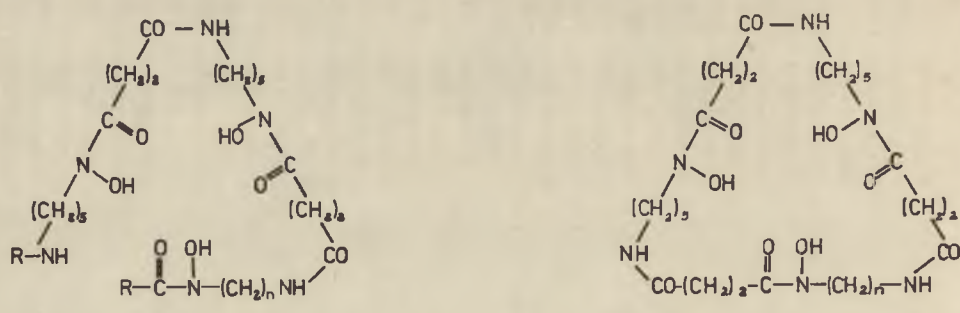
R_2 , R_3 i R_4 = H lub CH_3

szczegóły budowy R_1 , R_2 patrz (34)

Ryc. 17. Wzór ogólny mykobaktyń.

wstałej biogenetycznie z reszty salicylo-serynowej lub treonilowej. Mykobakteryjny można formalnie zaliczyć do grupy kwasów hydroksamowych, jak i do grupy sideroforów fenolowych. Cechą charakterystyczną mykobaktyn są reszty kwasów tłuszczowych. Znaczna lipofilowość cząsteczki w porównaniu do innych sideroforów obniża wprawdzie ich rozpuszczalność w wodzie ($15 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ przy 20°C), ale jest cechą niezmiernie istotną dla okrytych otoczką woskową komórek *Mycobacterium*, które korzystają z tych sideroforów. Ostatnio sugeruje się, że mykobakteryjny działa jako etap pośredni w powiązaniu z innymi egzokomórkowymi chelatorami żelaza o nieznanym budowie — egzochelinami (104). Mykobakteryjny nie doczekał się jeszcze pełnej syntezy. Trzeba tylko odnotować udaną syntezę związku modelowego mykobakteryjny S 2, opartą na wydajnym N-alkilowaniu kwasu hydroksamowego (105).

Ferrioksaminy zaliczane wcześniej do grupy czynników wzrostowych, tzw. syderamin — izolowano z kultury *Actinomycetes*, przy okazji badań nad antybiotykiem ferrimycyną A. Prawie wszystkie wcześniejsze badania nad tymi czerwono-brązowymi kompleksami żelaza opisał Keller-Schierlein (6). Ferrioksaminy występują niemalże u wszystkich szczepów *Actinomycetes* a ponadto u *Streptomyces* i *Nocardia*. Stosując rozdział przeciwwądowy i kationity oczyszczono nie tylko główny składnik tej grupy: ferrioksaminy B (wzór XXIV) ale i 8 innych jej składników. Grupa ferrioksaminy składa się: z zasad — ferrioksaminy A₁ (wzór XXV), A₂, B (wzór XXIV), C, F, ferrioksaminy neutralnych D₁, D₂, E (wzory XXVI, XXXI, XXX) oraz amfoterycznej G (wzór XXVII). Długolącuchowy ligand ferrioksaminy B oplątuje jon żelazowy, koordynując go trzema ugrupowaniami N-hydroksyamidowymi. W łańcuchu występują przemienne trzy reszty 1-amino-5-N-hydroksyloaminopentanu i dwie kwasu



ferrioksamina B	R = H	n = 5	R' = CH ₃	XXIV
ferrioksamina A ₁	R = H	n = 4	R' = CH ₃	XXV
ferrioksamina D ₁	R = COCH ₃	n = 5	R' = CH ₃	XXVI
ferrioksamina G	R = H	n = 5	R' = (CH ₂) ₂ COOH	XXVII
modyfikowane	R = salicyl			XXVIII
ferrioksaminy B	R = DHBA (patrz rys.10.)			XXIX

ferrioksamina E	n = 5	XXX
ferrioksamina D ₂	n = 4	XXXI

Ryc. 18. Ligandy ferrioksaminy.

bursztynowego, przy czym końcowa grupa hydroksyloaminowa jest N-acetylowana. Symetryczny układ dwóch wiązań amidowych i trzech N-hydroksyamidowych potwierdziła synteza (106). Określono rentgenograficznie (39) budowę kryształu ferrioksaminy E kompleksu związku cyklicznego. Okazało się, że ligand jest identyczny z *Nocardaminą*, izolowaną niezależnie wcześniej z *Nocardia* (107), a ostatnio z *Pseudomonas stutzeri* (108). Płaska cząsteczka ferrioksaminy E o grubości tylko 3,6 Å ma 3 wiązania amidowe w układzie trans, leżące w płaszczyznach nieomalże prostopadłych do płaszczyzny cząsteczki. Kompleks ten występuje jako mieszanina izomerów cis Λ i cis Δ . Udało się rozdzielić kompleksy chromowe ligandu ferrioksaminy B na izomery cis i trans (109). Stwierdzono, że w ferrioksaminach A₁ i A₂ oraz D₂ w miejsce pochodnej pentanu wstępują reszty 1-amino-4-N-hydroksyloaminobutanu. Ligand ferrioksaminy B doznał się doskonałej chemicznie syntezy, opartej na wykorzystaniu pochodnej 1,2-oksazyno-3,6-dionu (110). Jednak firma Ciba produkuje ligand ferrioksaminy taniej, poprzez fermentację. Wprowadzono go na rynek w postaci soli z kwasem metanosulfonowym, pod nazwą desferalu, jako lek w stanach przeładowania żelazem. Otrzymano dwa analogi ligandu ferrioksaminy B (wzory XXVIII i XXIX), spodziewając się zwiększonych stałych trwałości ich kompleksów (110a). Badania nad ferrioksaminami ułatwiły ustalenie struktury antybiotyku ferrimycyny A, której część cząsteczki ligandu okazała się identyczna z ligandem ferrioksaminy B (6).

IX. Uwagi końcowe

Badany od kilkudziesięciu lat wysokospecyficzny, sideroforowy system transportu żelaza przybiera formę kompletnej całości. Prace z tej dziedziny stanowią doskonały przykład badania szczegółów aparatu transportowego komórek bakteryjnych. W chemii, siderofory spełniły rolę złożonych modeli do rozwinięcia metod określania konfiguracji na atomie żelaza w kompleksach i były przykładem związków naturalnych najstaranniej badanych wszystkimi możliwymi metodami spektroskopowymi. Chemia kompleksów została uzupełniona grupą związków o niespotykanych dotąd stałych trwałości. Poznanie budowy ligandów sideroforowych i próby ich otrzymania pozwalają na doskonalenie metod syntezy tych trudnych do otrzymania układów, jakimi są kwasy hydroksamowe i katechole. Niezbyt wiele zespołów zajęło się dotąd tym problemem. Badania podstawowe doprowadziły do praktycznego zastosowania sideroforów w terapii. Powszechne występowanie sideroforów w mikroorganizmach, także patogennych, przy braku ich w komórkach organizmów zwierzęcych — stworzyło możliwość syntezy leków o selektywnym działaniu (111). Wykrycie dominującej roli organizmów wytwarzających siderofory w ekosystemach wodnych (112) — otworzyło kuszącą możliwość regulacji równowagi ekologicznej w wodzie

lub w glebie, przy użyciu sideroforów lub im podobnych syntetyków. Pojawiają się już obecnie prace o wyodrębnianiu z roślin związków kompleksujących żelazo (113, 114) a nie odpowiadających opisanej tu klasyfikacji. Ponieważ niedobór żelaza u roślin jest kluczowo ważny dla agrotechniki — spodziewać się należy, że będzie to niedługo centralny punkt omawianego problemu. Występowanie sideroforów u bakterii glebowych i fakt, że związki te kompleksują też aktynowce — wiążące się z realną groźbą wprowadzenia przez nie radioaktywnych nuklidów do łańcucha pokarmowego, tym bardziej, że odnotowano już występowanie sideroforów w winie (76) i serze (115).

Literatura dotycząca naturalnych kwasów hydroksamowych, sideroforów naturalnych i ich syntetycznych analogów oraz transportu żelaza w mikroorganizmach jest bardzo obszerna. Pojawiło się już około trzydziestu artykułów przeglądowych z tej dziedziny (6, 12, 17, 18, 27, 28, 30—32, 34—36, 44, 53, 54, 79, 103, 106, 111, 116—129). Część z nich jednak zestawia już dane nieaktualne, zaś starsze prace oryginalne szybko ulegają zapomnieniu.

Dlatego przy opracowywaniu niniejszego artykułu napotkano istotną sprzeczność. Trudno jest bowiem jednocześnie podać krótko całość zagadnienia i uściślić ją współczesnymi danymi.

Autor serdecznie dziękuje prof. J. B. Neilandsowi za umożliwienie dostępu do najaktualniejszych materiałów związanych z opisywanymi problemami, podczas pobytu na Uniwersytecie Kalifornijskim w Berkeley w roku 1980.

Opracowanie było finansowane z umowy NIH AM17146 oraz z problemu MR.I. 15.1.8. i MR.I.12.1.6.5.

Zaakceptowano do druku 9.03.1984

PISMIENNICTWO

1. Twart F. W., Ingram G. L. Y., (1912), *Proc. Roy. Soc. Ser. B Biol. Sci.*, **84**, 517—530.
2. Snow G. A., (1965), *Biochem. J.*, **94**, 160—165.
3. Neilands J. B., (1952), *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 4816—4817.
4. Keller-Schierlein W., Diekmann H., (1970), *Helv. Chim. Acta*, **53**, 2035—2044.
5. Linke W. D., Crueger A., Diekmann H., (1972), *Arch. Microbiol.*, **85**, 44—50.
6. Keller-Schierlein W., Prelog V., Zähler H., (1964) w „*Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*”, red. Zechmeister L., t. 22, 279—322, Springer-Verlag, Wien.
7. Emery T., Neilands J. B., (1960), *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3658—3662.
8. Keller-Schierlein W., (1963), *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1920—1929.
9. Bickel H., Hall G. E., Keller-Schierlein W., Prelog V., Vischer E., Wettstein A., (1960), *Helv. Chim. Acta*, **43**, 2129—2138.
10. Garibaldi J. A., Neilands J. B., (1956), *Nature*, **177**, 526—527.

11. Biederman G., Schindler P., (1957), *Acta Chem. Scand.*, **11**, 731—740.
12. Neilands J. B., (1974), w „Microbiol. Iron Metabolism”, red. Neilands J. B., str. 3—34, Academic Press, Inc. New York.
13. Ehrenberg A., (1956), *Nature*, **178**, 379—380.
14. Abu-Dari K., Raymond K. N., (1977), *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 2003—2005.
15. Carrano C. J., Raymond K. N., (1978), *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 5371—5374.
16. Pearson R. G., (1968), *J. Chem. Ed.*, **45**, 581—587; 643—648.
17. Lankford C. E., (1973), *Crit. Rev. Microbiol.*, **2**, 273—331.
18. Neilands J. B., (1973), w „Inorganic Biochemistry”, red. Gunther L., Eichhorn, t. 1, str. 167—202. Elsevier. Scientific Publishing Company, Amsterdam.
19. O'Brien I. G., Gibson F., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **215**, 393—402.
20. Marshall B. J., Ratledge C., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **264**, 106—116.
21. Emery T., (1966), *Biochemistry*, **5**, 3694—3701.
22. Stevens R. L., Emery T. F., (1966), *Biochemistry*, **5**, 74—81.
23. Mac Donald J. C., w „Antibiotics”, red. Gottlieb D., Shaw P. D., t. 2, str. 43—51, Springer Verlag, Berlin.
24. Akers H. A., Neilands J. B., (1978), w „Biological Oxidation of Nitrogen” red. Gorrod J. W., str. 429—436, Elsevier North-Holland, Biomedical Press, B. V., Amsterdam.
25. Akers H. A., Llinas M., Neilands J. B., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2283—2291.
26. Burnham B. F., Neilands J. B., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 554—559.
27. Neilands J. B., (1981), *Ann. Rev. Nutr.*, t. 1, str. 27—46.
28. Waid J. S., (1975), w „Soil Biochemistry”, red. Paul E. A., Mc Laren D., t. 4, str. 65—101, M. Dekker, New York.
29. Griffiths E., Humphreys J., (1980), *Infect. Immun.*, **28**, 286—289.
30. Raymond K. N., (1977), w „Bioinorganic Chemistry II”, red. Raymond K. N., str. 33—54, Advances in Chemistry Series No 162. American Chemical Society, Washington D.C.
31. Raymond K. N., Carrano C. J., (1979), *Acc. Chem. Res.*, **12**, 183—190.
32. Raymond K. N., Abu-Dari K., Sofen S. R., (1980), w „Stereochemistry of optically active transition metal compounds”, red. Douglas B. E., Saito Y., str. 134—167, ACS Symposium Series, No 119, American Chemical Society, Washington D.C.
33. Leutz D. J., Henderson C. H., Eyring E. M., (1973), *Mol. Pharm.*, **6**, 514—519.
34. Aisen P., Listowsky I., (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 357—393.
35. Proper R. D., Shurin S. B., Nathan D. G., (1975), w „Proceedings of Symposium on Development of Iron Chelators for Clinical Use”, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, NIH, str. 83—113.
36. Raymond K. N., Harris W. R., Carrano C. J., Weitzl F. L., (1980), w „Inorganic Chemistry in Biology and Medicine”, red. Martell A. E., str. 313—332. ACS Symposium Series No 140, American Chemical Society, Washington D.C.
37. Zalkin A., Forrester J. D., Templeton (1966), *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 1810—1814.
38. Norrestam R., Stensland B., Bränden C. J., (1975), *J. Mol. Biol.*, **99**, 501—506.
39. van der Helm D., Poling M., (1976), *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 82—86.
40. Hossain M. B., Eng-Wilmot D. L., Longhry R. A., van der Helm D., (1980), *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5766—5773.
41. Hough E., Rogers D., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 73—77.

42. Isied S. S., Kuo G., Raymond K. N., (1976), *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 1763—1767.
43. Neilands J. B., dane niepublikowane.
44. Neilands J. B., (1980), w „Iron in Biochemistry and Medicine II”, red. Jacobs A., Worwood M., str. 529—572, Academic Press, London.
45. Fiss E. H., Stanley-Samuels P., Neilands J. B., (1982), *Biochemistry*, **21**, 4517—4522.
46. Wayne R., Neilands J. B., (1975), *J. Bacteriol.*, **121**, 497—503.
47. Hollifield W. C., Neilands J. B., (1978), *Biochemistry*, **17**, 1922—1928.
48. Emery T., (1971), *Biochemistry*, **10**, 1483—1487.
49. Carrano C. J., Raymond K. N., (1978), *J. Bacteriol.*, **128**, 69—74.
50. Cooper S. R., McArdle J. V., Raymond K. N., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3551—3554.
51. O'Brien I. G., Cox G. B., Gibson F., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **237**, 537—549.
52. Loge J. S., Gaines C. G., Arceneaux J. E. L., Byers B. R., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 1291—1295.
53. Bullen J. J., Rogers H. J., Griffiths E., (1974), w „Microbial Iron Metabolism”, red. Neilands J. B., str. 531—551, Academic Press Inc., New York.
54. Weinberg E. D., (1978), *Microbiol. Rev.*, **42**, 45—66.
55. Warner P. J., Williams P. H., Bindereif A., Neilands J. B., (1981), *Infection and Immunity*, **33**, 540—545.
56. Pollack J. R., Neilands J. B., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 989—992.
57. Salama S., Stong J. D., Neilands J. B., Spiro T. G., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3781—3785.
58. Llinas M., Wilson D. M., Neilands J. B., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3836—3842.
59. Hider R. C., Silver J., Neilands J. B., Morrison I. E. G., Rees L. V. C., (1979), *FEBS Lett.*, **102**, 325—328.
60. Corey E. J., Bhattacharyya S., (1977), *Tetrahedron Lett.*, **45**, 3919—3922.
61. Rastetter W. H., Erickson T. J., Venuti M. C., (1981), *J. Org. Chem.*, **46**, 3579—3590.
62. Corey E. J., Hurt S. D., (1977), *Tetrahedron Lett.*, **45**, 3923—3924.
63. Weitzl F. L., Raymond K. N., (1979), *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 2728—2731.
64. Venuti M. C., Rastetter W. H., Neilands J. B., (1979), *J. Med. Chem.*, **22**, 123—124.
65. Ito T., Neilands J. B., (1958), *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4645—4647.
66. Brot N., Goodwin J., Fales H., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 454—461.
67. Korth H., (1970), *Arch. Microbiol.*, **70**, 297—302.
68. Corbin J. L., Bulen W. A., (1969), *Biochemistry*, **8**, 757—762.
69. Chimiak A., Neilands J. B., (1984), w „Structure and Banding”, t. 58, Springer-Verlag, Berlin.
70. Tait G. H., (1975), *Biochem. J.*, **146**, 191—204.
71. Peterson T., Neilands J. B., (1979), *Tetrahedron Lett.*, 4805—4808.
72. Ong S. G., Peterson T., Neilands J. B., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1860—1865.
73. Eng-Wilmot D. L., van der Helm D., (1980), *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7719—7725.
- 73a. Griffiths G. L., Sigel S. P., Payne S. M., Neilands J. B., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 383—385.
74. Emery T., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **629**, 382—390.

75. Keller-Schierlein W., Deer A., (1963), *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1907—1920.
76. Atkin C. L., Neilands J. B., Phaff H. J., (1970), *J. Bacteriol.*, **103**, 722—733.
77. van der Helm D., Baker J. R., Loghry R. A., Ekstrand J. D., (1981), *Acta Cryst.*, **B 37**, 323—330.
78. van der Helm D., Baker J. R., Eng-Wilmot D. L., Hossain M. B., Loghry R. A., (1980), *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4224—4231.
79. Llinas M., (1973), w „Structure and Bonding”, red. Dunitz J. D., t. 17, str. 135—219, Springer-Verlag, New York.
80. Llinas M., Wilson D. M., Neilands J. B., (1977), *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3631—3637.
81. Hider R. C., Drake A. F., Kuroda R., Neilands J. B., (1980), *Naturwissenschaften*, **67**, 136—139.
82. Keller-Schierlein W., Maurer B., (1969), *Helv. Chim. Acta*, **52**, 603—610.
83. Isowa Y., Ohmori M., Kurita H., (1974), *Bull. Chem. Soc., Japan*, **47**, 215—220.
84. Naegeli H. U., Keller-Schierlein W., (1978), *Helv. Chim. Acta*, **61**, 2088—2095.
85. Winkelman G., (1979), *FEBS Lett.*, **97**, 43—46.
86. Atkin C. L., Neilands J. B., (1968), *Biochemistry*, **7**, 3734—3739.
87. Akers H. A., Neilands J. B., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1006—1010.
88. Widmer J., Keller-Schierlein W., (1974), *Helv. Chim. Acta*, **57**, 1904—1912.
89. Isowa Y., Takashima T., Ohmori M., Kurita H., Sato M., Mori K., (1972), *Bull. Chem. Soc., Japan*, **45**, 1467—1471.
90. Fuji T., Hatanaka Y., (1973), *Tetrahedron*, **29**, 3825—3831.
91. Emery T., *Biochemistry*, (1965), **4**, 1410—1417.
92. Diekmann H., (1970), *Arch. Mikrobiol.*, **73**, 65—76. Program and Abstracts of the International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants, (1981), red. Nelson S. D., Brigham Young University USA.
93. Frederick C. B., Bentley M. D., Shive W., (1981), *Biochemistry*, **20**, 2436—2438.
94. Sayer J. M., Emery T. F., (1968), *Biochemistry*, **7**, 184—190.
95. Diekmann H., Zähler., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **3**, 213—218.
96. Moore R. E., Emery T. (1976), *Biochemistry*, **15**, 2719—2723.
97. Gibson F., Magrath D. J., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **192**, 175—184.
98. Harris W. R., Carrano C. J., Raymond K. N., (1979), *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 2722—2727.
99. Mullis K. B., Pollack J. R., Neilands J. B., (1971), *Biochemistry*, **10**, 4894—4898.
100. Simpson F. B., Neilands J. B., (1976), *J. Phycol.*, **12**, 44—48.
101. Maurer P. J., Miller M. J., (1982), *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3096—3101.
102. Lee B. H., Miller M. J., (1983), *J. Org. Chem.*, **48**, 24—31.
103. Snow G. A., (1970), *Bacteriol. Rev.*, **34**, 99—125.
104. Stephenson M. C., Ratledge C., (1980), *J. Gen. Microbiol.*, **116**, 521—523.
105. Maurer P. J., Miller M. J., (1983), *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 240—245.
106. Keller-Schierlein W., (1975), w „Proceedings of Symposium on Develop-

- ment of Iron Chelator for Clinical Use", U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, NIH, str. 53—82.
107. Keller-Schierlein W., Prelog V., (1961), *Helv. Chim. Acta*, **44**, 1981—1985.
 108. Meyer J. M., Abdallah M. A., (1980), *J. Gen. Microbiol.*, **118**, 125—129.
 109. Leong J., Raymond K. N., (1975), *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 293—296.
 110. Patent Belgia, nr 609,053. Opubl. 11.4.1962.
 - 110a. Chimiak A., Neilands J. B., *Z. Chem.* przesłane do druku.
 111. Neilands J. B., (1979), „Trace Metals in Health and Disease”, red. Kharasch N., str. 27—41, Raven Press, New York.
 112. Murphy T. P., Lean D. R. S., (1976), *Science*, **192**, 900—902.
 113. Fushiya S., Sato Y., Nozoe S., (1980), *Tetrahedron Lett.*, **21**, 3071—3072.
 114. Fushiya S., Sato Y., Nakatsuyama S., Kanuma N., (1981), *Chem. Lett.*, 909—912.
 115. Ong S. A., Neilands J. B., (1979), *J. Agr. Food Chem.*, **27**, 990—995.
 116. Pitt C. G., Martell A. E., (1980), w „Inorganic Chemistry in Biology and Medicine”, red. Martell A. E., str. 279—312, ACS Symposium Series No 140, American Chemical Society, Washington D.C.
 117. Mikes O., Turkova J., (1962), *Chem. Listy*, **58**, 65—123.
 118. Neilands J. B., (1966), *Structure and Bonding*, **1**, 59—107.
 119. Neilands J. B., (1967), *Science*, **156**, 1443—1447.
 120. Emery T., (1971), w „Advances in enzymology”, red. Meister A., t. **35**, 135—184, John Wiley, New York.
 121. Maehr H., (1971), *Pure Appl. Chem.*, **28**, 603—636.
 122. Oosterhuis W. T., (1974), w „Structure and Bonding”, red. Dunitz J. D., t. **20**, str. 59—99, Springer—Verlag, New York.
 123. Rosenberg H., Young I. G., (1974), w „Microbiol. Iron Metabolism”, red. Neilands J. B., str. 67—82, Academic Press, New York.
 124. Byers B. R., (1974), tamże, str. 83—105.
 125. Emery T., (1974), tamże, str. 107—123.
 126. Neilands J. B., (1977), w „Bioinorganic Chemistry — II”, red. Raymond K. N., str. 3—32. *Advances in Chemistry Series No 162*. American Chemical Society, Washington D. C.
 127. Neilands N. B., (1977), „Iron Metabolism”, str. 107—124, Elsevier, New York.
 128. May P. M., Williams D. R., (1980), „Iron in Biochemistry and Medicine — II”, red. Jacobs A., Worwood M., str. 1—28, Academic Press London.
 129. Neilands J. B., (1981), *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 715—731.

Kwaśne fosfatazy roślin wyższych

Acid Phosphatases of Higher Plants

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Polimorfizm fosfataz kwaśnych roślin wyższych
- III. Właściwości molekularne roślinnych fosfataz kwaśnych
 - III-1. Masa molekularna i struktura podjednostkowa
 - III-2. Glikoproteidowy charakter fosfataz kwaśnych roślin wyższych
 - III-3. Mangan jako składnik niektórych fosfataz roślinnych
- IV. Właściwości katalityczne roślinnych fosfataz kwaśnych
 - IV-1. Optimum pH
 - IV-2. Mechanizm reakcji enzymatycznej
 - IV-3. Specyficzność substratowa
 - IV-4. Inhibitory
- V. Fizjologiczna rola fosfataz kwaśnych roślin wyższych
- VI. Regulacja aktywności fosfataz kwaśnych roślin wyższych
- VII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Polymorphism of higher plants acid phosphatases
- III. Molecular properties of acid phosphatases
 - III-1. Molecular mass and subunit structure
 - III-2. Glycoproteinic nature of higher plant acid phosphatases
 - III-3. Manganese as a component of some plant phosphatases
- IV. Catalytic properties of plant acid phosphatases
 - IV-1. pH-Optimum
 - IV-2. Mechanism of enzymatic reaction
 - IV-3. Substrate specificity
 - IV-4. Inhibitors
- V. Physiological function of plant acid phosphatases
- VI. Regulation of acid phosphatases activity
- VII. Final remarks

^{*)} dr, ^{**)} prof. dr hab., Instytut Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

Wykaz stosowanych skrótów: pNPP — para-nitrofenylofosforan sodowy; pCMB — para-chlorortęciobenzoesan sodowy; ConA — konkanawalina A; SDS — sól sodowa siarczanu dodecylu; PAGE — elektroforeza w żelu poliakryloamidowym

I. Wstęp

Enzymy z grupy niespecyficznych kwaśnych fosfomonoesteraz (E.C.3.1.3.2.) budzą zainteresowanie biologów od wielu lat, ponieważ mimo powszechnego występowania w świecie organizmów żywych ich funkcja metaboliczna nie została w pełni poznana. Prace dotyczące obecności tych enzymów w tkankach roślin wyższych pojawiły się w latach dwudziestych naszego stulecia [1]. Badania z lat sześćdziesiątych dotyczyły głównie występowania w komórce i przypuszczalnej funkcji tych enzymów [2, 3, 4], w mniejszym zaś stopniu prób molekularnej charakterystyki [5, 6, 7, 8]. Przegląd właściwości fosfataz kwaśnych z tego okresu uwzględniający kilka enzymów z tkanek roślin wyższych omówiony został w *Postępkach Biochemii* w 1973 r. [9]. Doniesienia z ostatnich dziesięciu lat przynoszą materiał, umożliwiający podjęcie próby scharakteryzowania pod względem biochemicznym tej zróżnicowanej grupy enzymów.

II. Polimorfizm kwaśnych fosfataz roślin wyższych

Wspólną cechą kwaśnych fosfataz, nie tylko pochodzenia roślinnego, jest ich występowanie pod postacią izozymów, stwierdzone w badaniach elektroforetycznych, chromatograficznych lub w izoelektrycznym ogniskowaniu [10—22]. Występowanie populacji białek o aktywności fosfatazy kwaśnej różniących się strukturą cząsteczki może być uwarunkowane genetycznie, lub może być wywołane procesami posttranslacyjnymi.

Zmienność uwarunkowana genetycznie wyraża się syntezą enzymu pod kontrolą kilku niezależnych loci genetycznych lub wieloallelicznością genu. Niezależne geny fosfatazowe produkują izozymy, które w warunkach elektroforezy żelowej ulegają dobremu rozdzielaniu, a wyrazem wieloalleliczności genów może być mikroheterogenność elektroforetyczna.

W kilku przypadkach genetyczne podłoże heterogenności fosfataz jest dobrze udokumentowane. Fosfatazy kwaśne dwóch odmian ryżu [10], rzodkiewnika [11], figowca [12] i traw z rodzaju *Aegilops* [13] syntezowane są pod kontrolą od dwóch do czterech niezależnych genów, z których większość jest wieloalleliczna. Allele są kodominujące. Heterozygoty w obrębie strefy odpowiadającej fosfatazom produkowanym przez dany gen posiadają pasma charakterystyczne dla obu form rodzicielskich oraz pasmo hybrydowe o ruchliwości pośredniej. Obecność pasma hybrydowego jest uważana za odzwierciedlenie dimerycznej struktury białka. Wydaje się, że genetyczne uwarunkowanie heterogenności, jeszcze słabo poznane, może być powszechniejsze niż świadczy o tym liczba opublikowanych doniesień.

Posttranslacyjne zmiany w strukturze cząsteczki dotyczą z reguły nie-

białkowej części enzymu. Wiele spośród opisanych kwaśnych fosfataz zalicza się do glikoproteidów [15, 18—20, 22—28]. Lorenz-Kubis i in. [19] stwierdzili występowanie w nasionach traw kilku form tego enzymu, różniących się składem i wielkością reszty cukrowej. Odmienność struktury składnika cukrowego stwierdzono na podstawie różnej zdolności wiązania ConA i innych lektyn. Yamagata i in. [20] opisują interkonwersję izozymów fosfatazowych, pochodzących z warstwy aleuronowej ziarniaków ryżu, pod wpływem działania enzymów glikolitycznych. Z obu tych prac wynika, że drobne nawet różnice w wielkości i składzie reszty cukrowej mogą powodować heterogenność enzymu.

Inną przyczyną heterogenności fosfataz kwaśnych jest odwracalna asocjacja enzymu z endogennym czynnikiem regulatorowym. Przykładem tego rodzaju heterogenności jest fosfataza kwaśna wyizolowana ze szpilek sosny [29]. Enzym ten występuje pod postacią dwóch form różniących się punktem izoelektrycznym. Forma kwaśna powstaje z zasadowej po przyłączeniu czynnika regulatorowego, który zidentyfikowano jako oligorybonukleotyd.

III. Właściwości molekularne roślinnych fosfataz kwaśnych

III-1. Masa molekularna i struktura podjednostkowa

Spośród kwaśnych fosfataz roślin wyższych zaledwie nieliczne zostały oczyszczone i dobrze scharakteryzowane (Tab. 1). Masy cząsteczkowe tych enzymów są bardzo zróżnicowane i wynoszą od 16 000 do 400 000. Występowanie niskocząsteczkowych fosfataz roślinnych o masach do 40 000 stwierdzono w nasionach traw [18, 30], rzęsie wodnej [25], hypokotylach fasoli [21] oraz zarodkach żyta [27]. Fosfatazy o masie do około 70 000 zazwyczaj nie wykazują struktury podjednostkowej [18, 28, 31]. Strukturę dimerową kilku roślinnych fosfataz kwaśnych wykazano na podstawie analizy względnych wartości masy cząsteczkowej uzyskanych metodami sączenia molekularnego i elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS (tab. 1, [22, 32, 33]). Ostatnio wykazano, że fosfataza kwaśna z zarodków żyta jest agregatem dwóch form enzymu o masach 35 000 i 60 000 [27]. W trzech zaledwie przypadkach stwierdzono występowanie w tkankach roślin wyższych fosfataz kwaśnych o masach powyżej 200 000. Wyizolowana przez Fujimoto i in. [34] fosfataza nasion soi jest tetramerem o masie 240 000, zbudowanym z jednakowych podjednostek. Masy cząsteczkowe sześciu form fosfataz wyosobnionych ze ścian komórkowych bulw ziemniaka [35] wahają się w granicach od 250 000 do 400 000 i prawdopodobnie mają strukturę podjednostkową. Sugeruje się także złożoną oligomerową strukturę fosfatazy kwaśnej rzęsy wodnej [25].

Tabela 1.

Charakterystyka niektórych fosfatyz kwasnych roślin wyższych

Źródło enzymu	Optimum pH	$K_m^{(a)}$	Masa cząsteczkowa	Struktura pojednostkowa	Udział cukrów w strukturze enzymu	Obecność metalu
batat, bulwy [24, 32, 44]	5,8	0,068	110 000 ^(c) 55 000 ^(d)	dimer	9% cukrów obojętnych Fuc, Xyl, Ara, Man, Gal; Glc-NH ₂	Mn ⁺³ A ₅₅₅ ^(b)
ryż kultura tkankowa [15] warstwa aleuronowa ziarniaków [31]	5,2-6,0 4,8	0,5-2,4 1,74	65—155 000 ^(c) 65 000 ^(d) 70 000 ^(c,d)	— monomer	+ +	Mn ⁺³ A ₅₅₅ Mn A ₅₅₀
soja, nasiona [23, 34]			240 000 ^(c) 60 000 ^(d)	tetramer	13% cukrów obojętnych Glc-NH ₂	Mn ⁺³ A ₅₄₀
szpinak, liście [22]	5,5	0,39	92 000 ^(c) 50 000 ^(d)	dimer	+	Mn A ₅₅₀
tytoń, kultura tkankowa [20] w/ehlina łąkowa nasiona [18]	4,7	0,56 0,55	75 000 ^(c,d) 35 000 ^(d)	monomer monomer	+	— —
ziemniak, bulwy [33] formy cytosolowe [26]	5,0—5,3	1,2	98 000 ^(c) 45 000 ^(d) 69 000 ^(d)	dimer monomer	— —	— —
formy zasocjowane [35] ze ścianą komórk. sosna, szpilki [29]	4,5-6,2	0,5-0,71	250—400 000 ^(c) 68—70 000 ^(d)	prawdopodobnie agregaty białko + oligo- rybonukleotydy	13% cukrów obojętnych; Man, Rham, Glc, Gal; Glc-NH ₂	— —
pochrzyn, bulwy [37] żyto, zarodki [27]	5,0 5,4	2,85 0,98	98 000 ^(c) 93 300 ^(d) 35 000, 60 000 ^(c)	prawdopodobnie agregat	— —	— —

a) mM pNPP; b) maximum absorpcji promieniowania widzialnego; c) masa cząsteczkowa wyznaczona w sączeniu molekularnym; d) masa cząsteczkowa wyznaczona w SDS-PAGE; e) masa cząsteczkowa wyznaczana w gradientie stężenia żelu poliakrylamidowego; — brak danych

III-2. Glikoproteidowy charakter fosfataz kwaśnych roślin wyższych

Większość znanych fosfataz kwaśnych pochodzenia roślinnego jest glikoproteidami o różnej zawartości składnika cukrowego. Reszta cukrowa fosfatazy kwaśnej z wiechliny łąkowej stanowi 40% masy enzymu [18]. Znacznie niższą zawartość cukrów obojętnych stwierdzono w fosfatazach bulw ziemniaka [26] i nasion soi [34] (13%, Tab. 1) oraz z kielków fasoli [36], bulw batata [24] i zarodków żyta [27] (8 do 9%). Fosfataza kwaśna bulw ziemniaka zawiera 5,6% mannozy, 2,5% glukozy, 1,5% galaktozy i 3,6% galaktozaminy. Pentoza stanowi około 25% składnika cukrowego, podobnie jak w cząsteczce fosfatazy wyizolowanej z zarodków żyta. W fosfatazie nasion wiechliny łąkowej zawartość pentoz sięga 50% składnika węglowodanowego. Fosfataza z bulw batata oprócz mannozy, galaktozy, fukozy i glukozaminy zawiera także ksylozę i arabinozę. Na podstawie tych danych można sądzić, że przynajmniej część węglowodanowej reszty fosfataz kwaśnych roślin wyższych stanowią łańcuchy typu złożonego, charakteryzujące się znaczną zawartością pentoz.

III-3. Mangan jako składnik niektórych fosfataz roślinnych

W ostatnim dziesięcioleciu duże zainteresowanie wzbudziły izolowane przez badaczy japońskich kwaśne fosfatazy o zabarwieniu fioletowym („violet-colored phosphatases”). Roztwory tych białek wykazują absorpcję promieniowania widzialnego o maksimum w zakresie od 530 do 560 nm [15, 22, 31, 32, 34] (Tab. 1). Utrata zabarwienia, spowodowana działaniem chelatorów, wywołuje utratę aktywności enzymatycznej. Metodami spektroskopii atomowej stwierdzono obecność manganu we wszystkich fioletowo zabarwionych fosfatazach. Charakterystyka widma absorpcyjnego pozwala sądzić, że mangan znajduje się na trzecim stopniu utlenienia. Potwierdzają to badania EPR fosfatazy z batatów [24], w których charakterystyczny dla Mn^{2+} sygnał uzyskano wyłącznie po zastosowaniu warunków redukcyjnych.

Dotychczas tylko w przypadku fosfataz „fioletowych” stwierdzono udział metalu w strukturze cząsteczki enzymu. Wiadomo jednak, że niektóre roślinne fosfatazy są aktywowane przez jony metali dwuwartościowych — Mg^{2+} i Mn^{2+} [17, 26, 37, 38] i hamowane w obecności chelatorów [18, 30, 37]. Być może i w tych przypadkach metal bierze udział w regulacji aktywności enzymu.

IV. Właściwości katalityczne

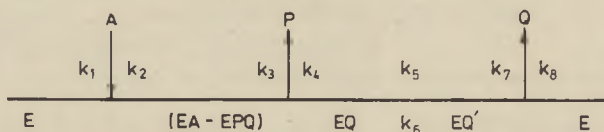
IV-1. Optimum pH

Optimum pH działania większości roślinnych fosfataz kwaśnych wobec pNPP przypada w granicach od 4,5 do 5,8 (Tab. 1). Opisano również fosfa-

tazy aktywne w środowisku bardziej kwaśnym [8] lub bliskim obojętnego [35]. W przypadku wielorakich form fosfataz stwierdza się identyczne [21, 39] bądź różne [8, 14, 21, 35] optima pH dla poszczególnych form. Kwaśna fosfataza ze szpilek sosny zasocjowana z oligorybonukleotydem wykazuje dwa optima pH o wartościach 4,8 i 4,75. Enzym izolowany z liścieni *Vigna mungo* wykazuje różne optima pH w zależności od rodzaju substratu. Optimum pH hydrolizy pNPP wynosi w tym przypadku 5,6, a ATP i kwasu fitynowego 5,0 [40].

IV-2. Mechanizm reakcji enzymatycznej

Mechanizm działania kwaśnych fosfataz i kinetyka enzymatycznej hydrolizy pNPP zostały dobrze poznane i opisane już w latach sześćdziesiątych [5, 6]. Ogólnie przyjęty schemat reakcji według Hsu i in. [6] zakłada sekwencyjne uwalnianie produktów (Ryc. 1). Jako pierwszy uwalniany



Ryc. 1. Mechanizm reakcji hydrolizy estrów fosforanowych katalizowanej przez fosfatazę kwaśną [6].

A — substrat reakcji, P — pierwszy, alkoholowy produkt reakcji, Q — drugi produkt reakcji — fosforan, E — enzym, EA — kompleks enzymu z substratem, EPQ — kompleks enzymu z obydwojoma produktami reakcji, EQ — kompleks enzymu z drugim produktem, EQ' — kompleks enzymu z drugim produktem po izomeryzacji, k_1 — k_8 — stałe szybkości poszczególnych etapów reakcji.

jest produkt alkoholowy, który bądź nie hamuje enzymu [41], bądź też hamuje go niewspółzawodniczo [6]. Po uwolnieniu produktu alkoholowego następuje izomeryzacja kompleksu EQ (enzym-fosforan). Uwalniany w drugiej kolejności produkt, fosforan nieorganiczny, jest kompetycyjnym inhibitorem enzymu [6, 41].

IV-3. Specyficzność substratowa

Niespecyficzne fosfatazy kwaśne roślin wyższych charakteryzują się dużą aktywnością wobec pNPP, fenylofosforanu, α -naftylofosforanu i β -glicerofosforanu.

Przybliżone wartości stałej Michaelisa, określające powinowactwo fosfataz wobec pNPP — najczęściej stosowanego substratu, wahają się od 0,068 mM do 2,85 mM (Tab. 1). Izozymy fosfatazowe poza nielicznymi wyjątkami różnią się powinowactwem wobec tego substratu [14, 21, 35]. Dobrze rozkładanym nieorganicznym związkiem jest również pirofosforan. Prawie wszystkie roślinne fosfatazy wykazują wysoką aktywność wobec ATP, sięgającą przeciętnie 60—80% aktywności w porównaniu z ich ak-

tywnością wobec pNPP. Inne mono- i dinukleotydy purynowe oraz piryimidynowe są w różnym stopniu hydrolizowane przez opisane fosfatazy. Tego typu związków nie hydrolizują enzymy izolowane z warstwy aleuronowej ziarniaków ryżu [31] i cytosolowa forma enzymu z bulw ziemniaków [26]. Inne formy fosfataz, izolowane z kultur tkankowych ryżu i ściany komórkowej bulw ziemniaka wykazują aktywność katalityczną wobec tych nukleotydów.

Aktywność fosfataz roślinnych wobec fosforanowych estrów monosacharydów jest dość słaba i wynosi na ogół zaledwie kilka procent aktywności określanej względem pNPP. Wyższą aktywność względną wobec fosforanów monosacharydów, sięgającą 40—60%, wykazują niektóre formy enzymu otrąb ryżowych [14], hypokotyli fasoli [21] oraz fosfataza nasion soi [23]. Fosfatazy bulw pochrzynu [37] i ziemniaka [26] nie hydrolizują estrów cukrowych. W tkankach tych estry fosforanowe cukrów są hydrolizowane przez inne formy enzymu, związane z błonami jak to ma miejsce w przypadku pochrzynu, bądź ze ścianą komórkową w przypadku ziemniaka [35]. Tam, gdzie udało się wyizolować i porównać kilka form molekularnych enzymu, wykazano istotne różnice w specyficzności substratowej [14, 18, 21, 39]. Zmiany specyficzności fosfataz stwierdza się także w sytuacjach głodu fosforanowego (w uprawach pozbawionych fosforanu) [42] oraz podczas indukcji enzymu kwasem giberelinowym [43].

Fosfatazy kwaśne batatów [44], ryżu [14, 31], różnych gatunków fasoli [40, 45] i zarodków żyta [27] hydrolizują heksafosforan inozytoli (kwas fitynowy), związek stanowiący główną rezerwę fosforanową nasion. Względna aktywność wspomnianych fosfataz wobec kwasu fitynowego określana w stosunku do stopnia hydrolizy pNPP wynosi od 1 do 10% a ktywność fosfatazy z warstwy aleuronowej ziarniaków ryżu wobec estrów inozytoli zawierających od 2 do 5 reszt fosforanowych wynosi od 8 do 30% [31]. Przybliżona wartość stałej Michaelisa wobec estrów fosforanowych inozytoli wzrasta wraz ze spadkiem ilości zestryfikowanych grup —OH w cząsteczce substratu. Najniższa wartość K_m równa 0,43 mM uzyskana dla heksafosforanu jest czterokrotnie niższa od wyznaczonej dla pNPP. Fosfataza kwaśna liścieni fasoli [45] wykazuje nieco wyższe powinowactwo do kwasu fitynowego niż do pNPP, jednak maksymalna szybkość hydrolizy tego estru jest ponad 40-krotnie mniejsza. Enzym z zarodków żyta wykazuje dziesięciokrotnie niższą szybkość hydrolizy kwasu fitynowego niż pNPP przy pięciokrotnie mniejszym powinowactwie do kwasu fitynowego. Nie można wykluczyć, że różnice parametrów kinetycznych hydrolizy kwasu fitynowego związane są z różnorodnością tkanek, z których izolowano enzymy.

IV-4. Inhibitory roślinnych fosfataz kwaśnych

Najdawniej znanym, typowym inhibitorem fosfataz kwaśnych jest jon

fluorkowy [30, 31, 35, 38, 47]. Hamowanie aktywności enzymatycznej w obecności fluorków ma charakter niekompetycyjny [14, 27, 46].

Produkt reakcji hydrolizy, jon fosforanowy, jest kompetycyjnym inhibitorem enzymu [6, 46, 47], inne wielowartościowe aniony kwasów nieorganicznych i organicznych, takie jak arsenian, molibdenian, winian i szczawian, zbliżone pod względem wielkości i rozkładu ładunku do jonu fosforanowego, są także inhibitorami fosfataz kwaśnych [27, 35, 37, 38, 47]. W niektórych przypadkach stwierdzono kompetycyjny charakter hamowania [14, 27, 46].

Aktywność omawianych enzymów spada gwałtownie w obecności jonów metali ciężkich [14, 27, 30, 31, 44]. W kilku przypadkach stwierdzono równocześnie hamujące działanie pCMB [14, 17, 27, 46]. Związki te mogą oddziaływać na zasadzie blokowania wolnych grup sulfhydrylowych, a hamowanie może w tym przypadku świadczyć o istotnym znaczeniu grup —SH dla zachowania aktywności katalitycznej enzymu [27].

V. Fizjologiczna rola fosfataz kwaśnych roślin wyższych

Występowanie w organizmach roślinnych izozymów fosfataz kwaśnych, różniących się strukturą, właściwościami katalitycznymi oraz lokalizacją subkomórkową może świadczyć o zróżnicowanej funkcji tych enzymów. Różnorodność hydrolizowanych substratów powoduje trudności w przypisaniu fosfatazom ściśle określonej funkcji metabolicznej. Więcej światła na rolę tych enzymów rzucają badania fizjologiczne, dotyczące śledzenia zmian aktywności fosfatazowej w rozwoju ontogenetycznym rośliny oraz wywołanych modyfikacjami warunków środowiskowych.

W fazie imbibicji i we wczesnych stadiach kiełkowania nasion jęczmienia i pszenicy obserwuje się wzrost aktywności fosfatazowej [43, 48—52]. Proces ten, związany z pojawianiem się nowej formy enzymu i jego wydzielaniem na zewnątrz komórki jest stymulowany obecnością kwasu gibberelinowego. W kiełkujących nasionach grochu [53] wzrósłowi aktywności fosfatazowej towarzyszy mobilizacja rezerwy fosforanowej nasion, występującej w warstwie aleuronowej pod postacią fitynianu. Wysokie powinowactwo kwaśnych fosfataz warstwy aleuronowej ziarniaków ryżu i liścieni *Vigna mungo* do fitynianu [31, 45] wskazuje na to, że enzymy te odgrywają istotną rolę w regulowaniu gospodarki fosforanowej rozwijających się tkanek roślinnych.

Udział fosfataz kwaśnych w kontrolowaniu ilości pobieranego fosforanu obserwuje się również w późniejszych stadiach rozwojowych rośliny. W hodowlach tkankowych tytoniu na pożywkach nie zawierających fosforanu stwierdzono wzrost aktywności fosfatazowej w komórkach na skutek syntezy enzymu *de novo*, a w następstwie tego wzrost ilości enzymu wydzielanego do środowiska [42, 54]. Sekrecja fosfatazy jest sty-

mulowana przez dwuwartościowe kationy Ca^{2+} i Mg^{2+} i przebiega dwuetapowo. W pierwszej fazie zwalniany jest do środowiska enzym obecny w ścianie komórkowej. W drugiej fazie następuje aktywny transport fosfatazy z wnętrza komórki poprzez barierę energetyczną, jaką stanowi plazmalema [55]. Podobne zachowanie aktywności fosfatazowej obserwowano podczas rozwoju pomidorów uprawianych w warunkach niedoboru fosforanu [56, 57]. W tkankach, w których poziom fosforu spada poniżej określonej normy następuje gwałtowny wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej w ścianie komórkowej i plazmalemie. Charakterystyczne jest, że deficyt fosforu ujawnia się najwcześniej w tkankach w pełni dojrzałych (rozwinęte liście) i tam też następuje gwałtowny wzrost aktywności fosfatazowej. Możliwe jest, że w warunkach głodu fosforanowego rezerwy fosforanu w dojrzałych częściach rośliny są powtórnie mobilizowane i dostarczane do młodych, rozwijających się organów.

Fosfatazy zewnątrzkomórkowe, znajdujące się w ścianie komórkowej, zwłaszcza w pobliżu wiązek przewodzących, lub wydzielane do medium, mogą hydrolizować inne substraty niż formy wewnątrzkomórkowe. Niektórzy autorzy przypuszczają, że zmiana w specyficzności substratowej wiąże się z udziałem fosfataz w aktywnym transporcie cukrów [2, 4, 58]. Kwaśnym fosfatazom przypisuje się udział w różnicowaniu struktur wewnątrzkomórkowych [3] i rozwoju plastydów [59].

Wyraźne zmiany aktywności fosfatazowej występują w okresie starzenia się tkanek roślinnych [25, 60—63]. Wzrost aktywności może być związany ze zmianą stopnia agregacji cząsteczki [25], lub z syntezą enzymu *de novo* kontrolowaną przez fitohormony [61, 63]. Zmiany w aktywności enzymu można tłumaczyć udziałem fosfatazy w autolizie komórek, poprzedzonej zmianami przepuszczalności błon i uwalnianiem enzymu ze struktur lizosomalnych do cytoplazmy [61, 63, 64]. Subletalne procesy lityczne, manifestujące się między innymi wzrostem aktywności fosfatazowej, mogą powodować nekrozę tkanek, związaną z odrzuceniem niezgodnych tkanekowo międzyrodzajowych przeszczepów [64]; mogą także powodować zmiany prowadzące do wtórnych podziałów komórkowych i gojenia się zranionej tkanki (formowanie kallusa, [65]). Uwalnianie fosfataz do cytosolu w następstwie infekcji bakteryjnej lub wirusowej jest również związane z ich udziałem w procesach litycznych komórki [66, 67].

Wydaje się, że aktywność kwaśnych fosfataz jest związana z ważnymi etapami rozwoju organizmu, a jej poziom oraz zakres działania pozostają pod kontrolą fitohormonów oraz czynników środowiskowych.

VI. Regulacja aktywności fosfataz kwaśnych roślin wyższych

Aktywność fosfataz kwaśnych zaangażowanych we wczesnych procesach rozwojowych roślin pozostaje pod kontrolą hormonów roślinnych.

Obecność kwasu giberelinowego, produkowanego przez rozwijający się zarodek, stymuluje syntezę enzymu *de novo* i jego wydzielanie na zewnątrz komórki [43, 48—52, 68]. Fosfataza, związana początkowo z błonami retikulum endoplazmatycznego [51, 68], jest transportowana przez błonowe cysterny w kierunku plazmalemy, a następnie do ściany komórkowej. W nieobecności kwasu giberelinowego enzym magazynowany jest w bliskich plazmalemy warstwach ściany komórkowej [68]. W badaniach nad stymulacją syntezy kwaśnych fosfatyz w nasionach pszenicy stwierdzono, że kwas giberelinowy wzmacnia syntezę jednego tylko z dziewięciu obecnych w tkance izozymów [48, 49]. Zastosowanie inhibitorów biosyntezy białka wskazuje na to, że stymulacja zachodzi na etapie procesu translacji.

Stymulacja syntezy fosfatazy kwaśnej w obecności kwasu giberelinowego jest kontrolowana dodatkowo przez inny fitohormon — kwas abscysynowy [50]. Jego obecność blokuje wydzielanie indukowanej przez kwas giberelinowy fosfatazy poza komórkę. Fitohormony kontrolują także syntezę fosfatazy w starzejących się tkankach roślinnych. W tych przypadkach obecność kwasu abscysynowego przyspiesza wzrost aktywności enzymu [61, 63], może też powodować dysocjację oligomerów fosfatazy i zmiany w składzie reszty cukrowej enzymu [25].

Regulacja aktywności fosfatyz poprzez syntezę enzymu *de novo* oraz uwalnianie go na zewnątrz komórki ma miejsce także w warunkach głodu fosforanowego roślin [42, 54, 55].

Opisane zjawiska wskazują, że aktywność fosfatyz kwaśnych w istotnych procesach fizjologicznych znajduje się pod wyraźną kontrolą wieloetapowego mechanizmu regulacji hormonalnej. Zmiany aktywności fosfatyzowej są także wyrazem reakcji organizmu na drastyczne zmiany warunków środowiskowych.

W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie regulacją aktywności fosfatyz kwaśnych na poziomie molekularnym. Opisano zmiany aktywności kwaśnej fosfatazy liści szpinaku zależne od potencjału oksydoredukcyjnego [69]. Enzym wykazuje kilkakrotnie wyższą aktywność w obecności utlenionego glutationu lub dehydroaskorbinianu; aktywacji towarzyszy rozszerzenie zakresu pH działania enzymu do wartości obojętnych oraz zmiany specyficzności substratowej, przejawiające się proporcjonalnie wysokim wzrostem aktywności w stosunku do estrów fosforanowych monosacharydów. Działanie zredukowanej formy glutationu powoduje przywrócenie pierwotnych właściwości enzymu. Opisało spadek aktywności fosfatazy kwaśnej nasion soi [70] w obecności cysteiny i innych związków sulfhydrylowych o dużej sile redukcyjnej, brak jednak danych na temat zmian we właściwościach katalitycznych w tych warunkach.

Fosfataza kwaśna wydzielona ze szpilek sosny występuje pod postacią dwóch form ulegających interkonwersji [29]. Zasadowa forma enzymu o pI w zakresie od 8,5 do 9,5 przechodzi w kwaśną o pI od 3,0 do 4,2 po przy-

łączeniu oligorybonukleotydu o masie około 1500—3000. Obie formy mają zbliżoną specyficzność substratową, powinowactwo do pNPP oraz wrażliwość na inhibitory. Optimum pH działania formy zasadowej wynosi 4,7; formę kwaśną cechuje podwójne optimum o wartości 4,7 i 4,85. Można sądzić, że odmienna jonizacja stwarza inne możliwości interakcji nukleo-proteidowej cząsteczki ze strukturami wewnątrzkomórkowymi.

W ostatnich latach stwierdzono wpływ lektyn na aktywność kwaśnych fosfataz. W badaniach *in vitro* oraz w immunoelektroforezie krzyżowej Lorenc--Kubis i Bøg-Hansen stwierdzili istotny wzrost aktywności kwaśnej fosfatazy z nasion wiechliny łąkowej w obecności konkanawaliny A i lektyny soczewicy [71]. Podobne zmiany aktywności pod wpływem ConA wykazywały fosfatazy z nasion innych traw: *Agrostis alba*, *Phleum pratense* i *Triticum vulgare* [19]. Fosfataza ziemniaka nie jest aktywowana przez ConA, lecz wykazuje wzrost aktywności w obecności endogennej lektyny ziemniaczanej [72]. Aktywność fosfatazy z zarodków żyta wzrasta zarówno w obecności egzogennych lektyn soi, soczewicy, ziemniaków, zarodków pszenicy i *Canavalia ensiformis*, jak i w obecności lektyny endogennej, której aktywność stwierdzono w ekstrakcie z zarodków [73]. Jedyną jak dotychczas fosfatazą ulegającą inaktywacji w obecności ConA jest enzym z nasion kupkówki pospolitej [72].

Interakcja glikoproteidowych fosfataz kwaśnych z lektynami wykazującymi specyficzność wobec cukrowych receptorów pozwala przypuszczać, że istotną rolę w tym oddziaływaniu odgrywa węglowodanowy składnik enzymu. O słuszności tego przypuszczenia świadczy rewersja aktywacji fosfatazy zarodków żytnich lektynami w obecności specyficznych dla lektyny monosacharydów [73].

Niektóre właściwości katalityczne fosfataz kwaśnych ulegają modyfikacji pod wpływem lektyn. W przypadku enzymów z nasion wiechliny i kupkówki stwierdzono rozszerzenie i przesunięcie w stronę oddziaływania kwaśnego optimum pH fosfatazy a także wzrost jej termostabilności i pH-stabilności [72]. Przybliżona wartość stałej Michaelisa wobec pNPP wyznaczona dla fosfatazy kwaśnej z nasion wiechliny łąkowej ulega w obecności ConA dwudziestokrotnemu obniżeniu. Tak duży wzrost powinowactwa enzymu do substratu autorzy tłumaczą możliwością zmian sterycznych centrum aktywnego enzymu, spowodowanych przyłączeniem lektyny [71]. Spadek wartości K_m wobec pNPP pod wpływem ConA wykazuje także fosfataza z zarodków żyta [27]; jednocześnie wzrasta wartość V_{max} . Podobne wyniki uzyskały Morawiecka i Arabska [74] badając zachowanie fosfatazy kwaśnej ziemniaka w obecności ziemniaczanej lektyny. Stwierdzono przesunięcie optimum pH z 5,6 do 5,0, zmniejszenie wartości K_m wobec pNPP o 20% oraz wzrost termostabilności enzymu. W tym ostatnim przypadku zwraca uwagę fakt, że enzym i lektyna pochodzą z tych samych tkanek. Interakcję fosfatazy z endogenną lektyną stwierdzono także w ekstrakcie z zarodków żyta [73]. Występowanie obok

siebie białek, które wzajemnie modulują swoje właściwości *in vitro*, sugeruje możliwość wystąpienia podobnych oddziaływań także *in vivo*.

VII. Uwagi końcowe

Kwaśne fosfatazy stanowią zróżnicowaną grupę enzymów. Część z nich jest zbudowana z pojedynczych łańcuchów białkowych bądź glikoproteidowych, inne mają strukturę podjednostkową. Wydaje się, że białka te posiadają dużą zdolność do interakcji z innymi cząsteczkami białkowymi [71—74], nukleotydowymi [29] lub polifenolowymi [36]. Z jednej strony utrudnia to procedurę oczyszczania i charakterystykę enzymu, z drugiej zaś strony wydzielenie enzymu w stanie homogennym może pozbawić go natywnego czynnika regulatorowego.

Funkcja fizjologiczna fosfataz kwaśnych trudna jest do ustalenia ze względu na niespecyficzność substratową enzymu, jednakże wzrost aktywności fosfatazowej w stanach zmniejszonej dostępności fosforu [42, 56, 57], bądź też zwiększonego zapotrzebowania na ten pierwiastek [31, 53] sugeruje, że fosfatazy biorą udział w regulacji gospodarki fosforanowej roślin. Brak kompletnych danych kinetycznych, które umożliwiłyby porównanie wartości stałych Michaelisa i stałych katalitycznych wobec różnych substratów i w różnych stanach zapotrzebowania na fosfor nie pozwala na analizę tego problemu od strony czysto biochemicznej.

Problemem, który wymaga dalszych badań jest też regulacja aktywności fosfataz na poziomie molekularnym. Wydaje się, że bliższe poznanie struktury węglowodanowej części enzymów mogłoby przyczynić się do wyjaśnienia interakcji glikoenzymów z wewnątrzkomórkowymi receptorami bądź lektynami. Zagadnienia te, łącznie z fizjologiczną rolą cukrowego składnika glikoproteidów, są w odniesieniu do roślin wyższych ciągle jeszcze słabo poznane.

Zaakceptowano do druku 19.01.1984

PIŚMIENICTWO

1. Hollender V. P., (1971), *The enzymes*, red. P. D. Boyer, Academic Press Inc., New York, t. IV, str. 449.
2. Figier J., (1968), *Planta*, 83, 60—79.
3. Gahan P. B., Maple A. J., (1966), *J. exp. Bot.*, 17, 151—155.
4. Gahan P. B., McLean J., (1969), *Planta*, 89, 126—135.
5. Alvarez E. F., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, 59, 663—672.
6. Hsu R. Y., Cleland W. W., Anderson L., (1966), *Biochem.*, 5, 799—807.
7. Shaw J. G., (1966), *Arch. Biochem. Biophys.*, 117, 1—9.
8. Berje Z. H. M., (1969), *Europ. J. Biochem.*, 9, 439—444.

9. Kubicz A., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 37—54.
10. Pai C., Endo T., Oka H. I., (1975), *Con. J. Genet. Cytol.*, **17**, 637—650.
11. Grover N. S., Byrne O. R., (1975), *Biochem. Genet.*, **13**, 527—531.
12. Valizadeh M., (1977), *Biochem. Genet.*, **15**, 1037—1048.
13. Jaaska V., (1978), *Biochem. Physiol. Pflanzen* **172**, 133—153.
14. Igaue I., Yamandse T., Kurasawa S., (1975), *Jap. J. Agric.*, **49**, 353—362.
15. Igaue I., Watabe H., Takahashi K., Takekoshi M., Morota A., (1976), *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 823—825.
16. Lorenc-Kubis I., Morawiecka B., (1973), *Acta Soc. Bot. Pol.*, **42**, 369—377.
17. Lorenc-Kubis I., Morawiecka B., Niezgódka M., Hebrowska A., (1975), *Acta Soc. Pol.*, **44**, 255—263.
18. Lorenc-Kubis I., Morawiecka B., (1980), *Acta Biochim. Polon.*, **27**, 345—352.
19. Lorenc-Kubis I., Morawiecka B., Bøg-Hansen T. C., (1982), *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, W.de Gruyter, Berlin—New York, t. II, str. 509—515.
20. Yamagata H., Tanaka K., Kasai Z., (1979), *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2059—2066.
21. Mizuta S., Suda S., (1980), *Ann. Bot.*, **45**, 369—382.
22. Fujimoto S., Nakagawa T., Ishimitsu S., Ohara A., (1977), *Chem. Pharm. Bull.*, (Tokyo) **25**, 1459—1462.
23. Fujimoto S., Nakagawa T., Ohara A., (1977), *Chem. Pharm. Bull.*, (Tokyo), **25**, 3283—3288.
24. Fujimoto S., Ohara A., Uehara K., (1980), *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1659—1660.
25. Knypl J. S., Romanowska Z. W., Wilczek J., (1981), *Materiały IIIrd Symposium on Plant Growth Regulators*, Varna, Bułgaria, str. 86.
26. Kruzel M., Morawiecka B., (1982), *Acta Biochim. Polon.* **29**, 321—330.
27. Ferens M., Morawiecka B., (1983), *materiały XIX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego* str. 330.
28. Shinshi H., Katō K., (1978), *Phytochem.* **18**, 243—245.
29. Jonsson I., (1981), *Biochem. Biophys. Acta*, **660**, 204—213.
30. Lorenc-Kubis I., Wieczorek E., (1978), *materiały 12th FEBS Meeting*, Drezno — NRD, 0214.
31. Yamagata H., Tanaka K., Kasai Z., (1980), *Plant and Cell Physiol.*, **21**, 1449—1460.
32. Uehara K., Fujimoto S., Taniguchi T., (1974), *J. Biochem.*, **75**, 627—638.
33. Kubicz A., (1973), *Acta Biochim. Polon.*, **20**, 223—229.
34. Fujimoto S., Nakagawa T., Ohara A., (1977), *Agric. Biol. Chem.* **41**, 599—600.
35. Sugawara S., Inamoto Y., Ushijima M., (1981), *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1767—1773.
36. Felenbok B., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **17**, 165—170.
37. Kamenan A., Diopoh J., (1982), *Plant Sci. Lett.*, **24**, 174—182.
38. Wieczorek E., Wiśniowska J., Morawiecka B., (1978), *Acta Soc. Bot. Pol.*, **47**, 441—453.
39. Chen S. C., Ogura N., Nakagawa H., Takehama H., (1974), *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 2069—2070.

40. Tamura T., Minamikawa T., Koshiha T., (1982), *Plant and Cell Physiol.*, **23**, 155—159.
41. Crasnier M., Ricard J., Noat G., (1982), *FEBS Lett.*, **144**, 309—312.
42. Ninomiya Y., Ueki K., Sato S., (1977), *Plant and Cell Physiol.*, **18**, 413—420.
43. Akiyama T., Suzuki H., (1980), *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **175**, 436—446.
44. Uehara K., Fujimoto S., Taniguchi T., Nakai K., (1974), *J. Biochem.*, **75**, 639—649.
45. Tamura T., Minamikawa T., Koshiha T., (1982), *J. Exp. Bot.*, **33**, 1332—1339.
46. Lorenc-Kubis I., Morawiecka B., (1978), *Acta Soc. Bot. Pol.*, **47**, 84—89.
47. Wieczorek E., Lorenc-Kubis I., Morawiecka B., (1977), *Acta Soc. Bot. Pol.*, **46**, 481—488.
48. Akiyama T., Uchimiya H., Suzuki H., (1981), *Plant and Cell Physiol.*, **22**, 1029—1034.
49. Akiyama T., Uchimiya H., Suzuki H., (1981), *Plant and Cell Physiol.*, **22**, 1023—1028.
50. Akiyama T., Suzuki H., (1981), *Plant Sci. Lett.*, **21**, 137—143.
51. Ashford A. E., Jacobsen J. V., (1974), *Planta*, **120**, 81—105.
52. Bailley K. M., Phillips I. D. J., Pitt D., (1976), *J. Exp. Bot.* **27**, 324—336.
53. Murray D. R., (1980), *Ann. Bot.* **45**, 273—281.
54. Ueki K., (1977), *Plant and Cell Physiol.* **19**, 385—392.
55. Ueki K., (1979), *Plant and Cell Physiol.* **20**, 789—796.
56. Besford R. T., Syred A. D., (1979), *Ann. Bot.* **43**, 431—435.
57. Besford R. T., (1979), *Ann. Bot.* **44**, 153—161.
58. Charvat I., Esau K., (1975), *J. Cell. Sci.* **19**, 543—561.
59. Młodzianowski F., (1971), *Z. Pflanzenphysiol.* **66**, 362—365.
60. Baker J. E., Takeo T., (1973), *Plant and Cell Physiol.* **14**, 459—471.
61. Hodge E. T., Sacher J. A., (1975), *Biochem. Physiol. Pflanzen* **168**, 433—441.
62. de Leo P., Sacher J. T., (1970), *Plant Physiol.* **46**, 208—211.
63. de Leo P., Sacher J. A., (1970), *Plant Physiol.* **46**, 806—811.
64. Moore R., Walker D. B., (1981), *Protoplasma* **109**, 317—334.
65. Jones D. T., Villiers T. A., (1972), *J. Exp. Bot.* **23**, 375—380.
66. Pitt D., Stewart P., (1980), *Trans. Br. mycol. Soc.* **74**, 343—356.
67. Rudolph K., Stahmann M. A., (1966), *Plant Physiol.* **41**, 389—394.
68. Pyliotis N. A., Ashford A. E., Whitecross M. I., Jacobsen J. V., (1979), *Planta* **147**, 134—140.
69. Buchanan B. B., Crawford N. A., Wolosiuk R. A., (1979), *Plant Sci. Lett.* **14**, 245—251.
70. Fujimoto S., Nakagawa T., Ohara A., (1978), *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **27**, 545—548.
71. Lorenc-Kubis I., Bøg-Hansen T. C., (1981), *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, W.de Gruyter, Berlin—New York, t. I str 157—167.
72. Lorenc-Kubis I., Morawiecka B., Wieczorek E., Wiśniowska J., Wierzba E., Ferens M., Bøg-Hansen T. C., (1981), *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, W.de Gruyter, Berlin—New York, t I, str. 169—178.

73. Ferens M., Morawiecka B., (1980), materiały XVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, str. 49.
74. Morawiecka B., Arabska E. (1982), materiały Vth International Lecture Meeting, Berno — Szwajcaria, str. 126—127.

MINI-REVIEW

BARBARA OKONIEWSKA *) , HALINA AUGUSTYNIAK **)

Genom organeli roślin wyższych

Organellar genome of higher plants.

Systematyczne badania dziedziczenia pozajądrowego określanego również jako dziedziczenie pozachromosomowe, cytoplazmatyczne lub niemen-drowskie, podjęto w latach sześćdziesiątych po wykazaniu obecności DNA w chloroplastach i mitochondriach. Zainteresowanie pozajądrowym DNA wynika nie tylko ze względów ogólnopoznawczych, ale także z faktu, że cytoplazmatyczne geny mają wpływ na produktywność roślin. Budzi to nadzieje, że manipulacje organelowym materiałem genetycznym mogą być wykorzystane do celów praktycznych.

Chloroplasty i mitochondria zawierają wszystkie podstawowe składniki niezbędne dla przebiegu replikacji, transkrypcji i translacji. Organelowy aparat biosyntezy białek jest różny od cytosolowego, a wielkość organelowego DNA wystarcza do kodowania co najmniej stu polipeptydów.

Ostatnie lata przyniosły szczególnie dużo danych dotyczących budowy genomu chloroplastowego roślin, a także genomu mitochondrialnego niektórych zwierząt i grzybów. Okazało się, że dwuniciowy mtDNA komórek zwierzęcych występuje w formie kolistej, zawiera 15—18 kpz, a jego przeciętna długość obwodu wynosi około 5 μm . U grzybów cząsteczki mtDNA są kilkakrotnie większe i występują przeważnie w formie kolistej. Liniowy DNA znaleziono dotychczas w mitochondriach *Hansenula mrakii* oraz w mitochondriach pierwotniaków: *Tetrahymena pyriformis* i *Paramecium aurelia*. Mitochondrialny DNA komórek zwierzęcych koduje dwa rRNA, dwadzieścia dwa tRNA i trzynaście białek. Mitochondrialny DNA droż-

*) mgr, Zakład Biochemii Biopolimerów UAM, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań

***) doc. dr hab., Międzyuczelniany Instytut Biochemii AR, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

Wykaz skrótów: ctDNA — chloroplastowy DNA, mtDNA — mitochondrialny DNA, cms — rośliny cytoplazmatycznie męsko sterylne, pz — pary zasad, kpz — kilo par zasad.

dży zawiera geny dwudziestu sześciu tRNA, dwóch rRNA, trzech podjednostek oksydazy cytochromowej, dwóch podjednostek ATP-azy wrażliwej na oligomycynę i jednej podjednostki cytochromu b. W mtDNA komórek zwierzęcych i drożdży występuje ponadto kilka długich sekwencji zawierających w tej samej fazie odczytu kodon inicjujący i terminujący i mogących teoretycznie kodować białka o nieznanym funkcji (ang. open reading frame).

Mitochondrialny DNA roślin wyższych jest znacznie większy i zawiera od 160 do 2500 kpz (1). W przypadku mtDNA roślin mamy do czynienia z dużym zróżnicowaniem nie tylko rozmiarów (od 0,5 do powyżej 30 μm) ale i form fizycznych, gdyż występuje on w postaci cząsteczek zarówno kolistych jak i liniowych, przy czym w różnych mitochondriach proporcje tych form są różne. Duże zróżnicowanie wielkości cząsteczek mtDNA daje się zauważyć nawet u roślin blisko ze sobą spokrewnionych, np. mtDNA melona (2500 kpz) jest ponad siedmiokrotnie większy od mtDNA arbuza (343 kpz) (1). Niektórzy autorzy przyjmują, że roślinne mitochondrie mogą pobierać obce DNA i wprowadzać je do swego genomu co częściowo tłumaczyłoby duże rozmiary mtDNA (2).

Trawienie mtDNA roślin enzymami restrykcyjnymi prowadzi do uzyskania dużej liczby fragmentów występujących w zmiennej stechiometrii. Suma mas cząsteczkowych tych fragmentów jest z reguły większa niż masa cząsteczkowa mtDNA oszacowana na podstawie badań mikroskopowych lub kinetyki renaturacji. Niezgodność tę próbowano tłumaczyć modyfikacją (np. metylacją zasad) części miejsc restrykcyjnych rozpoznawanych przez określone enzymy, ale sugestii tej eksperymentalnie nie potwierdzono. Obecnie uważa się, że skomplikowane wyniki trawienia mtDNA enzymami restrykcyjnymi są odzwierciedleniem raczej heterogenności populacji mtDNA w obrębie pojedynczych mitochondriów niż różnic międzymitochondrialnych. Sprawa ta wymaga jednak dalszych badań.

Ostatnio dzięki zastosowaniu klonowania w kosmidach opracowano mapę fizyczną mtDNA kukurydzy. Okazało się, że zawiera on duże powtarzające się sekwencje, których nie stwierdzono w mtDNA komórek zwierzęcych lub grzybów. Mitochondrialny genom kukurydzy występuje albo w formie pojedynczej kolistej cząsteczki złożonej z około 1200 kpz, albo w postaci trzech kolistych cząsteczek, gdyż wewnątrzcząsteczkowe rekombinacje mtDNA formy pierwszej prowadzą do utworzenia się dwóch dodatkowych kolistych cząsteczek mtDNA (2). Oznaczono też wielkość mtDNA pszenicy (minimum 590 kpz a prawdopodobnie więcej) i wykazano, że zawiera on również powtarzające się sekwencje (3).

Dotychczas nie ustalono jaka forma DNA jest rzeczywiście natywną formą występującą w mitochondriach: kolistą czy liniową? Sądzi się na ogół, że liniowe cząsteczki powstają z cząsteczek kolistych podczas izolowania mtDNA. Można również przyjąć drugą możliwość, a mianowicie

stopniowe powstawanie kolistych cząsteczek DNA poprzez tzw. „lasso-podobne” struktury, które opisano między innymi w przypadku mtDNA *Pennisetum typhoides* (4).

Z obserwacji tzw. natywnych cząsteczek roślinnych mtDNA w mikroskopie elektronowym wynika, że w populacji tych cząsteczek dominują formy liniowe. Duże zainteresowanie wzbudzają ciągłe kolisty formy mtDNA występujące szczególnie w preparatach uzyskanych z kultur tkankowych. Znaczną ilość takich kolistych cząsteczek o różnych rozmiarach obserwowano w kulturach tkankowych tytoniu, kukurydzy i fasoli. Część z nich była oligomerami, ale część stanowiła genetycznie różne cząsteczki (5, 6).

Oprócz wielkocząsteczkowego DNA (liniowego lub kolistego) w mitochondriach występują małe kolisty cząsteczki typu plazmidów. Te cząsteczki — plazmidy występują przeważnie u roślin wykazujących cechę męskiej sterylności. Od dawna wiadomo, że męska sterylność roślin jest przekazywana przez cytoplazmę mateczną i że niektóre geny jądrowe powodują przywrócenie płodności pyłku. W przypadku kukurydzy i sorgo zebrano szczególnie dużo dowodów na to, że genetyczne determinanty odpowiedzialne za cechę męskiej sterylności są umieszczone w mtDNA. Po raz pierwszy linię roślin z cechą męskiej sterylności tzw. cms, opisano w przypadku kukurydzy. Badania genetyczne pozwoliły na rozróżnienie u kukurydzy trzech linii, które oznaczono odpowiednio jako cms-T, cms-S, cms-C. Mitochondrialny DNA z roślin linii cms różni się od mtDNA z roślin normalnych podatnością na działanie enzymów restrykcyjnych, oraz rodzajem cząsteczek o cechach plazmidów. Jeden z plazmidów o budowie kolistej (1.94 kpz) występuje powszechnie w mitochondriach kukurydzy zarówno w roślinach męskopłodnych, normalnych (N) jak i roślinach z cechą męskiej sterylności. Mitochondria roślin normalnych (N) — oprócz plazmidu o budowie kolistej zawierają plazmid o budowie liniowej (2.35 kpz). W mitochondriach roślin linii cms-T znaleziono te same plazmidy co w mitochondriach roślin (N), ale plazmid liniowy był krótszy o 200 pz. Mitochondria z roślin linii cms-C również zawierają plazmidy typu roślin (N), ale oprócz tego dwa kolisty plazmidy o 1.57 i 1.42 kpz. Mitochondria zaś roślin cms-S oprócz plazmidów typu roślin (N) zawierają dwa plazmidy liniowe o 6.2 i 5.2 kpz. Plazmidy te nazwane odpowiednio S₁ i S₂ posiadają homologiczne rejony o łącznej długości około 1.7 kpz (7). Stwierdzono ponadto, że te dwie liniowe cząsteczki zawierają sekwencje terminalne o około 200 pz długości o odwróconej orientacji (ang. inverted repeat) co sugeruje, że mogą być one przenoszone jako transpozomy do genomu mitochondrialnego. Sugeruje się również, że integracja plazmidowych DNA typu S z genomowym mtDNA prowadzi do przywrócenia płodności pyłku. Końce 5' plazmidów typu S są związane z białkami (prawdopodobnie kowalencyjnie), które przypuszczalnie chronią je przed degradacją i są zaangażowane w replikację DNA. Uważa się, że plazmidy w kompleksie

z białkami mogą okazać się dobrymi wektorami w przenoszeniu obcej informacji genetycznej do roślin. Podobne liniowe plazmidy zawierające na końcach sekwencje o odwróconej orientacji, ale nie związane z występowaniem cechy męskiej sterility, znaleziono w mtDNA kilkunastu odmian kukurydzy uprawianych w Ameryce Łacińskiej (8). Najczęściej jednak cząsteczki typu plazmidów występują w mitochondriach roślin wykazujących cechę męskiej sterility jak to wykazano np. u sorgo (9), bobu (10) czy buraka (11). Obecność plazmidów w mitochondriach roślin kilku gatunków rodzaju *Brassica* ma również związek z występowaniem cechy męskiej sterility. Plazmid ten jest cząsteczką liniową o wielkości 11.3 kbp, na końcach nie zawiera sekwencji powtórzonej w odwrotnej orientacji, oraz nie wykazuje homologii z mtDNA (12). Odpowiedź na pytanie o rolę pełnioną przez te plazmidy, można będzie uzyskać po stwierdzeniu jaką informację genetyczną zawierają te cząsteczki, oraz jaki jest mechanizm ich związku z cechą męskiej sterility. Wstępne badania sugerują, że istnieje zbieżność pomiędzy obecnością plazmidów a syntezą dodatkowych polipeptydów.

Chociaż większość dotychczasowych badań wskazuje na mtDNA jako odpowiedzialny za pojawienie się cechy męskiej sterility u roślin, to niektóre prace wydają się sugerować, że istnieje również pewna zbieżność tej cechy z ctDNA. W *Brassica napus* (13) zauważono niewielką różnicę pomiędzy chloroplastowymi operonami rRNA z roślin męskopłodnych i z roślin wykazujących cms. Wyraźne różnice pomiędzy ctDNA z normalnych i męskosterylnych linii kukurydzy, pszenicy i rzepaku wykazano stosując do rozdziału fragmentów restrykcyjnych ctDNA technikę dwuwymiarowej elektroforezy (14).

Duże zainteresowanie budzi nadal organizacja i funkcja genomu mitochondrialnego oraz różnica kodu mitochondrialnego i kodu uniwersalnego. Nasze dotychczasowe informacje dotyczące występowania i sekwencji niektórych genów rRNA i tRNA opierają się na danych, które uzyskano badając genom mitochondriów pszenicy i kukurydzy. Jak wynika z badań hybrydacyjnych (15) genom mitochondrialny pszenicy koduje 26S, 18S, 5S rRNA oraz populację tRNA. Organizacja tych genów jest inna niż w genomach prokariotycznych, chloroplastowych i jądrowych. Wykazano, że mitochondrialne geny 26S rRNA i 18S są oddalone od siebie oraz, że gen 5S rRNA występuje w pobliżu genu 18S rRNA. Geny tRNA są natomiast rozproszone wzdłuż całego genomu, tworząc niewielkie zgrupowania w rejonach genów 18S rRNA i 5S rRNA. Taką samą organizację genów rRNA zauważono w mitochondriach wielu innych okrytonasiennych. Zarówno wcześniejsze badania z zastosowaniem hybrydacji jak i ostatnie badania klonowanego mtDNA pszenicy wskazują na występowanie w tym DNA kilku kopii genów 26S, 18S i 5S rRNA.

W mtDNA kukurydzy geny rRNA występują tylko w pojedynczych kopiach (16). Poznano również sekwencję dwóch genów tRNA-tRNA^me¹

i tRNA^{pro} występujących w pobliżu 3' i 5' końca 18S rRNA w mtDNA pszenicy. W obydwu tRNA sekwencja CCA nie była kodowana przez genom mitochondrialny i obydwa tRNA wykazywały cechy raczej typowo eubakteryjne (17).

Stosunkowo najmniej wiadomości mamy o kodowaniu poszczególnych białek przez genom mitochondrialny. W produktach translacji mitochondrialnego pochodzenia wyróżniono około 20 polipeptydów, wśród których zidentyfikowano dwie podjednostki oksydazy cytochromowej (I i II), podjednostkę IX ATPazy. Nie wiadomo wprawdzie czy wszystkie te polipeptydy są kodowane przez genom mitochondrialny. Ponieważ jednak nie potwierdzono sporadycznych informacji wskazujących na przeniesienie mRNA do mitochondriów przypuszcza się, że polipeptydy syntetyzowane na rybosomach mitochondrialnych istotnie są kodowane przez mtDNA. Jak dotąd poznano tylko sekwencję genu podjednostki II oksydazy cytochromowej z mitochondriów kukurydzy (1). Gen z kukurydzy zawiera intron o długości 794 pz i wykazuje 47% i 40% homologii z odpowiednimi genami drożdży i wołu, które jednak nie zawierają sekwencji intronowych.

Mało również wiemy jaki jest kod genetyczny mtDNA roślin. Wiadomo, że kod genetyczny funkcjonujący w mitochondriach ssaków i u *Drosophila* różni się od kodu uniwersalnego. W przypadku mitochondriów roślinnych jedyna informacja o odrębności kodu pochodzi z określenia sekwencji genu II podjednostki oksydazy cytochromowej mitochondriów kukurydzy oznaczonego jako *mox 1*. Wynika z niej, że kodon TGA (UGA), który w mitochondriach z innych źródeł koduje tryptofan, nie występuje w genie *mox-1* co sugeruje, że ten kodon nie jest czytany w roślinnym mtDNA. Tryptofan natomiast może być kodowany przez kodon argininy CGG, jak również UGG kodujący tryptofan w kodzie uniwersalnym.

Znacznie lepiej niż genom mitochondrialny poznano organizację i właściwości kodujące genomu chloroplastowego roślin wyższych. Chloroplastowy DNA z roślin wyższych różni się od mtDNA zarówno wielkością jak i formą fizyczną. Chloroplastowy DNA występuje przeważnie w kowalencyjnie zamkniętej formie kolistej. Jego wielkość waha się w granicach od 121 do 160 kpz, a długość od 39 do 46 μm u roślin dwuliściennych i od 35 do 55 μm u roślin jednoliściennych (18). Genom chloroplastowy cechuje homogenność i konserwatywność. Stwierdzono, że oprócz genów rRNA i tRNA genom chloroplastowy koduje około 25 białek w tym dziesięć białek rybosomalnych. Geny rRNA ułożone są w jednostce transkrypcyjnej w kolejności 16S, 23S, i 4.5S. Występujący w pobliżu genu 4.5S rRNA, gen 5S rRNA stanowi prawdopodobnie odrębną jednostkę transkrypcyjną. Takie ułożenie genów rRNA przypomina ułożenie w operonie bakteryjnym. Podobnie jak w przypadku bakterii, pomiędzy genami 16S i 23S

rRNA ulokowane są geny tRNA^{iso} i tRNA^{ala}. U większości badanych roślin wyższych genom chloroplastowy zawiera dwa rejony o unikalnej sekwencji (ang. single copy DNA) rejon) duży i mały, które są oddzielone dwoma odcinkami sekwencji powtórzonej w odwrotnej orientacji (ang. *inverted repeat*). W każdym z tych odcinków występuje jeden operon rRNA, który wraz z niektórymi genami tRNA zajmuje tylko 30% ich długości. Na ponad 10 przebadanych chloroplastowych genomów roślin wyższych tylko trzy genomy — bobu, grochu i grochu włoskiego nie zawierają dwóch odcinków DNA o odwrotnie powtórzonej sekwencji i tym samym zawierają tylko pojedyncze kopie genów rRNA.

Poznano już sekwencję nukleotydową genów rRNA z niektórych roślin. Okazało się, że geny te wykazują duży stopień homologii z odpowiednimi genami rRNA *E. coli*. I tak np. gen 16S rRNA kukurydzy wykazuje 79% homologii z 16S rRNA *E. coli*, a sekwencja 23S rRNA jest aż w 67% homologiczna z odpowiednim rRNA *E. coli*. Oprócz typowych rodzajów rRNA charakterystyczne dla chloroplastów roślin wyższych jest występowanie 4.5S rRNA w ctDNA. Funkcja tego rRNA jest dotychczas nieznana. Wykazuje on wysoki stopień homologii z 3' końcem eukariotycznego 28S rRNA. Sugeruje się, że 4.5S rRNA stanowi 3' końcowy fragment plastydowego 23S rRNA (18).

U wielu roślin określono też liczbę genów tRNA. Jak wynika z dotychczasowych badań, chloroplasty zawierają geny tRNA odpowiadające wszystkim 20 aminokwasom. W związku z obecnością genów izoakceptorowych tRNA ogólna liczba chloroplastowych genów tRNA przekracza 20. W szpinaku i grochu np. określono liczbę genów tRNA na 40 (19). W niektórych chloroplastowych genomach określono też położenie wielu genów tRNA. W szpinaku znane jest położenie 21 genów tRNA specyficznych dla 14 aminokwasów, u fasoli 31 genów dla 24 aminokwasów, a w kukurydzy 37 genów dla 17 różnych aminokwasów (20). Geny tRNA ułożone są głównie w dwóch rejonach chloroplastowego genomu: w dużym rejonie o unikalnej sekwencji, oraz w rejonie operonu rRNA. Zbadano już sekwencję ponad 10 genów tRNA, głównie z chloroplastów kukurydzy, szpinaku i tytoniu, a także sekwencję rejonów przylegających do pięciu genów tRNA kukurydzy (21). Wyniki tych badań pozwalają na następujące uogólnienia:

- sekwencje kodujące genów tRNA wykazują większą homologię z genami prokariotów niż z genami eukariotów;
- cechy eukariotyczne tych genów wyrażają się w nieobecności terminalnej sekwencji CCA w genie, oraz w występowaniu sekwencji intronowych;
- introny w genach chloroplastowych są bardzo długie np. geny tRNA^{iso}, tRNA^{ala} oraz tRNA^{uua} UAA z kukurydzy zawierają introny o długości odpowiednio 949 i 806 i 458 pz; gen tRNA^{uua} z tytoniu 707 pz;

- introny występują w różnych miejscach genu tRNA, między innymi pomiędzy pierwszą i drugą zasadą antykodonu, jak np. w genie tRNA UAA z kukurydzy (22);
- sekwencje przylegające z 5' i 3' końca genów tRNA są przeważnie homologiczne z eubakteryjnym promotorem i terminatorem;
- większość genów, a być może wszystkie są transkrybowane niezależnie.

Oprócz genów tRNA, w ctDNA szpinaku i kukurydzy przy końcu 5' 16S rRNA zidentyfikowano też pseudogeny tRNA. Nie udało się dotychczas znaleźć genów kodujących tRNA asparaginowy, glutaminowy, cysteinowy kwasu glutaminowego. Prawdopodobnie jest to częściowo wynikiem trudności w identyfikacji tRNA dla tych aminokwasów (tRNA^{asp} wykryto) po elektroforetycznym rozdziale mieszaniny tRNA izolowanej z chloroplastów.

Genom chloroplastowy koduje kilka białek. Są to między innymi: duża podjednostka karboksylazy rybulozodwufosforanowej, pięć z ośmiu podjednostek ATPazy, cytochrom F, białko błony tylakoidowej tzw. białko 32000. W ctDNA kukurydzy, szpinaku, pszenicy, ogórka, grochu i tytoniu zlokalizowano już gen dużej podjednostki karboksylazy rybulozodwufosforanowej, a w przypadku kukurydzy określono również sekwencję tego genu. Gen ten występuje w dużym rejonie o unikalnej sekwencji w cząsteczce ctDNA. Zlokalizowano również gen białka 32 000, oraz geny trzech podjednostek ATPazy.

Wyniki badań sekwencji niektórych genów tRNA oraz genów białek, pozwoliły wysnuć wniosek, że kod genetyczny funkcjonujący w chloroplastach wydaje się być czytany według reguł hipotezy tolerancji, która zakłada obecność minimum 32 tRNA.

Homogenność i konserwatyzm chloroplastowego genomu powoduje, że jest on dobrym molekularnym markerem pozwalającym na śledzenie zmian u roślin należących do różnych grup taksonomicznych. Analizy obrazów restrykcyjnych chloroplastowego DNA wykorzystywano w wielu badaniach dotyczących filogenezy między innymi kukurydzy, pszenicy, kapusty. Wyniki tych badań pozwoliły również na wysnucie innego wniosku, a mianowicie, że budowa chloroplastowych genomów zawierających sekwencje powtórzone w odwrotnej orientacji jest bardziej stabilna, niż genomów, które utraciły te sekwencje (23). Wynika z tego, że sekwencja powtórzona w odwrotnej orientacji może sprzyjać ewolucyjnej zachowawczości ctDNA.

Wiele zagadnień dotyczących chloroplastowych i mitochondrialnych genomów roślin wyższych wymaga jednak dalszych badań. Nadal nie wiadomo, że genomy chloroplastowe wszystkich roślin zawierają zestawy takich samych lub bardzo podobnych genów; to samo dotyczy mitochondriów. Mało zbadany jest również problem współzależności ekspresji geno-

mów organelowych i jądrowych. Wydaje się, że problem ten będzie można badać dysponując odpowiednimi mutantami, lub dobrze zbadanymi liniami fenotypowymi typu cms. Poszukiwania mutantów chloroplastowych i mitochondrialnych prowadzi się między innymi stosując somatyczne fuzje *via* protoplasty. Dotychczas nie uzyskano jeszcze zadawalających wyników na tym polu, chociaż wydaje się możliwe uzyskanie takich rekombinantów, szczególnie mitochondrialnych.

Od dawna przypuszczano, że pomiędzy genomem jądrowym roślin wyższych jak i genomami organelowymi dochodzi do oddziaływań, które mogą powodować przekazywanie pewnych odcinków DNA. Ostatnio przeprowadzone badania potwierdziły to przypuszczenie. Wykazano (24), że segment o wielkości 12 kbp mtDNA kukurydzy jest homologiczny (90% homologii) z odcinkiem chloroplastowego DNA obejmującego sekwencję powtórzoną w odwrotnej orientacji i kodującym 16S rRNA oraz geny tRNA^{leu} i tRNA^{trp}. Okazało się również, że ten właśnie rejon jest zmieniony w mtDNA roślin wykazujących cechę męskiej sterylności, co sugeruje, że zachowanie homologii tego rejonu pomiędzy genomem chloroplastowym i genomem mitochondrialnym jest konieczne dla normalnego wzrostu roślin. Mitochondrialny DNA kukurydzy zawiera też sekwencje homologiczne z chloroplastowym genem z kukurydzy kodującym dużą jednostkę karboksylazy rybulozodwufosforanowej (2). Nie zauważono różnicy w sekwencji tego rejonu w mtDNA roślin wykazujących cechę męskiej sterylności a mtDNA roślin męskopłodnych. Ostatnio doniesiono także, że genom jądrowy szpinaku zawiera sekwencje homologiczne z ctDNA szpinaku i że sekwencje te są inkorporowane w specyficznych miejscach genomu (25). W ctDNA i mtDNA szpinaku też znaleziono rejony homologiczne. Homologie sekwencji genomów trzech przedziałów komórkowych mogą wskazywać również, że są one niezbędne do biogenezy organeli.

Genomy mitochondriów i chloroplastów wykazują wiele analogii z genomami bakteryjnymi. Podobieństwo to było między innymi podstawą do wysunięcia hipotezy o pochodzeniu organeli od wolnożyjących cyjanobakterii, które zostały wchłonięte do komórki pro-eukariotycznej. Najnowsze badania budowy kwasów nukleinowych organeli dostarczają raczej argumentów potwierdzających endosymbiotyczną hipotezę pochodzenia, a doniesienia o homologii pomiędzy genomami trzech przedziałów komórkowych w roślinach wyższych sugerujące częste procesy transpozycji DNA i międzyprzedziałowej rekombinacji, rozszerzają nasz pogląd o przebiegu ich ewolucji.

Hipoteza endosymbiotycznego pochodzenia organeli mimo, że udokumentowana lepiej niż inne, wymaga dalszych dowodów doświadczalnych. Mogłyby ich dostarczyć między innymi badania organizmów stanowiących ewolucyjny pomost pomiędzy cyjanobakteriami a chloroplastami. Stąd duże zainteresowanie wzbudziły ogłoszone ostatnio wyniki badań dotyczą-

ce *Cyanophora paradoxa* (26). Okazało się, że u *Cyanophora paradoxa* obie podjednostki karboksylazy rybulozodwufosforanowej są kodowane przez genom cyjaneli. Wydaje się to wskazywać, że cyjanele *C. paradoxa* stanowią pośrednie ogniwo przy przekształcaniu się endosymbiotycznych cyjanobakterii w chloroplasty.

Zaakceptowano do druku 15.03.1984

PISMIENICTWO

1. Leaver C. J., Gray M. W., (1982), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 373—402.
2. Lonsdale D. M., Hodge T. P., Howe Ch. J., Stern D. B., (1983), *Cell*, **34**, 1007—1014.
3. Delorme S., Lejenne B., Sevignac M. Delcher E., Lehegarat J. C., Quetier F., (1983), praca przesłana do druku.
4. Kim B. D., Lee K. J., DeBusk A. G., (1982), *FEBS lett.*, **147**, 231—234.
5. Dale R. M. K., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 4453—4457.
6. Dale R. M. K., Wu M., Kiernan M. C. C., (1983), *Nucleic Acid Res.*, **11**, 1673—1685.
7. Kemble R. J., Thompson R. D. (1982), *Nucleic Acid Res.*, **10**, 8181—8190.
8. Weissinger A. K., Timothy D. M., Levings C. S. III., Hu W. W. L., Goodman M. M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 1—5.
9. Pring D. R., Conde M. F., Schertz, K. F., Levings C. S. III., (1982), *Molec. gen. Genet.*, **186**, 180—184.
10. Boutry M., Briquet M., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **127**, 129—135.
11. Powling A., Ellis T. H. N., (1983), *Theor. Appl. Genet.*, **65**, 323—328.
12. Palmer J. D., Shields C. R., Cohen D. B., Orton Th. J., (1983), *Nature* **301**, 725—728.
13. Vedel F., Mathieu C., (1983), *Current Genetics*, **7**, 13—20.
14. Jigeng L., Yi-nong L., (1983), *Theor. Appl. Genet.*, **64**, 231—238.
15. Bonen L., Gray M. W., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 319—335.
16. Stern D. B., Dyer T. A., Lonsdale D. M., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 3333—3339.
17. Gray M. W., Spencer D. F., (1983), *FEBS Lett.*, **161**, 323—327.
18. Bohnert H. J., Crouse E. J., Schmitt J. M., (1982), w *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Nucleic Acids and Proteins in Plants II*, red. Parthier B., Boutler D., t. 14B str. 475—530, Springer—Verlag Berlin.
19. Mecker R., Tewari K. K., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **696**, 66—75.
20. Mubumbila M., Gordon K. H. J., Crouse E. J., Burkard G., Weil J. H., (1983), *Gene*, **21**, 257—266.
21. Steinmetz A. A., Krebbers E. T., Schwarz Zs., Gubblins E. J., Bogorad L., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 5503—5511.
22. Steinmetz A., Gubbins E. J., Bogorad L., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 3027—3037.
23. Palmer J. D., Thompson W. F., (1982) *Cell*, **29**, 537—550.
24. Stern D. B., Lonsdale D. M., (1982), *Nature* **299**, 698—702.
25. Timmis J. N., Scott N. Steele (1983), *Nature*, **305**, 65—67.
26. Heinhorst S., Shively J. M., (1983), *Nature*, **304**, 373—374.

ZALECENIA KOMISJI TERMODYNAMIKI

Zalecenia dotyczące pomiarów i przedstawiania danych równowag biochemicznych

Opracowano na podstawie dokumentu Międzyunijnej Komisji Biotermodynamiki, opublikowanego w *Eur. J. Biochem.* (1977), 72, 1--7 i w innych czasopismach

Dane dotyczące stanów równowagi są ważne dla opisywania i zrozumienia układów biochemicznych. W chwili obecnej poszczególni badacze nie tylko wybierają różne warunki doświadczalne badając podobne lub zgoła identyczne reakcje, ale w różny sposób przedstawiają wyniki swych badań. W wielu przypadkach opis warunków doświadczalnych nie dostarcza niezbędnych informacji, pozwalających na powtórzenie doświadczenia. Może to prowadzić do nieporozumień i trudności w porównywaniu wyników badań różnych autorów. W badaniach stanów równowagi biochemicznej występuje szereg specjalnych problemów, nie spotykanych w chemii ogólnej. Dla osiągnięcia stanu równowagi zazwyczaj niezbędne jest dodanie do badanego układu co najmniej jednego swoistego enzymu, a niekiedy dwu lub więcej. Dodany enzym może wymagać obecności kofaktorów, jak np. jonów metali. Ponadto reaktanty i produkty mogą wiązać lub uwalniać protony lub inne jony w przebiegu badanej reakcji. Tak więc układ doświadczalny musi być opisywany ze szczególną uwagą i dokładnością.

Uzyskiwanie i opisywanie danych termodynamicznych, dotyczących układów biochemicznych, jak również innych złożonych układów reagujących, wiąże się z dwoma podstawowymi problemami:

1. Nie zawsze można precyzyjnie określić związki reagujące.
2. Nawet w przypadkach, w których określenie związków reagujących jest możliwe, często nie udaje się wyznaczyć ich aktywności termodynamicznych.

W niniejszym opracowaniu podano zalecenia mające na celu lepsze wykorzystanie wyników badań z zakresu równowagi biochemicznej, jak również zwiększenie zgodności wyników badań otrzymywanych przez różnych badaczy. Zalecenia te zawierają zestaw standardowych warunków, mający ułatwić osiągnięcie powtarzalnych wyników w szerokim zakresie równowag biochemicznych. Nie wyklucza się możliwości doboru specjalnych warunków doświadczalnych dla niektórych reakcji. Gdziekolwiek to jednak możliwe, reakcje te należy badać także w zalecanych warunkach standardowych. Dla uniknięcia interpretacyjnego zamieszania zaleca się aby we wszystkich przypadkach przedstawiać dane doświadczalne, używając standardowej terminologii, symboli i jednostek.

Czytelnika, który chciałby zaznajomić się z dyskusją odnośnie sposobu przedstawiania wyników doświadczalnych z zakresu termodynamiki odsyła się do zbioru reguł CODATA (1) oraz IUPAC (2).

CZEŚĆ I. WARUNKI STANDARDOWE POMIARÓW RÓWNOWAGI

Termodynamiczne stałe równowagi określa się za pomocą aktywności reaktantów i produktów. W wielu układach biochemicznych nie udaje się jednak wyznaczyć aktywności wszystkich składników. Często zachodzi więc konieczność obliczania

stałej równowagi na podstawie stężeń. Dla wielu celów akceptuje się przeto określenie stanu równowagi jako ilorazu stężeń substancji reagujących, mierzonych w stanie równowagi i tą wielkość (stężeniową stałą równowagi) oznacza się w niniejszym opracowaniu symbolem K_c . Należy jednak zdać sobie sprawę z tego, że wartości takich stałych równowagi K_c i odpowiadających im wartości zmian entalpii swobodnej¹⁾, ΔG_c° nie będą w rzeczywistości stałe, jeśli układ ulegnie zmianie. Dlatego też jest rzeczą istotną, aby wartościom liczbowym omawianych wielkości towarzyszyły dokładne i kompletne opisy układu mieszaniny reagującej oraz metod, za pomocą których oznaczono ten skład. Odsyłacze do wcześniejszych prac w wielu przypadkach mogą zastąpić opis.

Warunki doświadczalne

Zaleca się, aby przeprowadzić pomiary w temperaturze 25°C (lub 37°C) i sile jonowej, doprowadzonej za pomocą chlorku potasu²⁾ do wartości 0,10 mola/dm⁻³, używając najniższych efektywnych stężeń buforu. Jeśli warunki powyższe okażą się niewykonalne, należy dobrać inne, nie ulegające zmianie w czasie całego doświadczenia i ściśle je określić. Użyte odczynniki powinny być możliwie najczystsze, a metody ich oczyszczania, stopień czystości i źródło pochodzenia każdego odczynnika podane w pracy. Uzyskanie warunków rzeczywistego stanu równowagi powinno być wykazane przez osiągnięcie tego stanu z obu kierunków i wykonanie oznaczeń w kilku stężeniach reaktantów. Jest również rzeczą pożądaną, aby przebadać wpływ zmian siły jonowej oraz swoistych efektów wywołanych obecnością soli w mieszaninie. Należy podać kompletne lub przynajmniej reprezentatywne dane doświadczalne, na podstawie których wyznaczono stałe równowagi.

Temperatura

Zaleca się jako temperaturę standardową 25°C (298,15K) z uwagi na możliwość porównania wyników z większością dostępnych danych chemicznych. Jeśli jest to możliwe, należy podać wartości liczbowe stałych równowagi w obu temperaturach: 25° i 37°C. Jest rzeczą pożądaną, by wyznaczyć stałe równowagi w kilku temperaturach. Na podstawie zależności stałej równowagi od temperatury można wyznaczyć standardowe zmiany entalpii i entropii. Jednakże przeprowadzając takie doświadczenia należy wziąć pod uwagę zmiany dysocjacji reaktantów i buforów, zachodzące przy zmianie temperatury, oraz wyniki z tego zmiany pH i stężeń dysocjujących związków. Należy pamiętać, że kalorymetria jest na ogół dokładniejszą metodą wyznaczania zmian entalpii reakcji. Zmiany entalpii reakcji, wyznaczone kalorymetrycznie należy skorygować o wartość zmiany entalpii każdej reakcji buforu, związanej z pobieraniem lub oddawaniem protonów.

Bufory i pH

W przypadku, gdy dokonuje się ograniczonej liczby pomiarów, należy je przeprowadzać w pH równym 7,0 oraz, jeśli to możliwe, także w takim pH, w którym pozorna stała równowagi K_c' jest niezależna, lub w małym stopniu zależna od pH (pojęcie K_c' określono w dalszym rozdziale). Jeśli bezpośrednio pomiary w pH 7,0 są niewykonalne, należy podać wartości przeliczone na to pH, oraz dokładnie spisać procedurę, którą zastosowano przy obliczeniach. Należy zwrócić uwagę na odpo-

¹⁾ Określeniu „standardowa zmiana entalpii swobodnej” (a także „potencjał termodynamiczny”), przyjętemu w polskim słownictwie, odpowiada anglosaskie określenie „standard Gibbs energy change” — standardowa zmiana energii Gibbsa. Jest to poprawne określenie wielkości, nazywanej dawniej standardową zmianą energii swobodnej Gibbsa, lub po prostu zmianą energii swobodnej, której to przydano symbol ΔF° .

²⁾ Zalecaną jednostką stężenia jest mol·dm⁻³. W piśmiennictwie biochemicznym oznacza się ją powszechnie symbolem M.

wiednie zbuforowanie roztworu, tak aby wartość pH była ściśle określona w czasie całego doświadczenia. Jest rzeczą pożądaną, aby sprawdzić wpływ zmiany rodzaju i stężenia buforu dla określenia wpływu stosowanego buforu. Należy unikać buforów, które reagują z innymi reaktantami (włączając w to związki wysokocząsteczkowe) lub solami, takimi jak fosforany lub pirofosforany w obecności jonów metali dwuwartościowych.

Kompleksowanie jonów

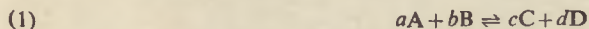
Stałe równowagi tworzenia kompleksów jonów z reaktantami, jak na przykład jonu magnezowego ze związkami fosforowymi należy oznaczać w warunkach doświadczenia, zaś stężenia reaktantów należy skorygować z uwzględnieniem kompleksowania. Jeśli jest to niewykonalne, istnieją trzy możliwości:

- iony metali, niezbędne dla aktywacji dla osiągnięcia równowagi, lecz na tyle niskich, aby nie zmieniały widocznie stężeń reaktantów przez ich kompleksowanie.
- można przeprowadzać pomiary w takich stężeniach jonów metali, w których jeden (lub więcej) z reaktantów występuje całkowicie w postaci skompleksowanej, zaś stopień skompleksowania pozostałych reaktantów jest nieznaczący, tzn. wyznacza się stałą równowagi i standardową zmianę entalpii swobodnej reakcji w którą wchodzi skompleksowany związek.
- można przeprowadzać pomiary w warunkach fizjologicznych aby uzyskać stałe równowagi i standardowe zmiany entalpii swobodnej, które da się bezpośrednio odnieść do układów biologicznych.

W każdym razie należy określić jeśli to możliwe dokładnie stężenia jonów metali i podać stałe równowagi odpowiednio do jednej z trzech wymienionych sytuacji: dla nieskompleksowanych reaktantów, reaktantów całkowicie skompleksowanych (np. $Mg \cdot ATP$) i w warunkach fizjologicznych. Ze względu na to, że dane o stałych równowagi kompleksowania jonów są trudno dostępne, a niekiedy niepewne, jest rzeczą pożądaną, aby oznaczać bezpośrednio wpływ zmian stężenia jonów metali w stosowanych warunkach doświadczalnych. Niekiedy może wyniknąć potrzeba nanoszenia poprawek na kompleksowanie reaktantów za pomocą metod ekstrapolacji, albo też należy stosować specjalne warunki doświadczalne, aby uniknąć kompleksowania reaktantów ze składnikami środowiska reakcji. Na przykład można stosować chlorek tetrametyloaminiowy zamiast chlorku potasowego w pomiarach prowadzonych w obecności polifosforanów lub innych polianionów, tworzących kompleksy z jonami metali alkalicznych.

Rozważania ogólne o przedstawianiu danych dotyczących równowagi

Rozważmy następującą reakcję



gdzie a , b , c i d są stechiometrycznymi współczynnikami składowych A , B , C i D . W tym przypadku stała wyrażona przez stężenia (stała stężeniowa) to:

$$(2) \quad K_c = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

a standardowa zmiana entalpii swobodnej (potencjału termodynamicznego, energii swobodnej Gibbsa)³⁾ to:

³⁾ Z równania 3 wynika, że równowaga o której mowa odnosi się do roztworów „idealnie rozcieńczonych”, w których współczynniki aktywności wszystkich reaktantów i produktów są niezależne od stężenia w rozpatrywanym zakresie stężeń. Mimo, że trudno oczekiwać pełnego spełnienia tego postulatu w badanym układzie, w praktyce okazuje się, że w układach biochemicznych ΔG° jest często wielkością stałą, w granicach błędu doświadczalnego. Z tego powodu, zdając sobie sprawę z nieścisłości określenia, nazywamy tę wielkość „standardową zmianą en-

$$(3) \quad \Delta G_c^\circ = -RT \ln K_c$$

gdzie [A], [B] etc, to stężenia poszczególnych związków biorących udział w reakcji, R jest stałą gazową, a T — temperaturą termodynamiczną.

Woda jako reaktant w rozcieńczonych roztworach wodnych stanowi specjalny problem. Aby być zgodnym z ogólnymi zasadami dotyczącymi roztworów rozcieńczonych przyjmuje się, że czynnik H₂O w wyrażeniach równowagi jest równy 1 (patrz ostatni paragraf części pierwszej).

W pewnych przypadkach wiadomo, że na opisane stężenie składnika składa się kilka odrębnych rodzajów cząsteczek (np. [C] jest to [CH₃COOH] + [CH₃COO⁻]), jednak mamy zbyt mało informacji na dokładniejszy opis stanu równowagi. Na przykład w układzie buforowanym nie zawsze można określić udział jonów H⁺ w każdym z możliwych stanów równowagi. Jeśli jednak uda się utrzymać stałe stężenie jonów wodorowych, można napisać pozorną stałą równowagi K'_c, w której wyrażenie [H⁺] nie występuje explicite. Taka pozorna stała równowagi na ogół ma inną wartość niż K_c (równanie 2) i w przeciwieństwie do niej jest zależna od pH. K'_c można opisać za pomocą całkowitych stężeń mierzalnych składników

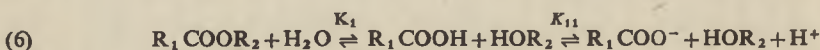
$$(4) \quad K'_c(\text{pH} = x, \text{ itp}) = \frac{[C_1 + C_2 + \dots]^c [D_1 + D_2 + \dots]^d}{[A_1 + A_2 + \dots]^a [B_1 + B_2 + \dots]^b}$$

a standardową zmianę entalpii swobodnej w postaci:

$$(5) \quad \Delta G_c'(\text{pH} = x, \text{ itp}) = -RT \ln K'_c$$

Wielkość K'_c podlega również innym uwarunkowaniom. Aby dobrze określić jej wartość należy dokładnie ustalić i podać wartość pH, a niekiedy i stężenie jonów metali oraz inne czynniki. Wartości te należy przytoczyć, jak ustalono powyżej, ale czynniki te nie pojawiają się wprost wśród składników po prawej stronie równania 4. W opisach biochemicznych zwykle można opuszczać indeks c w symbolu K_c. Jednakże zaleca się, aby nigdy nie opuszczać określenia „pozorna” w odniesieniu do K'_c i G'_c.

Prosty przykład może pomóc w wyjaśnieniu sytuacji. Rozważmy następującą reakcję:



Stężeniowe stałe równowagi oraz standardowe zmiany entalpii swobodnej etapu I i II wyrażają się jak następuje:

$$(7) \quad K_1 = \frac{[R_1 \text{ COOH}][\text{HOR}_2]}{[R_1 \text{ COOR}_2][\text{H}_2\text{O}]}$$

$$(8) \quad \Delta G_1^\circ = -RT \ln K_1$$

Ponieważ w rozcieńczonych roztworach wodnych czynnik dla wody przyjmuje się za 1, w równaniach równowagi takich układów można go opuścić.

$$(9) \quad K_{11} = \frac{[R_1 \text{ COO}^-][\text{HOR}_2][\text{H}^+]}{[R_1 \text{ COOH}][\text{HOR}_2]} = \frac{[R_1 \text{ COO}^-][\text{H}^+]}{[R_1 \text{ COOH}]}$$

$$(10) \quad \Delta G_{11}^\circ = -RT \ln K_{11}$$

entalpii swobodnej”. Ponadto należy zdawać sobie sprawę z tego, że argument logarytmu (np. K_c w równaniu 3) musi być bezwymiarowy. W przypadku stężeniowej stałej równowagi uzyskuje się to dzięki stosowaniu „względnych stężeń”, tzn. stężenia podzielonego przez stężenie standardowe. Postępowanie takie jest ważne teoretycznie, ale w praktyce może być ominięte. Należy jednak dokładnie opisać standardowe jednostki stanu stężenia przy podawaniu takich wartości.

Stężeniowa stała równowagi i standardowa zmiana entalpii swobodnej dla ogólnej reakcji są równe:

$$(11) \quad K = \frac{[R_1 \text{COO}^-][\text{HOR}_2][\text{H}^+]}{[R_1 \text{COOR}_2]} = K_1 K_{11}$$

$$(12) \quad \Delta G^\circ = -RT \ln K$$

Pozorną stałą równowagi w pewnych $\text{pH} = x$ można przedstawić wzorem, w którym stężenie $R \text{COO}^-$ i $R \text{COOH}$ są potraktowane łącznie, bez ich rozróżniania.

$$(13) \quad K'(\text{pH} = x) = \frac{[R_1 \text{COO}^-] + [R_1 \text{COOH}][\text{HOR}_2]}{[R_1 \text{COOR}_2]}$$

Odpowiadająca tej stałej standardowa zmiana entalpii swobodnej ma wtedy wyrażenie:

$$(14) \quad \Delta G^{\circ'}(\text{pH} = x) = -RT \ln K$$

W przypadkach, gdy równowagi chemiczne są znane w szczegółach, przekształcenia wzajemne K i K' są ogólnie rzecz biorąc proste. W przypadku wyżej opisanego przykładu będziemy mieli:

$$(15) \quad [R_1 \text{COOH}] = \frac{[R_1 \text{COO}^-][\text{H}^+]}{K_{11}}$$

oraz

$$(16) \quad K'(\text{pH} = x) = [R_1 \text{COO}^-](1 + [\text{H}^+]/K_{11})[\text{HOR}] = K \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{11}}\right) \cdot \frac{1}{[\text{H}^+]}$$

Standardowa zmiana entalpii swobodnej dla reakcji hydrolizy ATP na ADP i fosforan nieorganiczny (P_i) stanowi bardziej złożony przykład relacji między stężeniową a pozorną stałą równowagi. Reakcję sumaryczną możemy zapisać następująco:



Pozorna stała równowagi i ΔG^0 przy pewnym określonym pH przyjmują postać:

$$(17) \quad K' = \frac{[\text{całkowity ADP}][\text{całkowity } P_i]}{[\text{całkowity ATP}]}$$

$$(18) \quad G^{\circ'} = -RT \ln \frac{[\text{całkowity ADP}][\text{całkowity } P_i]}{[\text{całkowity ATP}]}$$

Istnieją dane, pozwalające zmienić stałe pozorne na stężeniowe. Aby rozpatrywać te związki fosforowe w środowisku pokrewnym biologicznemu należy rozważyć ich oddziaływania z protonami i jonami magnezu. Przy wartościach pH bliskich 7 i w fizjologicznych stężeniach magnezu, każdy z występujących składników fosforanowych można opisać za pomocą jednej dysocjacji kwasowej, a każdy kwas i sprzężona z nim zasada może wiązać jeden jon Mg^{2+} . Całkowite stężenia, występujące w K' i $\Delta G^{\circ'}$ można wtedy rozpisać jak następuje:

$$(19) \quad [\text{całkowity ATP}] = [\text{ATP}^{4-}] + [\text{ATP}^{3-}] + [\text{ATPMg}^{2-}] + [\text{ATPMg}^-]$$

$$(20) \quad [\text{całkowity ADP}] = [\text{ADP}^{3-}] + [\text{ADP}^{2-}] + [\text{ADPMg}^-] + [\text{ADPMg}]$$

$$(21) \quad [\text{całkowity } P_i] = [P_i^{2-}] + [P_i^-] + [P_i \text{Mg}] + [P_i \text{Mg}^+]$$

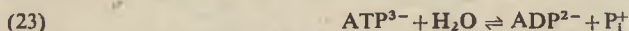
Czynnik $[P_i \text{Mg}^+]$ zawsze jest niewielki, a więc mało istotny, zaś $[P_i \text{Mg}]$ nie odgrywa większej roli.

Znany trzy wartości $\text{p}K_a$, po jednej dla każdego ze związków: ATP, ADP i P_i , podobnie jak i ich stałe asocjacji z jonami Mg^{2+} . Możemy więc rozpisać reakcję

w kryteriach zależności między oddzielnymi rodzajami reaktantów i produktów. Na przykład w przypadku końcowym, kiedy pH jest wysokie (> 8), a $[Mg^{2+}] = 0$, dominującą reakcją staje się:



Reakcję tę można równie dobrze przedstawić równaniem:



lub każdym innym z możliwych, pod warunkiem, że są one poprawne pod względem ogólnego ładunku i stechiometrii. Stałe równowagi wszystkich tych reakcji muszą być niezależne od pH, bez względu na to czy jon H^+ wchodzi w reakcję jawnie, czy też nie. Sformułowanie takich stałych równowagi nie implikuje niczego dotyczącego mechanizmu reakcji w tym a nie innym przypadku.

Jeżeli omawianą reakcję zapiszemy w kategoriach równania 22, otrzymamy:

$$(24) \quad K_{ATP}^{\pm} = \frac{[ADP^{3-}][P_1^{2-}][H^+]}{[ATP^{4-}]}$$

W krańcowym przypadku, gdy $[Mg^{2+}] = 0$, reakcję między K' (równanie 17) i K_{ATP}^{\pm} (równanie 24) można przedstawić następująco:

$$(25) \quad K'(\text{pH} = x, [Mg^{2+}] = 0) = \frac{([ADP^{3-}] + [ADP^{2-}])([P_1^{2-}] + [P_1^+])}{([ATP^{4-}] + [ATP^{3-}])} = \\ = K_{ATP}^{\pm} \frac{(1 + [H^+]/K_{\beta})(1 + [H^+]/K_{\gamma})}{(1 + [H^+]/K_{\alpha})[H^+]}$$

gdzie K_{α} , K_{β} , K_{γ} to stałe dysocjacji kwasowej ATP^{3-} , ADP^{2-} , i P_1 odpowiednio. Ponieważ znamy wszystkie stałe w równaniu 25, przeto pozorna stała równowagi równania 17 jest w sposób widoczny powiązana z niezależną od pH stałą K_{ATP}^{\pm} . W obecności jonów Mg^{2+} analiza powyższa jest zasadniczo podobna, lecz jest ona bardziej złożona w szczegółach. Dogłębną analizę tego problemu można znaleźć w pracy Alberta (3).

Zauważmy, że użyteczność równania 17 polega na tym, że można analitycznie oznaczyć stężenia ATP, ADP i P_1 bez rozróżniania odrębnych form, wymienionych w równaniach 19—21.

Zalecamy, aby stężeniowe stałe równowagi i odpowiadające im standardowe zmiany entalpii swobodnej podawać tylko wówczas, gdy reakcje leżące u ich podstaw mogą być opisane w sposób wyczerpujący i dokładny. W przypadkach, gdy nie jest to możliwe, można podawać odpowiednie wartości pozorne, możliwie w szerokim zakresie pH i innych istotnych zmiennych. W każdym jednak przypadku podanym wartościom musi towarzyszyć dokładne określenie przyjętego schematu reakcji.

Wielkości

Zaleca się, aby podawać wartości stałych równowagi i standardowych zmian entalpii swobodnej w oparciu o stężenia (ilość substancji podzielona przez objętość, wyrażona w molach na decymetr sześcienny), z wyjątkiem czynnika protonowego, wody w układach wodnych, w których uczestniczy ona jako reaktant lub produkt, oraz gazów i ciał stałych. Dla specjalnych celów może okazać się pożądanym podawanie dodatkowych wartości opartych na wielkościach takich jak molalność, frakcje molarne lub ciśnienie parcjalne. W każdym przypadku jednostki należy jasno określić. Należy unikać używania stałych równowagi opartych na stężeniach takich jak mili- lub mikromole na decymetr sześcienny (litr).

Zaleca się, aby w rozcieńczonych roztworach wodnych, w przypadku gdy brak jest pomiarów względnej aktywności wody, czynnik odpowiadający stężeniu wody przyjmować za 1.

Rzeczywiste stężenie wody, przyjmowane umownie za $55,5 \text{ mola} \cdot \text{dm}^{-3}$, winno być używane tylko dla ciekłej wody dla wyraźnie określonych celów.

Czynnikowi protonowemu należy nadać wartość $10^{-\text{pH}}$. Ustalenia przyjęte odnośnie wody i czynnika protonowego należy zawsze jasno określić. Ciśnienie parcjalne gazów powinno być podawane w atmosferach, lub (jeśli ciśnienie parcjalne ma być wyrażane w kilopaskalach jako stosunek ciśnienia parcjального do $101,325 \text{ kPa}$). Entalpia swobodna powinna być podawana w dżulach na $\text{mol} / (\text{J} \cdot \text{mol}^{-1})$. Do czasu upowszechnienia tej jednostki można przedstawiać wyniki dodatkowo w kaloriach termochemicznych na mol ($1 \text{ cal}_{\text{th}} = 4,184 \text{ J}$).

CZĘŚĆ II. SYMBOLE, JEDNOSTKI I TERMINOLOGIA

Uwagi ogólne

Wartość przedstawionej pracy, jej zrozumiałość i precyzja stwierdzeń wzrosną niepomniernie, jeśli użyte symbole, jednostki i terminologia będą zgodne z zaleceniami międzynarodowej komisji standardyzacyjnej. Informacja, którą poniżej przedstawiamy jest podsumowaniem zaleceń międzynarodowych ciał naukowych dyscyplin fizycznych i pomiarowych. Wybrano je ze szczególnym uwzględnieniem termodynamiki procesów biologicznych. Bardziej szczegółowy wykaz zalecanych symboli wielkości fizykochemicznych oraz ich terminologię, wraz z dyskusją słownictwa Międzynarodowego Układów Jednostek (SI) znaleźć można w publikacji IUPAC(4). Nomenklatura SI jest też zalecana przez Międzynarodową Organizację Standaryzacyjną (ISO), która określiła reguły jej używania (5).

Przepisy stosowania układu SI są też publikowane przez Międzynarodowe Biuro Miar i Wag (6). Można je też znaleźć w polskim piśmiennictwie i zarządzeniach Centralnego Urzędu Jednostek i Miar (7, 8, 9).

W nawiązaniu do tych zaleceń, zobowiązuje się autorów przedstawiających wyniki swych badań do:

1. gdy tylko jest to możliwe, używania zalecanej nazwy każdej wielkości fizycznej, oraz jej symbolu,
2. używania jednostek układu SI wraz z odpowiednimi, ogólnie akceptowanymi symbolami (4—9),
3. określając substancję, stan fizyczny i temperaturę, do której odnosi się dana wielkość, należy podawać szczegółowy zapis warunków zamiast dodatkowych indeksów w frakcji dolnej i górnej, np. przy opisie procesu reakcji 1.

$$\Delta G_i' (\text{pH} = 7,0, I_c = 0, 10 \text{ mola} \cdot \text{dm}^{-3}, \text{ przy } 25^\circ\text{C})$$

lub substancji rozpuszczonej:

$$C_p (\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}, \text{ w } \text{H}_2\text{O}, 25^\circ\text{C})$$

4. Zaleca się podawanie zarówno wartości liczbowych jak i jednostek wielkości fizycznych występujących w tekście, na osiach współrzędnych wykresów, w rzędach i kolumnach tabel.

W tekstach preferuje się następujący sposób zapisu: wielkość fizyczna = wielkość liczbowo·jednostka

np.

$$\Delta G_i' (\text{pH} = 7,0, I_c = 0,10 \text{ mola} \cdot \text{dm}^{-3}, \text{ przy } 25^\circ\text{C}) = -8,7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

W tabelach i wykresach należy stosować formę zapisu, otrzymaną przez przekształcenie podanego wyżej równania:

$$\text{wielkość fizyczna/jednostka} = \text{wartość liczbowo}$$

tzn. w równaniu: $\Delta G_i' / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} = -8,7$ lewa strona jest nagłówkiem, a prawa wartością liczbową, która ma być stabularyzowana. Jeśli używa się wyrażenia potęgo-

wego o podstawie 10, wykładnik podstawowy powinien być przedstawiony w sposób poprawny, łącznie z odpowiednimi jednostkami (tzn. $\Delta G/J \cdot \text{mol}^{-1} = -0,087 \times 10^{-5}$, lub $\Delta G/10^{-5} \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} = -0,087$, lub w innej algebraicznie poprawnej formie).

Wielkości wyrażone w jednostkach innych niż SI powinny być ujmowane w nawiasy (używa się ich jeśli mogą pomóc w rozumieniu tekstu). Jest to o tyle istotne, że powszechnie używa się jednostek innych niż SI dla pewnych wielkości, np. kalorie i atmosfery. Każdą z takich wielkości należy dodatkowo określić w jednostkach SI.

Symbole wielkości fizycznych powinny być drukowane kursywą lub podkreślone w maszynopisie, symbole jednostek należy drukować normalną czcionką.

Użycie tych zaleceń pokazano poniżej na przykładzie specjalnych zastosowań w pomiarach termodynamicznych.

Nie zamierzamy tu omawiać tych wszystkich nazw i symboli wielkości fizycznych, które dostatecznie jasno podano w odnośnikach. Zajmiemy się omówieniem takich wielkości, w stosunku do których zalecenia Komisji Międzynarodowej odbiegają od ustalonych praktyk.

Temperatura

Temperatury termodynamiczne oraz różnice temperatur wyraża się w kelwinach (symbol K), a nie w stopniach Kelwina ($^{\circ}\text{K}$). Temperatury i różnice temperatur wyrażane w stopniach Celsjusza mają symbol $^{\circ}\text{C}$.

Ciśnienie

Jednostką ciśnienia jest paskal, określający parcie z siłą jednego niutona na metr kwadratowy ($1 \text{ Pa} = 1 \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$). Wygodną jednostką w wielu pomiarach ciśnienia jest kilopaskal (kPa). Pracujący w dziedzinie termodynamiki powinni wiedzieć że wielkość pV , powszechnie stosowana w termodynamice określa energię i jeśli p jest wyrażone w paskalach, a V w metrach sześciennych, to iloczyn pV jest wielkością wyrażoną w dżulach. Stosując kombinacje zwyczajowych jednostek, innych niż SI nie uda się uniknąć współczynników przeliczeniowych. Należy unikać powszechnie stosowanych jednostek takich jak mm Hg, tory lub ich wielokrotności. Odnosi się to również do jednostek tak niezgrabnych jak litroatmosfera.

Standardowa atmosfera jest zdefiniowana jako 101,325 paskali ($1 \text{ atm} = 101,325 \text{ kPa}$). Jednostka ta nie należy do układu SI. Podczas obliczania stałych równowagi i standardowych funkcji termodynamicznych w oparciu o pomiary ciśnienia, akceptowaną jednostką standardową jest 101,325 kPa, często nazywaną atmosferą.

Energia

Pomiary energii, włącznie ze wszystkimi pomiarami cieplnymi powinny być podawane w dżulach (J), kilodżulach (kJ) lub milidżulach (mJ). Autorzy, którzy wyrażają energię w kaloriach termochemicznych (cal_{th}) ich wielo- lub podwielokrotnościach, powinni podawać współczynnik przeliczeniowy ($1 \text{ cal}_{\text{th}} = 4,184 \text{ J}$). Nie należy używać „odżywczych” ani „dużych” kalorii o stosowanym czasem symbolu Cal, równym 1 kilokalorii, które mają zastosowanie tylko w specjalnych dziedzinach. Inne określenia kalorii mają znikome znaczenie w biochemii i termochemii. Autorzy powinni sobie zdać sprawę z tego, że wobec rozpowszechnienia układu SI stosowanie kalorii jako jednostek nie ma przyszłości i niebawem zajdzie potrzeba przekształcenia danych podawanych w kaloriach.

Jeśli chodzi o inne jednostki, odsyłamy zainteresowanych do odpowiednich zaleceń (4–9).

Skład roztworów

W badaniach termodynamicznych skład roztworu opisuje się za pomocą pojęć

takich jak stężenie molalność lub frakcja molowa. Inne pojęcia jak frakcja masowa lub objętościowa mogą być stosowane tylko w specjalnych przypadkach. Każde z tych pojęć należy dokładnie określić, a używane roztwory opisać w sposób jednoznaczny, używając właściwych jednostek.

Stężeniem substancji rozpuszczonej B jest ilość (moli) tej substancji podzielona przez objętość roztworu. Jako symbol tej wielkości przyjęto c_B lub $[B]$. Wygodną jednostką stężenia jest $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Stężenie określa się niekiedy mianem „molarności”. Roztwór o stężeniu $0,1 \text{ mola}\cdot\text{dm}^{-3}$ zwany jest roztworem $0,1$ molarnym lub $0,1 M$. Ponieważ pojęcie „molarności” i jednostkę M można mylić z molalnością, zaleca się używać określenie „stężenie” wraz z odpowiadającą mu jednostką $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Stężeniem masowe rozpuszczonej substancji B jest to masa B podzielona przez objętość roztworu. Przyjętym symbolem tej wielkości jest ρ_B , a odpowiadającą mu jednostką $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$.

Molalność rozpuszczonej substancji B jest to ilość B (w molach) podzielona przez masę rozpuszczalnika. Za symbol przyjęto m_B , a za odpowiadającą mu jednostkę $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$. Roztwór o molalności równej $0,1 \text{ mola}\cdot\text{kg}^{-1}$ nazywamy niekiedy roztworem $0,1$ molalnym lub roztworem $0,1 m$.

Ze względu na możliwe pomyłki przy używaniu określeń „molarny” i „molalny”, a także i to że „m” jest symbolem metra zaleca się stosowanie jednostki $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Frakcja molowa substancji B jest to ilość (moli) substancji B w roztworze, podzielona przez całkowitą ilość (moli) wszystkich substancji w roztworze. Przyjętym symbolem tej wielkości jest x_B lub y_B , gdzie x_B lub $y_B = n_B/(\sum n_i)$. Jest to wielkość bezwymiarowa.

Funkcje stanu

Przy określaniu wielkości energii, związanych z funkcjami stanu substancji należy dołożyć starań, aby używać ściśle określonych funkcji i zalecanych symboli energii wewnętrznej (U), entalpii (H), entalpii swobodnej (G), entropii (S) i pojemności cieplnej (C).

Określenia „ciepło” nie należy używać w stosunku do termodynamicznych funkcji stanu. Tak więc zamiast „zawartość cieplna” występuje „entalpia” a zamiast „ciepło tworzenia” — „entalpia tworzenia”. Wyjątkiem jest „pojemność cieplna”, dla której nie znaleziono alternatywnej nazwy. Określenie „właściwa pojemność cieplna” odnosi się tylko do pojemności cieplnej na jednostkę masy. Należy unikać określenia „ciepło właściwe”. Odpowiadającą mu wielkością molową jest molowa pojemność cieplna.

Przyjętemu w polskiej terminologii określeniu „energia swobodna” ($A = U - TS$) odpowiada w piśmiennictwie anglosaskim określenie „energia Helmholtza” a polskiemu określeniu „entalpia swobodna” ($G = H - TS$) odpowiada określenie „energia Gibbsa”.

Jednostkami tych ekstensywnych wielkości są dżule (J), wielkości właściwych dżule na kilogram ($J\cdot\text{kg}^{-1}$), a wielkości molowych dżule na mol ($J\cdot\text{mol}^{-1}$). Jednostkami entropii, ekstensywnej wielkości o symbolu S są dżule na kelwin ($J\cdot\text{K}^{-1}$). Entropii właściwej odpowiada jednostka dżul na kilogram na kelwin ($J\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), zaś molowej entropii dżul na mol na kelwin ($J\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$).

Stałe równowagi

Najlepiej byłoby podawać termodynamiczną stałą równowagi w oparciu o aktywności składników reagujących. Jednakże w większości badań biochemicznych nie zawsze jest to wykonalne. Dlatego należy stosować się do zaleceń dotyczących obliczania i podawania stałych równowagi i zmian entalpii swobodnej, które podano

w poprzednim rozdziale. Symbole oznaczające wielkości fizyczne powinny różnić się od symboli jednostek. Symbol K (stała równowagi) powinien być drukowany kursywą, w maszynopisie zaś podkreślany, aby odróżnić go od symbolu oznaczającego kelwin, K , który powinien być drukowany normalną czcionką.

Pomiary elektrodowe

Ustalenia dotyczące znaków różnic potencjałów elektrycznych, sił elektromotorycznych i potencjałów elektrodowych opisano w odsyłaczu 4 (rozdział 9). Są one niekiedy nazywane Umowami Sztokholmskimi. Autorzy powinni ściśle przestrzegać tych ustaleń. Zgodnie z nimi, kierunek pisania reakcji chemicznej, kolejność wyszczególniania elementów ogniwa elektrolitycznego oraz oznakowanie siły elektromotorycznej ogniwa (E) powinno być zgodne z następującymi regułami:

1. Reakcje zachodzące w ogniwie powinny być zapisywane z lewa na prawo w taki sposób, aby dla reakcji przebiegającej w tym kierunku ładunek elektryczny dodatni również był przenoszony z lewej na prawą stronę ogniwa. Różnica potencjałów elektrycznych jest przy tym równa co do wielkości i znaku potencjałowi elektronowemu elektrody prawej, zmniejszonemu o wartość potencjału elektrody lewej.
2. Potencjał elektryczny elektrody (półogniwa) jest siłą elektromotoryczną ogniwa, w którym elektrodą prawą jest elektroda dana, a lewą — standardowa elektroda wodorowa. Bardziej dodatnia siła elektromotoryczna oznacza większy potencjał oksydacyjny.

Tabele zbiorcze

Tabela I(a).

Wyrażenia termodynamiczne, występujące w przedstawionych zaleceniach

[A]	stężenie A
γ_B	współczynnik aktywności substancji B (w oparciu o stężenie)
a_B	aktywność względna rozpuszczonej substancji B (uwaga: $a_B = \gamma_B [B]$)
I	siła jonowa ($I_C = 1/2 \sum c_i z_i^2$, $I_m = 1/2 \sum m_i z_i^2$), gdzie c_i jest stężeniem danego jonu, m_i jego molalnością, a z_i jego ładunkiem. S określa liczbę występujących rodzajów jonów.
K_c	niezależny od pH iloczyn stężeń równowagowych (stężeniowa stała równowagi)
K	termodynamiczna stała równowagi
$K'(\text{pH} = x \text{ itp})$	zależny od pH, pozorny iloczyn zsumowanych stężeń równowagowych, zależny od stężenia innych wyszczególnionych reagentów (pozorna stała równowagi)
ΔG_c°	Standardowa zmiana entalpii swobodnej, odpowiadająca iloczynowi stężeń równowagowych, niezależnemu od pH
$\Delta G_c^\circ(\text{pH} = x)$	Standardowa pozorna zmiana entalpii swobodnej odpowiadająca pozornemu iloczynowi stężeń równowagowych w roztworze buforowanym o określonym pH ($\Delta G_c^\circ = -RT \ln K_c$)
ΔF	uprzednio rozpowszechniony symbol oznaczający zmiany energii swobodnej. Obecnie wielkość ta nazywana jest poprawnie zmianą entalpii swobodnej i oznaczana symbolem ΔG .
ΔF°	patrz ΔF , ΔG° , ΔG°
ΔS	zmiana entropii
ΔH	zmiana entalpii
C_p	pojemność cieplna przy stałym ciśnieniu

Tabela I zawiera wykaz funkcji termodynamicznych, o których traktuje zasadniczy tekst zaleceń. Podano tu również odpowiadające tym funkcjom jednostki, niektóre zależności między nimi oraz uwagi o zalecanych warunkach praktycznego korzystania z nich. Tabela II zawiera niektóre spośród jednostek układu SI wraz z odpowiadającymi im symbolami.

Jednostkami zmiany entalpii molowej oraz zmian molowej entalpii swobodnej są zwykle dżule na mol ($J \cdot mol^{-1}$) lub kilodżule na mol ($kJ \cdot mol^{-1}$) lecz rodzaj używanych jednostek trzeba w każdym przypadku określić.

Dla określonych celów, zmiany wymienionych wyżej wielkości termodynamicznych można wyrażać w przeliczeniu na jednostkę masy danego reaktantu lub produktu (dżule na kilogram, $J \cdot kg^{-1}$).

Jednostką zmian entropii w poszczególnych procesach jest zazwyczaj dżul na mol na kelwin ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$), lecz i tutaj trzeba w każdym przypadku określić rodzaj stosowanych jednostek. Dla celów szczególnych zmiany entropii właściwej mogą być podawane w przeliczeniu na jednostkę masy danego reaktantu lub produktu, tzn. w dżulach na kilogram na kelwin ($J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$), lub też można je podawać jako zmiany entropii całkowitej, której jednostką jest dżul na kelwin ($J \cdot K^{-1}$).

Jednostki bezwzględnej entropii i pojemności cieplnej są takie same jak jednostki zmian entropii ($J \cdot K^{-1}$, $J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$ lub $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$), jednakże odnoszą się one nie tyle do samego procesu, ile do poszczególnych substancji lub ich agregatów.

Tabela I(b),

Zestawienie niektórych omawianych symboli i zaleceń

Wielkość	Pozorna wartość przy $pH = \text{const } (x)$	Wartość niezależna od pH
Stała równowagi ^{a)}	K'_c	K_c
Standardowa molowa zmiana entalpii swobodnej ^{b)}	$\Delta G^{o'}$ ($pH = x$)	ΔG^o
Stężenie reaktantu A	[A] całkowite	[A]

a) w przybliżeniu stały iloraz stężeń równowagowych

b) formalnie wyliczona ze stałej równowagi

Zalecenia odnośnie czynników występujących w wyrażeniach opisujących stałe równowagi.

W przypadkach, kiedy woda jest reaktantem lub produktem należy podać, czy użyto dla wody współczynnika 1, czy liczbę 55, 5, lub inną.

Podać, czy używa się 10^{-pH} czy też jakąś inną miarę czynnika jonów wodorowych. pH jest wystarczająco dokładną miarą stężenia lub aktywności jonów wodorowych.

Zalecane warunki pomiarów		
Temperatura t (lub T)	Warunki podstawowe 25°C (298,15 K) (także, zmiany t)	Warunki dodatkowe 37° (310, 15 K) (także, zmiany t)
Siła jonowa $I/mol \cdot dm^{-3}$	0,1 (doprowadzona za pomocą KCl)	0,1 (doprowadzona za pomocą KCl)
Stężenie jonów wodorowych	$pH = 7,0$	
Stężenie buforu	najniższe efektywne	

Niektóre zależności termodynamiczne:

$$\Delta U = Q + W$$

$$\Delta H = \Delta U + p\Delta V$$

$$\Delta H = H(T_2) - H(T_1) = \int c_p dT$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

I-sze prawo termodynamiki. Przyrost energii wewnętrznej układu jest sumą ciepła dostarczonego do tego układu oraz pracy włożonej w układ. W warunkach, gdy układ znajduje się pod stałym ciśnieniem, wzrost entalpii układu (ΔH) jest wynikiem wzrostu jego energii wewnętrznej (ΔU) oraz pracy wykonanej przez układ ($p\Delta V$).

W układzie pod stałym ciśnieniem, do którego doprowadza się energię przyrost entalpii jest całą z C_p w przedziale wywołanych zmian temperatury.

Przyrost entalpii swobodnej układu (ΔG) w stałej temperaturze jest to przyrost jego entalpii (ΔH) pomniejszony o przyrost $T\Delta S$.

Jednostkami ekstensywnej wielkości jaką jest energia całkowita są dżule (J), energii molowej — dżule na mol ($J \cdot mol^{-1}$), a energii właściwej — dżule na kilogram ($J \cdot kg^{-1}$).

Tłumaczył Krystian Kaletha

Tabela II

Wielkości fizyczne, jednostki i ich symbole w układzie SI

	nazwa jednostki	symbol jednostki
a) jednostki podstawowe		
długość	metr	m
masa	kilogram	kg
czas	sekunda	s
natężenie prądu	amper	A
temperatura	kelwin	K
ilość substancji	mol	mol
światłość	kandela	cd
b) jednostki pochodne (przykłady)		
siła	niuton	$N(kg \cdot m \cdot s^{-2})$
ciśnienie	paskal	$Pa(N \cdot m^{-2})$
energia	dżul	$J(kg \cdot m^2 \cdot s^{-2})$
moc	wat	$W(J \cdot s^{-1})$
ładunek elektryczny	kulomb	$C(A \cdot s)$
różnica potencjału elektrycznego	wolt	$V(J \cdot A \cdot s^{-1})$
oporność elektryczna	om	$\Omega(V \cdot A^{-1})$
częstotliwość	herc	$Hz(s^{-1})$
powierzchnia	metr kwadratowy	m^2
objętość	metr sześcienny	m^3
gęstość	kilogram na metr sześcienny	$kg \cdot m^{-3}$

c.d. tabeli II

c) przedrostki					
mnożnik	przedrostek	symbol	mnożnik	mnożnik	symbol
10^{-1}	decy	d	10	deka	da
10^{-2}	centy	c	10^2	hekto	h
10^{-3}	mili	m	10^3	kilo	k
10^{-6}	mikro	μ	10^6	mega	M
10^{-9}	nano	n	10^9	giga	G
10^{-12}	piko	p	10^{12}	tera	T
10^{-15}	femto	f	10^{15}	peta	P
10^{-18}	atte	a	10^{18}	exa	E

PIŚMIENNICTWO

1. Guide for the presentation in the primary literature of numerical data derived from experiments. *CODATA Bulletin*, 9, grudzień 1973.
2. A guide to procedures for the publication of thermodynamic data (1972), *J. Chem. Thermodynamics*, 4, 511—520, (1972) *Pure Appl. Chem.*, 29, 395—407.
3. Alberty, R. A., (1969), *J. Biol. Chem.*, 244, 3920.
4. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). McGlashan M. L., (1979) Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units, Buttenworth and Co, London, Toronto (SBN-408 89350 8), (1970) *Pure Appl. Chem.* 21, 3—44, Revision, Paul M. A. (1975) Butterworth and Co, London (ISBN 0 408 70671 6).
5. International Organization for Standardization (ISO). SI Units and recommendations for the use of their multiples and of certain other units. International Standard ISO-1000. I wyd. 1973-02-01, American National Standard Institute, New York. Także: International Standard ISO-31/0-1974 i ISO 31/I-XII/1969-1975).
6. Bureau International des Poids et Mesures (BIPM): Le système International d'Unités, 1970, OFFLLIB, 49 Rue Gay-Lussac, F75, Paris 5.
7. Monitor Polski nr 25/1971. Zarządzenie Prezesa CIJIM z dnia 17.4.1971, zmieniające Zarządzenia w sprawie ustalenia definicji i oznaczeń legalnych jednostek miar oraz ustalenia pochodnych jednostek miar i jednostek miar dopuszczonych przejściowo jako legalne.
8. Chmielewski H., Międzynarodowy Układ Jednostek Miar. PWSZ, Warszawa, 1973.
9. Lippert H., Jednostki SI w medycynie. PZWL, Warszawa, 1980.

RECENZJA

Wyodrębnienie białek i oznaczanie ich struktury pierwotnej

Barbara Rzeszotarska, Kornel Nowak

Wyższa Szkoła Pedagogiczna im. Powstańców Śląskich w Opolu

Opole, 1983, Tom I i II, 173 strony, cena 60 zł za każdy tom

Z uznaniem należy przyjąć pojawienie się zwartej monografii mającej w pierwszym rzędzie wartość dydaktyczną obejmującej w sposób oryginalny, i przejrzysty nowoczesne metody badania struktury i funkcji białek. Część pierwsza: Wyodrębnienie białek ze źródeł naturalnych zawarta w tomie I poświęcona jest omówieniu właściwości białek wykorzystywanych w procesach ich wyodrębnienia, metod izolowania białek globularnych z materiału biologicznego, oraz metod oczyszczania. Precyzyjnie omówiono w tym tomie najnowsze osiągnięcia techniki, wykorzystanie fizycznych, chemicznych i biologicznych własności białek celem ich izolowania i oczyszczania.

W drugim tomie, składającym się z dwóch części omówiono zasady jonowymiennej analizy składu aminokwasowego białek oraz chemicznej analizy sekwencji aminokwasów.

Zawarte w obu tomach rysunki, schematy i tabele sprawiają, że czytelnik z łatwością pojmuje nawet najbardziej złożone problemy.

Wartość tej monografii jest tym większa, że niejednokrotnie czytelnik po raz pierwszy spotyka zwięzłe omówienie metody, syntetyczne ujęcie oryginalnych prac metodycznych prezentujących nową metodę biochemiczną użytą do wyodrębnienia lub charakterystyki czy badania struktury białek.

Szkoda tylko, że szata graficzna jest raczej skromna.

Irena Kąkol

SPRAWOZDANIA

„Molecular Biology Now and Tomorrow, Thirty Years of DNA”

September 19—21, 1983

Boston Park Plaza Hotel and Towers, Boston, Mass. U.S.A.

Trzydzieści lat temu, 25 kwietnia 1953 roku, ukazała się w *Nature* publikacja J. D. Watsona i F. H. C. Cricka pt. „A Structure of Deoxyribose Nucleic Acid” (*Nature* 171, 737, 1953). Praca ta otworzyła nową epokę w nauce. Dla uczczenia tego faktu naukowa redakcja *Nature* zorganizowała w Bostonie w dniach 19—21 września 1983 r. konferencję nt. „Molecular Biology Now and Tomorrow. Thirty Years of DNA”. Była to zarazem pierwsza konferencja zorganizowana przez redakcję *Nature* w USA.

W przeciwieństwie do innych epokowych odkryć w nauce, których znaczenia często nie rozumiano w chwili odkrycia i których wpływ ujawniał się dopiero po wielu latach, określenie trzydzieści lat temu poprawnej struktury DNA niemal natychmiast doprowadziło do odpowiedzi na podstawowe pytania nurtujące badaczy od szeregu lat: jaka substancja stanowi materiał genetyczny komórki i jak ona działa. Szereg przewidywań na temat funkcjonowania materiału genetycznego wynikających ze struktury DNA zostało niemal natychmiast potwierdzonych eksperymentalnie. I tak przewidywany przez Watsona i Cricka mechanizm replikacji DNA (*Nature* 171, 964; 1953) został w niedługim czasie odkryty i przedstawiony w pracach Kornberga (1956) oraz Meselsona i Stahla (1958).

Zasugerowany przez Cricka i innych w 1961 r. kod trójkowy odszyfrowano na początku lat 60-tych. W tym samym czasie potwierdzono istnienie przekaźnika informacji genetycznej w postaci mRNA (Brenner i inni, 1961). Odkrycie tRNA w końcu lat 50-tych potwierdziło wcześniejszy postulat Cricka i Brennera zakładający istnienie adaptorów rozpoznających zarówno składniki białka, aminokwasy, jak i składniki kwasów nukleinowych, nukleotydy.

Wyjątkowa pozycja w dziejach odkryć naukowych jaką zajmuje odkrycie struktury DNA, stanowiła dostateczny powód zorganizowania drugiej konferencji dla upamiętnienia 30-tej rocznicy tego epokowego wydarzenia (J. Maddox, *Nature* 305, 177; 1983). Pierwsza konferencja na ten sam temat została zorganizowana przez redakcję *Nature* w Cambridge, England w kwietniu b. roku.

Program konferencji obejmował problemy struktury i replikacji DNA, ekspresji genów, różnicowanie komórkowe oraz zastosowanie nowych metod inżynierii genetycznej w medycynie. Doniesienia naukowe z tych dziedzin były przedstawione przez zaproszonych gości w formie wykładów. Wśród uczonych prezentujących ostatnie osiągnięcia biologii molekularnej było trzech laureatów nagrody Nobla (D. Baltimore, H. Temin, W. Gilbert). Obecni również byli J. D. Watson i F. H. C. Crick, autorzy odkrycia, któremu było poświęcone to sympozjum. Konferencję otworzył główny organizator, redaktor naczelny *Nature*, J. Maddox. Następnie J. D. Watson przedstawił w trakcie swojego około półgodzinnego wystąpienia najbardziej obiecujące kierunki badań w biologii molekularnej. Pierwsza sesja, której przewodniczył P. Doty, była poświęcona strukturze i replikacji DNA. A. Rich opisał nową, znaną dopiero od czterech lat strukturę DNA, w której DNA tworzy lewoskrętny heliks tzw. formę Z-DNA, i porównywał ją z prawoskrętnym modelem DNA, B-DNA znanym od 30 lat. Warto tu podkreślić, że Delbruck już w 1954 r., a więc wkrótce po opublikowaniu

przez Watsona i Crick'a modelu prawoskrętnego B-DNA sugerował możliwość istnienia DNA o lewoskrętnym heliksie.

Forma Z-DNA powstaje względnie łatwo z formy B-DNA w tych helikalnych odcinkach, które zawierają na przemian nukleotydy pirymidynowe i purynowe (AT lub GC). Formę Z-DNA stabilizują niektóre organiczne polikationy, np. spermina. Także metylacja reszt cytozyny w pozycji 5 w sekwencji $(GC)_n$ utrwała formę Z-DNA. Obecność Z-DNA stwierdzono w szeregu DNA bakterii, wirusów (np. SV40), również D. Melanogaster.

Ważnym było odkrycie białek wiążących się specyficznie z Z-DNA, lecz nie wiążących się z B-DNA. Mówiąc o możliwych funkcjach struktur Z-DNA, A. Rich przedstawił szereg danych z których wynika, że Z-DNA może występować we fragmentach genomu odpowiedzialnych za regulację ekspresji genu, m.in. w DNA intronów oraz w tzw. transcriptional enhancers, tj. fragmentach genomu stymulujących transkrypcję. J. Wang poświęcił swój wykład strukturze DNA wyższego rzędu, superspiralnej. Przedstawił on mechanizm zmiany stopnia skręcenia superspirali, rolę topoizomerazy I z *E. coli* w tym procesie oraz wpływ superspiralizacji DNA na transkrypcję. M. Ptashne omówił oddziaływania białka z DNA na przykładzie białka represorowego i DNA faga λ . Jest to obecnie jedyny układ, w którym poznano tak dokładnie molekularny mechanizm oddziaływania białko-DNA. M. Ptashne przedstawił m.in. komputerowe modele oddziaływania białka represora z DNA faga λ oraz rolę poszczególnych aminokwasów cząsteczki represora w tym oddziaływaniu.

Otwierając sesję poświęconą ekspresji genu, A. Rich zwrócił m.in. uwagę na fakt, że sekwencje kodujące stanowią 60—70% genomu *E. coli* podczas, gdy u eukariontów zajmują one zaledwie 3—5% genomu. Rola tej tak dużej ilości niekodującego DNA u eukariontów jest wciąż jeszcze niejasna, ale powoli zaczyna się ujawniać związek między strukturą a ekspresją i ewolucją genów. Cztery następne wykłady poświęcone były właśnie tym problemom. Większość genów w organizmach eukariotycznych jest nieciągła, części kodujące (ekson) są oddzielone niekodującymi fragmentami DNA (intron). Bardzo często introny stanowią o wiele większą część DNA niż eksony (W. Gilbert). Geny kolagenu zawierają 30—50 intronów, ilość nukleotydów w DNA eksonów jest zawsze wielokrotnością liczby 9 — glicyna powtarza się w cząsteczkach kolagenu jako co trzeci aminokwas (H. Boedtker). Struktura genów globiny i ich ewolucja były przedmiotem wykładu M. Maniatis'a. P. Leder omówił struktury szeregu genów (m.in. globiny, oraz kilku enzymów glikolitycznych), ich ewolucję oraz funkcję niekodujących sekwencji DNA. Zmiany w niekodujących fragmentach DNA są o wiele bardziej częste niż w sekwencjach kodujących.

Następną sesję poświęcono biologii rozwoju. Przewodniczył jej S. Brenner. Mechanizmy różnicowania komórkowego na poziomie molekularnym pozostają ciągle jeszcze nieznanne.

Przegrupowanie genów immunoglobulin czy sekwencji regulujących ekspresję genów badane intensywnie w układach *Drosophila melanogaster* czy *Dictyostelium discoideum* mogą ilustrować zjawiska bardziej ogólne. Obserwacje wytwarzania przeciwciał służyły szczególnie często w badaniach procesów różnicowania. Baltimore mówił w swoim wykładzie o mechanizmach łączenia się fragmentów DNA kodujących różne regiony immunoglobulin. W trakcie tych procesów kodujące sekwencje DNA mogą łączyć się albo bezpośrednio, albo przez nowe fragmenty DNA o długości od 2 do 7 nukleotydów (prawdopodobnie syntetyzowane przez terminalną nukleotydylotransferazę), albo też część nukleotydów (zwykle 2 do 3) może być usunięta z kodujących sekwencji DNA przed ich połączeniem. Procesy te prowadzą do wielkiej różnorodności przeciwciał. H. Lodish przedstawił badania nad rozwojem *Dictyostelium discoideum*. W trakcie cyklu życiowego *D. discoideum* trwającego 24 godziny ilość aktywnych genów wzrasta ok. 2-krotnie. Jak wiadomo różnicowanie tego organizmu można wywołać przez głodzenie, przez zagęszczanie komórek albo przez dodanie

cAMP do hodowli. Organizm ten staje się przedmiotem zainteresowania coraz większej grupy badaczy.

Molekularne aspekty rozwoju ssaków (na przykładzie embrionów mysich) zostały omówione przez R. Jaenisch'a. G. Rubin przedstawił wyniki analogicznych badań rozwoju u *Drosophila*.

Jedną z dziedzin zastosowania nowych metod manipulowania genami jest medycyna. Szereg problemów medycznych może zostać rozwiązanych metodami inżynierii genetycznej. W sesji poświęconej tym problemom C. Weissmann mówił o limfokinach, substancjach o aktywności antywirusowej produkowanych przez limfocyty. Znanych jest wiele limfokin, ale tylko kilka z nich oczyszczono i sklonowano, np. interferony α , β i γ . Geny interferonów stanowią jedną z dwóch klas genów nie zawierających sekwencji niekodujących w organizmach ssaków (druga klasa to geny histonów). Komórki *E. coli*, do których wprowadzono geny interferonu produkują do 1 g interferonu z 1 l hodowli. Gen interferonu wprowadzono także do genu α -amylazy *B. subtilis* i w ten sposób otrzymano bakterie produkując interferon i wydzielające go na zewnątrz komórki. Ludzki interferon α wytwarzany przez *E. coli* albo *B. subtilis* jest nierozróżnialny od oryginalnego (wytwarzanego przez limfocyty ludzkie) i może być produkowany w ilościach gramowych. Y. W. Kan mówił o zastosowaniu analizy DNA genów globiny do rozpoznawania dziedzicznych chorób takich jak α -talasemia, anemia sierpowata i β -talasemia jeszcze przed urodzeniem dziecka (*prenatal diagnosis*). Analiza polega na cięciu DNA enzymami restrykcyjnymi tak dobranymi, że rozcinają normalny globinowy DNA lecz nie rozcinają DNA kodującego zmienioną globinę. Dalsze udoskonalenia metod analizy DNA pozwoli na wczesne rozpoznanie chorób dziedzicznych.

Ostatni dzień konferencji poświęcono głównym kierunkom rozwoju biologii molekularnej w najbliższych latach. C. Weissmann, przewodniczący przedpołudniowej sesji, spekulował na temat możliwości poznania sekwencji DNA chromosomu albo nawet całego genomu. Temat motyw był kontynuowany przez S. Brennera, który kilka godzin później mówił o możliwościach poznania struktury molekularnej całego organizmu pewnego nicienia mającego genom tylko 18 razy większy od genomu *E. coli*. Jednak poznanie sekwencji DNA całego organizmu, choćby najprostszego, miałoby sens gdybyśmy równocześnie wiedzieli jaka jest funkcja każdego produktu genu. Zdarza się, że znamy sekwencję DNA jakiegoś genu ale nie wiemy jaką funkcję pełni jego produkt. Inne istotne problemy biologii molekularnej, które przedstawił C. Weissmann, to różnicowanie komórkowe, komunikacja między komórkami w trakcie różnicowania oraz wirusy onkogenne jako narzędzie badawcze. H. Temin mówił o retrowirusach, mechanizmie ich włączania się do komórkowego DNA i wywołania raka. D. Goeddel w swoim wykładzie przedstawił wyniki badań nad zależnością antywirusowej aktywności interferonu γ od jego struktury, nad strukturą genu interferonu γ oraz nad ekspresją tego genu w drożdżach. Hormony mózgowie były przedmiotem wykładu F. Blooma. Celem tych badań jest poznanie organizacji genomu komórek mózgu aby dalej móc poznać mechanizmy różnicowania komórek mózgowych, tworzenia synaps i ostatecznie molekularne mechanizmy różnorodnych emocji ludzkich.

F. H. C. Crick był przewodniczącym sesji zamykającej sympozjum. Sesja ta była poświęcona badaniom struktury genomu i wektorom do przenoszenia genów w organizmach roślinnych i zwierzęcych. H. Goodman omówił podstawowe metody badania genów roślinnych, jak również przedstawił zalety układów roślinnych (możliwość otrzymania całej rośliny z jednej komórki) jako układów modelowych w biologii molekularnej. Szereg genów roślinnych przeniesiono z komórki do komórki w drodze ich fuzji albo też wykorzystując plazmid T bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. R. Mulligan przedstawił zalety retrowirusów jako wektorów do przenoszenia genów

w komórkach ssaków, istniejące ograniczenia obecnie stosowanych metod do przenoszenia genów (niemożność wprowadzenia genów w określone miejsce chromosomu) oraz możliwość terapii genowej.

Hieronim Jakubowski

Sprawozdanie z Bat Sheva Seminarium na temat — „Poliaminy w procesach wzrostu i odróżnicowania” — Izrael, Jerozolima 4—9.07.1982.

Report Bat Sheva Seminar — „Polyamines in Growth and Differentiation Processes” — Israel, Jeruzalem 4—9.07.1982.

W dniach od 4—9 lipca 1982 roku odbyło się w Izraelu, Jerozolimie — Seminarium na temat udziału poliamin w procesach wzrostu i odróżnicowania komórkowego organizowane pod auspicjami Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS), The Bat-Sheva de Rothschild Foundation for the Advancement of Science oraz The Hebrew University of Jerusalem. Funkcję Przewodniczącego Komitetu Organizacyjnego oraz w pewnym sensie Gospodarza Seminarium pełnił z wielkim poświęceniem prof. Uriel Bachrach (Dept. of Molecular Biology).

Prace podczas trwania Seminarium przedstawiono w formie referatów oraz w formie plakatów. Program naukowych składał się z następujących sesji: I — Poli-aminy a nowotwory, II — Dekarboksylaza ornitynowa (ODC), III — Dekarboksylaza ornitynowa i kinazy białkowe, IV — Poli-aminy w roślinach, V — Metabolizm poli-amin, VI — Poli-aminy w procesach odróżnicowania, VII — Poli-aminy w mikro-organizmach.

W Seminarium wzięło udział 100 uczestników, z 15 państw. Bardzo wysoki poziom merytoryczny gwarantowała obecność przedstawicieli praktycznie wszystkich ośrodków naukowych zajmujących się problemem poliamin. Seminarium w zasadzie podsumowało obecny stan wiedzy dotyczący poliamin w różnych aspektach (patrz tematyka poszczególnych sesji).

W ramach sesji I i VI (poliaminy a nowotwory i poliaminy a procesy odróżnicowania) przedstawiono szereg ciekawych prac dotyczących medycyny klinicznej i doświadczałnej. Do prac z tego zakresu należał referat H. Deser'a (Hematology Hanusch Krankenhaus, Wiedeń) dotyczący zachowania się poliamin i histaminazy w surowicy krwi pacjentów z chorobami hematologicznymi. W konkluzji autor stwierdził, iż w 100% przypadków z polycytemia vera dochodzi do wzrostu poziomu spermidyny (SPD), i sperminy (SPM). Y. Horn (Dept. of Oncology, Izrael) przedstawił próbę wykorzystania poliamin jako biochemicznych wskaźników złośliwości w przypadkach guzów mysich, stwierdzając ewidentny wzrost stężenia putrescyny (PU) i nieco mniejszy wzrost spermidyny (SPD). Natomiast J. Jänne (Dept. Biochemistry, Helsinki) przedstawił badania antymetabolitów poliamin w układzie hodowli z komórek raka Ehrlicha (ascites). Używany przez autora substancjami hamującymi wewnątrzkomórkową biosyntezę poliamin były — α -dwufluorometyloornityna (DFMO) — hamująca dekarboksylazę ornitynową (ODC) oraz metylogliksal-bis-guanylohydrazon (MGBG) — potencjalny inhibitor dekarboksylazy adenosylometioninowej. W podsumowaniu wyników autor stwierdził wewnątrzkomórkowy wzrost SPD i PU indukowany przez różne stężenia MGBG w komórkach hodowli oraz zupełny brak obecności kadaweryny.

Interesującą pracę na temat zachowania się aktywności ODC oraz stężenia PU

w indukowanych guzach skórnych myszy i papilloma u małp przedstawił prof. R. K. Boutwell (Univ. Wisconsin, USA), stwierdzając wzrost poziomu PU oraz najwyższe hamowanie aktywności ODC przez DFMO niezależnie od stężenia inhibitora po 4 godzinach. Po wygłoszeniu pracy rozwinęła się dyskusja na temat użyteczności oznaczania poliamin w mysich guzach skórnych jako modelu badań nad proliferacją komórkową. Następnie G. Scalabrino (Univ. Milan, Włochy) przedstawił wyniki dotyczące badań aktywności ODC wątroby szczurzej podczas chemicznej konkerogenezy, zaś L. Persson (Univ. Lund, Szwecja) omówił wykryte zmiany w zawartości wewnątrzkomórkowych poliamin w trakcie rozwoju Hepatoma Morrisa u szczura, przy czym uwzględniono poszczególne fazy rozwoju komórki (G_1 , S, G_2 , H). Autorzy powyżsi wykazali zmiany w metabolizmie wątrobowym zależne od stopnia odróżnicowania komórkowego, charakteryzujące się obniżeniem poziomu poliamin wewnątrzkomórkowych przy wzroście aktywności kinaz białkowych.

Bardzo cenną (mając na uwadze stosowaną metodykę) pracę przedstawiającą technikę oczyszczania ODC z jajnika i prostaty myszy przedstawił A. Kaye (Weizman Inst. Izrael).

Ciekawą pracę na temat wpływu hormonów na poliaminy w przebiegu rozwoju epithelium gruczołu piersiowego u małp nieciążarnych, podczas wczesnej ciąży i podczas laktacji zaprezentował T. Oka i wsp. (Nat. Inst. Health, Bethesda, USA). Wykazano, iż głównie progesteron indukuje poliaminy poprzez modulację aktywności ODC i syntetazy SPD. Aktywność tych enzymów jest natomiast zależna, szczególnie podczas laktogenezy od stężenia insuliny, prolaktyny i glikokortykoidów.

Na szczególną uwagę zasługiwał referat W. Kerstena (Univ. Erlangen, RFN), w którym autor przedstawił rozmieszczenie poliamin w komórkach sutka małej BSC — 1. Okazało się, iż stężenie poszczególnych poliamin w komórce jest najwyższe w cytoplazmie zaś w jądrze zawsze niższe.

Następnie w kolejnym referacie D. Morgan (Div. Perinatal. Med., Harrow, W. Brytania) omówił badania dotyczące inhibicji monoaminooksydazy (MAO) i dwuaminooksydazy (DAO) łożyska ludzkiego (tkanka szczególnie szybko rozwijająca się). Autor przedstawił również dane dotyczące stężenia poliamin w przebiegu ciąży fizjologicznej (surowica krwi, łożysko, surowica krwi pozałożyskowej), stwierdzając szczególnie wysoki poziom poliamin, głównie PU w tkance łożyskowej.

Aktywność enzymów rozkładających poliaminy (aminooksydaz) w guzach mózgu typu neuroblastoma badał B. Mondovi (Inst. Biochim. Appl. Roma, Włochy), stwierdzając zaskakująco słabą korelację pomiędzy aktywnością enzymów a poziomem poliamin.

Ciekawą pracę, w której obserwowano zachowanie się poliamin w limfocytach dzieci z leukemią zaprezentował P. Ebert (Inst. Erlangen, RFN). Badania prowadzone przed i po chemioterapii nie wykazały ewidentnych zmian w stężeniu poliamin w limfocytach. Natomiast M. Romano (Univ. Naples, Włochy) oceniła wydzielanie poliamin jako bardzo dobry wskaźnik efektów terapii radiologicznej w przypadku raka piersi w fazie przerzutu. Zatem dla celów klinicznych oznaczanie stężenia wewnątrzkomórkowego poliamin byłoby mniej przydatne.

W powyższym Seminarium uczestniczyłem w sposób czynny przedstawiając w sesji — „Poliaminy a nowotwory” pracę pt.: „Oznaczanie poliamin podczas chemioterapii choriocarcinoma”. Udział w tym międzynarodowym spotkaniu pozwolił na zaprezentowanie własnego dorobku krytycznemu środowisku uczestników Seminarium, poza tym miałem okazję w toku licznych dyskusji zorientować się w aktualnych kierunkach badawczych, co jest niezwykle istotne dla programowania dalszych badań własnych.

Jeżeli chodzi o wniosek natury ogólnej jaki wynikł z tego spotkania to godne zacytowania jest stwierdzenie, iż stosowanie w coraz szerszym zakresie bardzo dro-

giej chemioterapii winno być kontrolowane w większym stopniu przez rozwijanie badań (niestety również bardzo kosztownych) mających na celu stwierdzenie efektywności tego typu leczenia. A więc badań dotyczących markerów procesu odróżnicowania, pozwalających na ocenę progresji lub regresji nowotworu i zezwalających na lepsze dobranie leczenia cytostytycznego.

Kazimierz Kamiński

KOMUNIKAT
KOMISJI SŁOWNICTWA BIOCHEMICZNEGO

W wyniku szybkiego rozwoju genetyki molekularnej z zastosowaniem nowych technik, w piśmiennictwie anglosaskim pojawiła się i nadal pojawia wielka liczba nowych określeń, nazw i zwrotów. Wiele z nich ma krótki żywot, inne jednak wchodzą na dobre do słownictwa z tej dziedziny wiedzy. Nazwy te powinny mieć swe odpowiedniki w języku polskim, tym bardziej, że nie podlegają one ogólnie przyjętym zasadom słownictwa chemicznego czy enzymologicznego.

W *Science* (1980, 109, 1435) podano przygotowane *ad hoc* propozycje słownika terminów z dziedziny genetyki molekularnej. Polską wersję ogłoszono w *Postęпах Biologii Komórki* (1982, t. 9, z. 2, str. 335—340). Obie propozycje budzą pewne zastrzeżenia u specjalistów.

Z uwagi na duże znaczenie zagadnienia, Komisja Słownictwa Biochemicznego powołała zespół, przygotowujący słownik terminologii z dziedziny genetyki molekularnej. Pracą zespołu kieruje prof. dr hab. Aleksandra Putrament. Zawiadamiając o tym, Komisja prosi o nadsyłanie haseł anglosaskich, oraz ewentualnych propozycji polskich określeń, na adres:

Prof. dr hab. Aleksandra Putrament
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

POSTĘPY BIOCHEMII

September 1984

ARTICLES IN POLISH

Volume 30

Number 3

Professor Antoni Dmochowski — Obituary 219

Minireview:

H. R. Bosshard — The Function of Cytochrome c, a Paradigm for Chemical Recognition (Department of Biochemistry, University of Zurich) 225

Articles:

Z. Machoy — Regulation of Cytochrome Oxidase Activity (Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Pomeranian Medical Academy, Szczecin) 231

J. Swierczyński — Role of Malic Enzyme in Skeletal Muscle Metabolism (Department of Biochemistry, I. B.M., Medical School, Gdańsk) 251

S. Angielski — Renal Regulation of Phosphate Excretion. The use of isolated Brush Border Membrane Vesicles for the Study of Phosphate Transport (Department of Clinical Biochemistry, Medical Academy, Gdańsk) 273

M. Michalik — Use of isolated Kidney Tubules in Metabolic Studies (University of Warsaw, Institute of Biochemistry, Warszawa) 295

St. Maleszewski, Z. Kamińska — Effect of Oxygen on Photosynthetic Carbon Metabolism (Institute of Botany, University of Warsaw) 317

E. Wloch — Participation of the Mono- and Oligomeric Forms of Carotenoids in the Transfer of Elektronic Excitation Energy in Model Systems (Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków) 335

J. Gemel — Lipids of Thylakoid Membranes (Institute of Biochemistry Warsaw University, Warszawa) 353

H. Miller-Podraza — Biosynthesis of Glycosphingolipids (Department of Biochemistry, Institute of Hematology, Warszawa) 37

A. Sikorski — Erythrocyte Spectrin and its Analogues in other Cells (Institute of Biochemistry, University of Wrocław) 47

A. Chimiak — Siderophores — Transport Agents of Ferric Ion (Department of Organic Chemistry, Technical University, Gdańsk) 57

M. Ferenc, B. Morawiecka — Acid Phosphatases of Higher Plants (Institute of Biochemistry, University of Wrocław) 67

Minireview:

B. Okoniewska, H. Augustyniak — Organellar Genome of higher Plants (Department of Biopolymer Biochemistry of A. Mickiewicz University, Poznań) Biochemical rules and nomenclature (in Polish) 73

Book Review 75

Meeting Report 50

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 przedstawionej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nie uporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta* (1972), 271, 1 np.

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

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

Dixon M., Weeb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Langmans 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 olówkiem) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

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

Ryciny, tj. wykresy, rusunki, schematy lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzorów 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: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „górze” i „dół” (ółówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmie 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 maszynopis i ilustracje przed pogięciem.

SPIS TREŚCI

Profesor Antoni Dmochowski — wspomnienie	219
Mini-review:	
H. R. Bosshard — Funkcje cytochromu c — przykład molekularnego rozeznania	225
Artykuły przeglądowe:	
Z. Machoy — Regulacja aktywności oksydazy cytochromowej	231
J. Świerczyński — Rola enzymu jabczanowego w metabolizmie mięśni szkieletowych	251
S. Angielski — Regulacja nerkowego wydalania fosforanów. Zastosowanie izolowanych pęcherzyków błon luminałnych do badania transportu	273
M. Michalik — Zastosowanie izolowanych kanalików nerkowych w badaniach metabolicznych	295
St. Maleszewski, Z. Kamińska — Działanie tlenu w fotosyntetycznym tabolizmie węgla	317
E. Włoch — Udział mono- i oligomerycznych form karotenoidów w przekazywaniu energii wzbudzenia elektrycznego w układach modelowych	335
J. Gemei — Lipidy błon tylakoidów	353
H. Miller-Podraza — Biosynteza glikosfingolipidów	379
A. Sikorski — Spektryna erytrocytów i jej analogi w innych komórkach	409
A. Chimiak — Siderofory — nośniki jonu żelazowego	435
M. Ferens, B. Morawiecka — Fosfatazy kwaśne roślin wyższych	461
Mini-review:	
B. Okoniewska, H. Augustyniak — Genom organeli roślin wyższych	477
Zalecenia Komisji Biotermodynamiki: Zalecenia dotyczące pomiarów i przedstawiania danych biochemicznych (tłum. K. Kaletha)	487
Recenzja książki:	
Wyodrębnienie białek i oznaczenie ich struktury pierwotnej (I. Kąkol)	501
Sprawozdania:	
Sprawozdanie z Konferencji „Biologia Molekularna dziś i jutro. 30 lat z DNA”, Boston, USA (H. Jakubowski)	503
Sprawozdanie z Bat Sheva Seminarium na temat: „Poliaminy w procesach wzrostu i odróżnicowania”, Jerozolima, Izrael (K. Kamiński)	506