

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1973
tom 19
nr 3

KWARTALNIK

PSTBAH 19(3)
341-496 (1973)

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły przeglądowe z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiedzialni są za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły są honorowane według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dalsze 100 odbitek (płatnych) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Autorzy proszeni są 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.

Układ maszynopisu: strona okładowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję: tytuł pracy 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, tytuły naukowe autora(ów), jego (ich) stanowisko(a) i 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 korzystny jest często podział na rozdziały i podrozdziały. Wydzielone z tekstu tytuły rozdziałów należy oznaczyć numeracją rzymską, a ewentualne podrozdziały opatrzyć dodatkową numeracją arabską (np. I-2, II-4 itp.). Tytuły podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie powinny być numerowane. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czeionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku np. kwas glutaminowy (I).

Autorzy proszeni są o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o nie wprowadzanie do tekstu tworzonych do-
rażnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z POMOCĄ FINANSOWĄ POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 3
tom XIX
zeszyt 3

KWARTALNIK
PSTBAH 19(3) 341-496 (1973)

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)
Członkowie: M. Bagdasarian (Warszawa), M. Chorąży (Gliwice), J. Gregorczyk (Szczecin), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawelkiewicz (Poznań), T. Szczepkowski (Kraków)

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

KOMITET REDAKCYJNY

B. Czartoryska (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), S. Lewak (Warszawa), P. Maślowski (Toruń), I. Szumiel (Warszawa)

Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1973

| | |
|------------------------------|---------------------------------------|
| Nakład 2 200 (2058+142) | Oddano do składania 17.V.1973 r. |
| Ark. wyd. 11,5, druk. 9,75 | Podpisano do druku w sierpniu 1973 r. |
| Papier ilustr. kl. V, 70×100 | Druk ukończono we wrześniu 1973 r. |
| Cena zł 20.— | Zam. nr 770/73 R-30 |

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

RENATA DĄBROWSKA *, WITOLD DRABIKOWSKI **

Molekularne podstawy skurczu mięśni

Molecular Basis of Muscular Contraction

Structural organization of individual myofibrillar proteins and molecular arrangements of the filaments in the relaxed state, contraction and rigor have been reviewed.

W poprzednim artykule opublikowanym w „Postęпах Biochemii” (1) przedstawiliśmy mechanizmy regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych. Niniejszy artykuł poświęcamy budowie aparatu kurczliwego oraz zmianom strukturalnym zachodzącym w różnych stanach fizjologicznych.

I. Budowa i skład miofibryli

Dzięki badaniom prowadzonym w latach czterdziestych i pięćdziesiątych ustalono, że w jednostkach strukturalnych mięśni szkieletowych, to znaczy w miofibrylach, występują dwa rodzaje specyficznych białek: miozyna i aktyna, że miozyna ma właściwości ATP-azy, a właśnie ATP jest źródłem energii do skurczu, że aktyna aktywuje ATP-azę miozynową i że interakcja tych białek reprezentuje podstawowy mechanizm skurczu mięśnia (2—5).

Z drugiej strony dzięki klasycznym już dziś pracom Huxley'a i Hansona od lat prawie dwudziestu było wiadome, że miofibryle zbudowane są z dwu rodzajów t.zw. filamentów (rysunek 1).

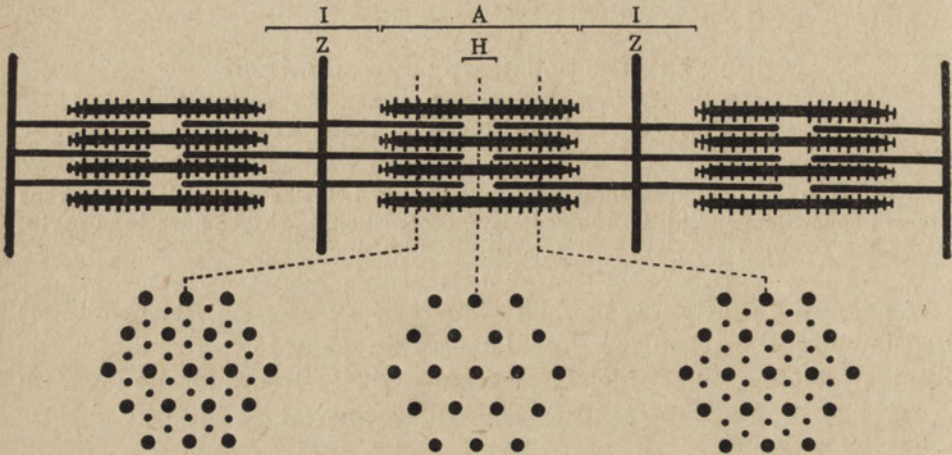
W prążku anizotropowym znajdują się grube filamenty zbudowane z miozyny, natomiast prążek izotropowy podzielony w środku strefą o dużo

* Dr inż., Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa

** Prof. dr habil., Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: Podjednostki miozyny: HMM — ciężka meromiozyna, LMM — lekka meromiozyna; Podjednostki troponiny: TN-I — składnik hamujący ATP-azę aktomiozynową, TN-C — składnik uczulający aktomiozynę na Ca^{++} , TN-B — składnik wiążący troponinę do aktyny i tropomiozyny.

większej gęstości t.zw. linią Z, zbudowany jest z cienkich filamentów. Cienkie filamenty, zawierające aktynę, zachodzą na pewnym odcinku w głąb prążka anizotropowego między grube filamenty, przy czym przestrzenne ułożenie obu rodzajów filamentów względem siebie jest nadzwyczaj regularne (6).

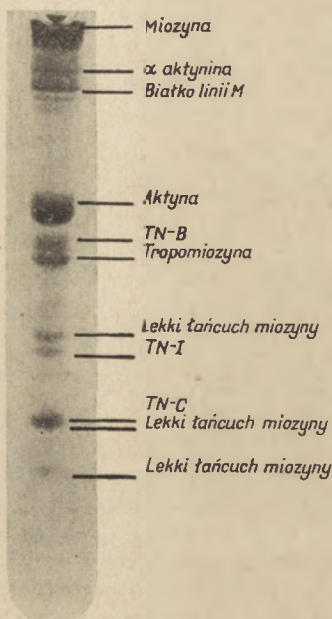


Rys. 1. Struktura mięśni poprzecznie prążkowanych (wg 7)
A — prążek anizotropowy, I — prążek izotropowy

W ostatnich latach udoskonalenie szeregu wyrafinowanych metod, głównie biofizycznych jak np. metoda lokalizacji poszczególnych białek przy użyciu znaczonych przeciwciał, zastosowanie w mikroskopii elektronicznej napyłania preparatów w czasie ich obracania oraz techniki negatywowego barwienia, metody dyfrakcji optycznej oraz niskokątowej dyfrakcji promieni X, pozwoliło na ustalenie i wyjaśnienie wielu szczegółów dotyczących struktury filamentów i całego mięśnia oraz zmian strukturalnych w nim zachodzących w różnych stanach fizjologicznych. Znaczenie tych osiągnięć jest niewątpliwe, ale uzyskane obserwacje byłyby bardzo trudne lub wręcz niemożliwe do interpretacji bez podbudowy biochemicznej. I na tym polu zanotowano również bardzo poważne osiągnięcia: z jednej strony dotyczące szeregu szczegółów budowy aktyny i miozyny, z drugiej strony wykrycia i zbadania roli i właściwości innych białek miofibrylarnych. Prosta w swej istocie metoda, jaką jest elektroforeza na żelu poliakrylamidowym, szczególnie prowadzona w obecności siarczanu dodecylu (8), okazała się nadzwyczaj pomocną, jeżeli nie wręcz nieodzowną przy tych badaniach. Posługując się tą metodą można na przykład otrzymać równocześnie całe spektrum białkowe miofibryli (rysunek 2).

Z tych kilkunastu prążków białkom wchodzącym w skład grubych filamentów odpowiadają — poza miozyną, od której w tych warunkach odysocjują t.zw. lekkie łańcuchy — stosunkowo mało jeszcze poznane

białko linii M i ostatnio odkryte t.zw. białko C. Reszta białek, poza tzw. α -aktywniną — białkiem linii Z — znajduje się w cienkim filamencie, o którym do niedawna sądzono, że zbudowany jest tylko z aktyny.



Rys. 2. Spektrum białkowe miofibryli uzyskane drogą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym (wg 97)

Żadne z tych białek nie działa właściwie niezależnie jako monomer, a istnieje jako część wysoce zorganizowanych struktur obu rodzajów filamentów. Dlatego niezależnie od struktury własnej białka pierwszo-, drugo-, trzecio- czy czwartorzędowej, filamenty rozpatruje się jako ultrastruktury o wysokim stopniu precyzji przestrzennej, zbudowane z kilku białek występujących w ściśle stechiometrycznych ilościach.

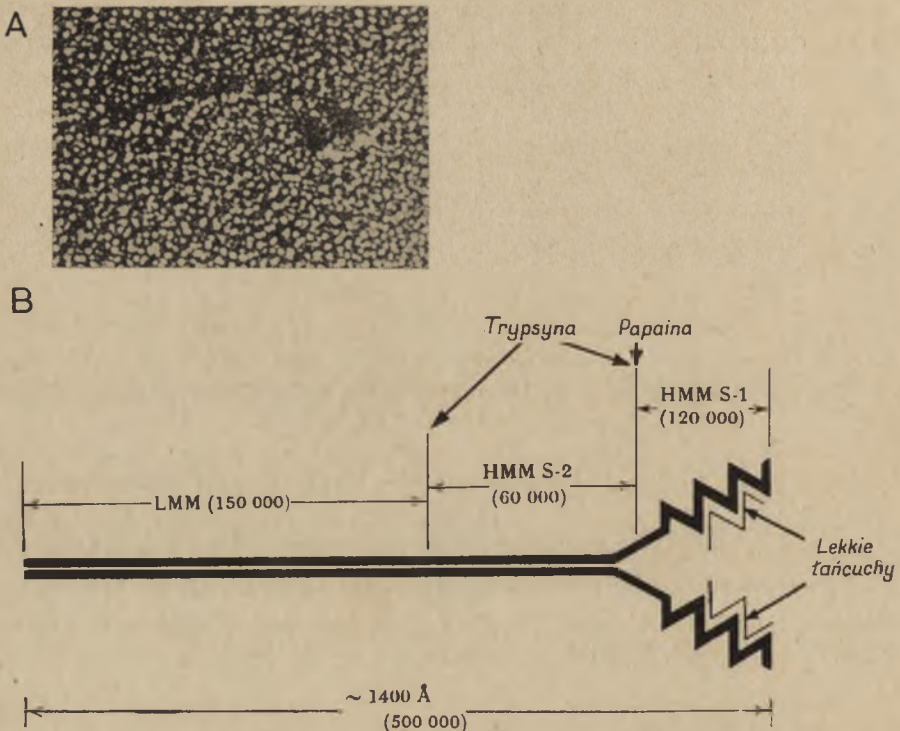
II. Charakterystyka białek grubych filamentów

II-1. Miozyna

Cząsteczka miozyny posiadająca ciężar cząsteczkowy około 500 000 daltonów (9, 10, 11) ma kształt pałeczki i składa się z dwu symetrycznych łańcuchów. Każdy z nich na przestrzeni 1300Å posiada prawie całkowicie strukturę α -spiralną i oba zwinięte są w formę superspirali (12). Na jednym jej końcu na odcinku około 100Å łańcuchy nie są skręcone (13, 14, 15). W tym globularnym odcinku cząsteczki znajdują się t.zw. dwie głowy, które zawierają całą aktywność biologiczną miozyny tj. aktywność ATP-azową

oraz miejsce przyłączenia się aktyny. W miejscu łączenia się głowy z częścią pałeczkowatą łańcuch odznacza się znaczną giętkością, co według obecnych poglądów ma duże znaczenie w procesie przesuwania filamentów względem siebie podczas skurczu.

Dwa miejsca cząsteczki miozyny są stosunkowo wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych i zależnie od rodzaju enzymu (trypsyna lub papaina) i czasu trawienia otrzymuje się fragmenty zachowujące te czy inne właściwości wyjściowej cząsteczki miozyny. Tak więc, za pomocą trypsyny można podzielić miozynę na dwie części: jedną zawierającą większy odcinek pałeczki t.zw. lekką meromiozynę (LMM) i drugą obejmującą pozostały odcinek pałeczki oraz dwie głowy, t.zw. ciężką meromiozynę



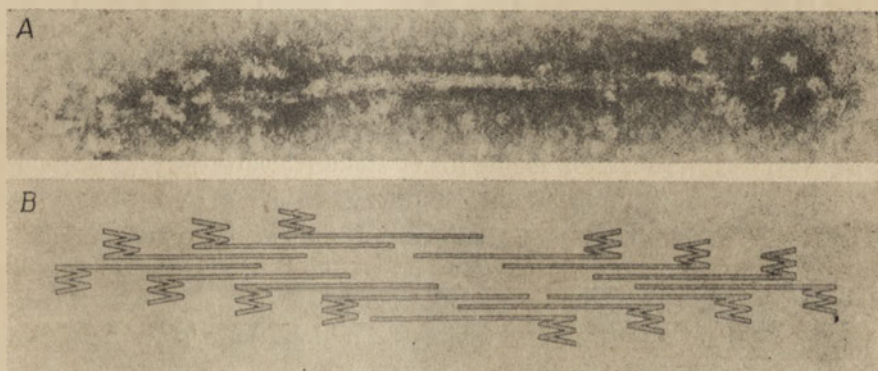
Rys. 3. Budowa cząsteczki miozyny; A — obraz mikroskopowo-elektronowy otrzymany techniką napyłania preparatu w czasie obracania (wg 19), B — schemat (wg 15)

(HMM) (16). Dalsze trawienie HMM prowadzi do podzielenia jej na pozostałą resztę pałeczki t.zw. subfragment S_2 i pojedyncze głowy — subfragmenty S_1 (17). Subfragment S_1 można otrzymać bezpośrednio z miozyny w wyniku trawienia papainą (15, 18). Schemat na rysunku 3B pokazuje możliwość fragmentacji cząsteczki miozyny oraz wymiary i ciężary cząsteczkowe subfragmentów.

Taka budowa cząsteczki miozyny uzyskała potwierdzenie ostatnio przez

badania w mikroskopie elektronowym techniką napyłania obracanych preparatów (rysunek 3A) (19). Udało się uzyskać obraz pojedynczych cząsteczek, w których widać wyraźnie zaznaczone dwie głowy przymocowane do części pałeczkowatej. Ciężka meromiozyna posiada znacznie krótszą część pałeczkowatą a na obrazach fragmentów S_1 widać tylko same głowy.

W ostatnich latach wykryto w rodzimej miozynie niskocząsteczkowe fragmenty, tzw. lekkie łańcuchy, które oddysocjowują od reszty cząsteczki w stosunkowo łagodnych warunkach nie prowadzących jeszcze do rozwinięcia superspirali całej cząsteczki (20—25). Cząsteczka miozyny izolowana z mięśni szkieletowych królika posiada trzy lekkie łańcuchy (23, 24). Jeden z nich o ciężarze cząsteczkowym 18 000 daltonów występujący w ilości dwóch moli na mol miozyny może być usunięty przez dwutionitrobenzen bez straty aktywności biologicznej miozyny. Dwa pozostałe o ciężarach cząsteczkowych 25 000 i 16 000 daltonów oddysocjowują w środowisku alkalicznym pozbawiając miozynę własności enzymatycznych. Miozyny izolowane z mięśni serca, mięśni tzw. wolnych czy mięśni mięczaków różnią się składem lekkich łańcuchów (22, 24, 25). Wydaje się więc, że obserwowane różnice we własnościach enzymatycznych miozyny różnego pochodzenia mogą być między innymi wynikiem różnic w składzie i budowie lekkich łańcuchów.



Rys. 4. Agregacja cząsteczek miozyny, A — obraz mikroskopowo-elektronowy otrzymany techniką barwienia negatywowego (wg 79), B — schemat (wg 26)

Cząsteczki miozyny w warunkach fizjologicznej siły jonowej mają dużą tendencję do agregacji zarówno końcami jak i wzdłuż pałeczkowatych fragmentów głównie na zasadzie elektrostatycznej interakcji. W ten sposób powstają jakby sztuczne grube filamenty, których trzon stanowią wiązki pałeczkowatych odcinków cząsteczek miozyny z częściami globularnymi wychodzącymi na zewnątrz i tworzącymi wypustki (rysunek 4A, B) (26).

Takie sztuczne agregaty miozyny przypominają grube filamenty w których stwierdza się również wypustki, zwane inaczej mostkami poprzecznymi, regularnie wystające z trzonu grubego filamentu. Przeprowadzona

ostatnio analiza obrazów niskokątowej dyfrakcji promieni X pozwoliła Huxley'owi i Brownowi (27) na ustalenie, że wypustki ułożone są regularnie co 143Å na powierzchni trzonu grubego filamentu ze „skokiem” 429Å.

Szersze omówienie zagadnień dotyczących budowy i roli miozyny znajdzie czytelnik w monografii I. Kąkol (27a)

II-2. Białko linii M

Środkowy odcinek grubego filamentu zajmuje tzw. linia M. Białko linii M zostało zidentyfikowane już wcześniej metodami immunochemicznymi (28, 29), a ostatnio ukazały się również prace dotyczące jego otrzymania (29, 30). Wyizolowane buforami o niskiej sile jonowej i lekko alkalicznym pH, białko to jest natury globularnej i posiada ciężar cząsteczkowy 88 000 daltonów (30). Białko linii M powoduje agregację miozyny, a jego funkcja wydaje się polegać na łączeniu wiązek pojedynczych cząsteczek miozyny w walec tworzący gruby filament (28—32).

II-3. Białko C

Ostatnio Starr i Offer wykryli w grubych filamentach białko o ciężarze cząsteczkowym 130 000 daltonów, zawierające jeden łańcuch peptydowy (33). Białko to wiąże się silnie z częścią pałeczkowatą miozyny. Przypuszcza się, że jest ono przymocowane do trzonu grubych filamentów. Dzięki użyciu przeciwciał znaczonych, mikroskopii elektronowej oraz ugięcia promieni X wykazano, że białko C zlokalizowane jest w postaci poprzecznych prążków na filamentach miozynowych z okresowością 440Å (34). Funkcja tego białka pozostaje dotychczas nie wyjaśniona.

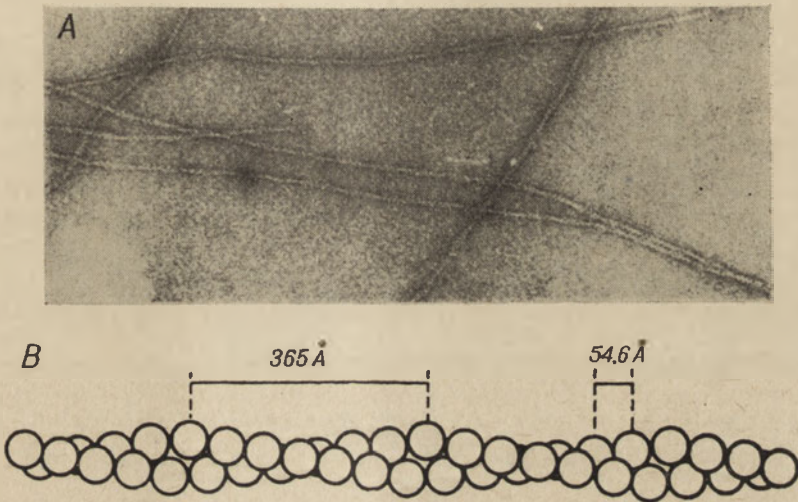
III. Charakterystyka białek cienkich filamentów

III-1. Aktyna

Główną masę filamentów cienkich stanowi aktyna. Białko to można otrzymać z mięśni w postaci monomeru, tzw. G-aktyny, posiadającej ciężar cząsteczkowy około 45 000 daltonów (35, 36). G-aktyna, której struktura pierwszorzędowa została ostatnio prawie całkowicie określona (37, 38), jest białkiem globularnym, zawierającym silnie związaną cząsteczkę ATP (39), oraz cząsteczkę wapnia (40, 41). G-aktyna w określonych warunkach siły jonowej, podobnych do tych jakie występują w żywej komórce, polimeryzuje tworząc nici tzw. F-aktyny. Transformacji tej towarzyszy odszczepienie fosforu nieorganicznego od ATP związanego z G-aktyną (39). Proces polimeryzacji jest reakcją złożoną, która zaczyna się od utworzenia zarod-

ków polimeryzacji, a wzrost następuje poprzez kooperatywne przyłączenie monomerów do wytworzonej już struktury spiralnej (42, 43).

Obrazy mikroskopowo-elektronowe cienkich filamentów nie różnią się od obrazu filamentów F-aktynowych (44), chociaż w ostatnich latach okazało się, że filamenty cienkie zawierają oprócz aktyny inne białka, tzw. białka regulujące: tropomiozynę i kompleks troponiny (rysunek 5A). Negatywowe barwienie F-aktyny wykazało, że tworzy ona liniowe polimery skręcone w formę superspirali, przypominającej dwa sznury koralików skręconych względem siebie o „skoku” 365\AA (rysunek 5B) (45).



Rys. 5. Budowa filamentu aktynowego, A — obraz mikroskopowo-elektronowy otrzymany techniką barwienia negatywowego (wg 45), B — schemat (wg 27)

III-2. Tropomiozyna

Trzecim ze znanych już od dawna białek miofibrylarnych jest trópmiozyna. Cząsteczka tropomiozyny zbudowana jest z dwu łańcuchów prawoskrętnej α -spirali, skręconych w superspiralę (46, 47), ma kształt pałeczki o wymiarach: średnica 20\AA i długość 400\AA (48, 49), a więc wysoce asymetryczny i ciężar cząsteczkowy 70 000 daltonów (46, 50). W obecności dużych stężeń mocznika lub detergentów — takich jak siarczan dodecylu — następuje rozkręcenie spirali i dysocjacja na dwie podjednostki (50). W roztworach o niskiej sile jonowej tropomiozyna występuje w postaci spolieryzowanej (51).

Szereg dowodów pośrednich wskazywało od dawna, że tropomiozyna znajduje się w cienkich filamentach (52, 53). Ponieważ w mikroskopie elektronowym obraz cienkich filamentów i spirali F-aktyny jest jednokowy zakładano, że łączące się końcami cząsteczki tropomiozyny znajdują się w rowkach spirali F-aktyny. *In vitro* tropomiozyna wykazuje inter-

akcję z F-aktyną (52—54). Badania stechiometrii tej interakcji wykazały, że jedna cząsteczka tropomiozyny przypada na siedem monomerów aktyny, co odpowiada proporcji dwu nici tropomiozyny w których cząsteczki wiążą się końcami, na jedną podwójną superspiralę F-aktyny (55, 56).

Ostatnio udoskonalając analizę matematyczną obrazów dyfrakcji parakryształów F-aktyny Hanson i wsp. (57) oraz Haselgrove (58) „zobaczyli” tropomiozynę w obu rowkach spirali cienkich filamentów.

III-3. Troponina

Oprócz aktyny i tropomiozyny cienkie filamenty zawierają globularne białko — troponinę. Białko to stanowiące około 5% wszystkich białek miofibrylarnych razem z tropomiozyną tworzy kompleks t.zw. białek regulujących.

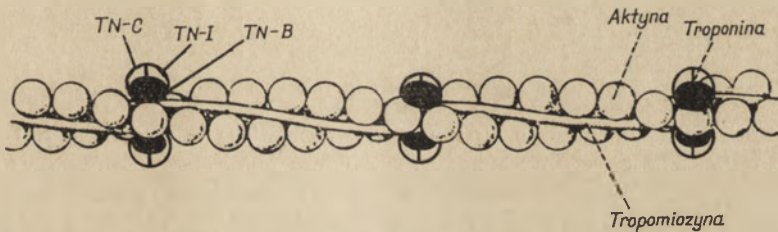
W poprzednim artykule (1) omówiliśmy biochemiczne podstawy cyklu skurczowo-rozkurczowego, który jest regulowany zmianami stężenia wolnego wapnia w mioplazmie. W warunkach siły jonowej mięśnia, w obecności stosunkowo dużych stężeń jonów Mg^{++} aktywność ATP-atyczna miozyny jest bardzo niska. Aktyna wielokrotnie zwiększa aktywność miozyny. Dzięki obecności białek regulujących aktywacja ta ma miejsce jedynie w obecności Ca^{++} . W stanie rozkurczu mięśni wapń zmagazynowany jest w sarkoplazmatycznym retikulum; w wyniku impulsu nerwowego następuje jego uwolnienie powodujące aktywację układu aktomiozynowego i skurcz.

Badania ostatnich lat wykazały, że troponina składa się z trzech komponent o ciężarze cząsteczkowym, średnio: 40 200, 23 500 i 18 300 daltonów, które można uzyskać drogą chromatografii troponiny na DEAE-Sephadex w obecności mocznika (59, 61). Obecny zazwyczaj w preparatach troponiny czwarty składnik o ciężarze cząsteczkowym około 14 000 daltonów okazał się produktem degradacji proteolitycznej (6). Białko o ciężarze cząsteczkowym 23 500 daltonów hamuje aktywność ATP-azy aktomiozynowej niezależnie od stężenia jonów Ca^{++} i stąd nazywane bywa czynnikiem inhibującym lub TN-I (59—62). Dzięki białku o ciężarze cząsteczkowym 18 300 oraz tropomiozynie hamowanie aktywności ATP-azy ma miejsce tylko w nieobecności Ca^{++} (59, 60, 63). Białko to posiada dość nietypowy skład aminokwasowy odznaczający się obecnością dużej ilości fenyloalaniny i grup kwasowych, które nadają mu silnie elektroujemny charakter (59, 63, 64). Jako jedyny ze składników troponiny wykazuje ono wysokie powinowactwo do wapnia, stąd też bywa nazywane czynnikiem uczulającym na Ca^{++} , lub TN-C (59, 64, 65). Układ zawierający oba składniki troponiny: TN-I i TN-C oraz tropomiozynę wydaje się być wystarczającym ażeby aktyna aktywowała ATP-azę miozynową tylko w obecności Ca^{++} (62, 66). Trzeci składnik troponiny o ciężarze cząsteczkowym 40 200

daltonów wykazuje wysokie powinowactwo do tropomiozyny i F-aktyny (56, 67), wydaje się być wobec tego miejscem, poprzez które następuje wiązanie całej cząsteczki troponiny do reszty składników cienkich filamentów, stąd proponowana jego nazwa: składnik wiążący TN-B.

Wszystkie składniki troponiny tworzą bardzo silny kompleks nie rozdzielany w czasie sączenia przez Sephadex, czy ultrawierowania (56, 68). Oznaczony ciężar cząsteczkowy dla całej cząsteczki troponiny wynosi 85 000 daltonów, co sugeruje, że poszczególne składniki troponiny wiążą się w stosunkach ekwimolarnych.

Szereg obserwacji wskazuje, że w cienkim filamencie jedna cząsteczka troponiny przypada na jedną cząsteczkę tropomiozyny, to znaczy na siedem monomerów aktyny (56), i że cząsteczki troponiny rozmieszczone są regularnie wzdłuż filamentu z okresowością co około 385Å (rysunek 6) (57, 69).



Rys. 6. Lokalizacja troponiny i tropomiozyny w cienkich filamentach. Modyfikacja schematu (wg 98)

III-4. Białko linii Z

Szereg dowodów pośrednich wskazuje, że wyizolowane z miofibryli białko nazwane przez E b a s h i 'e g o (70) α -aktyniną znajduje się w linii Z (71). Białko to występuje w postaci dimerów, które w obecności siarczanu dodecyłu dysocjują na monomery o ciężarze cząsteczkowym 94 000 daltonów (72).

α -aktynina reaguje z F-aktyną powodując jej żelifikację a nawet wytrącanie w postaci regularnych parakryształów, co świadczy o tym, że skleja ona jak gdyby filamenty aktynowe wzdłuż ich długości (72—75). Taka interakcja jest więc dość chaotyczna. Tropomiozyna wykazuje działanie kompetytywne do α -aktyniny (75, 76). Znajdując się na całej długości łańcuchów aktynowych wydaje się zapobiegać interakcji monomerów, α -aktyniny z F-aktyną wzdłuż filamentów umożliwiając jedynie interakcję na ich końcach i powodując ich przyczepianie do linii Z.

Dane dotyczące lokalizacji oraz struktury poszczególnych białek miofibrylarnych podsumowuje tabela 1.

Tabela 1

Lokalizacja i właściwości białek miofibrilarnych *

| Ultrastruktura miofibryli | Białka miofibrilarne | Zawartość w miofibryli (%) | Ciężar cząsteczkowy (daltony) | Kształt cząsteczki | Podjednostki |
|---------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--|
| Grube filamenty | Miozyna | 50—55 | 500 000 | pałeczka zakończona dwoma głowami | dwa ciężkie łańcuchy, cztery lekkie łańcuchy |
| | Białko linii M | ? | 160 000 | globularna | podwójny łańcuch |
| | Białko C | 2 | 130 000 | ? | pojedynczy łańcuch |
| Cienkie filamenty | G-aktyna | 20—25 | 45 000 | globularna | pojedynczy łańcuch |
| | Tropomiozyna | 4—5 | 70 000 | pałeczka | podwójny łańcuch |
| | Troponina | | 40 200 | | |
| | TN-B TN-I TN-C | 5—7 | 23 500 18 300 | globularne | pojedyncze łańcuchy |
| Linia Z | α -aktynina | 1 | 180 000 | globularna | podwójny łańcuch |

* W tabeli uwzględniono dane szeregu autorów, omówione w rozdziałach II i III.

IV. Zmiany strukturalne zachodzące w różnych stanach fizjologicznych

IV-1. Białka kurczliwe

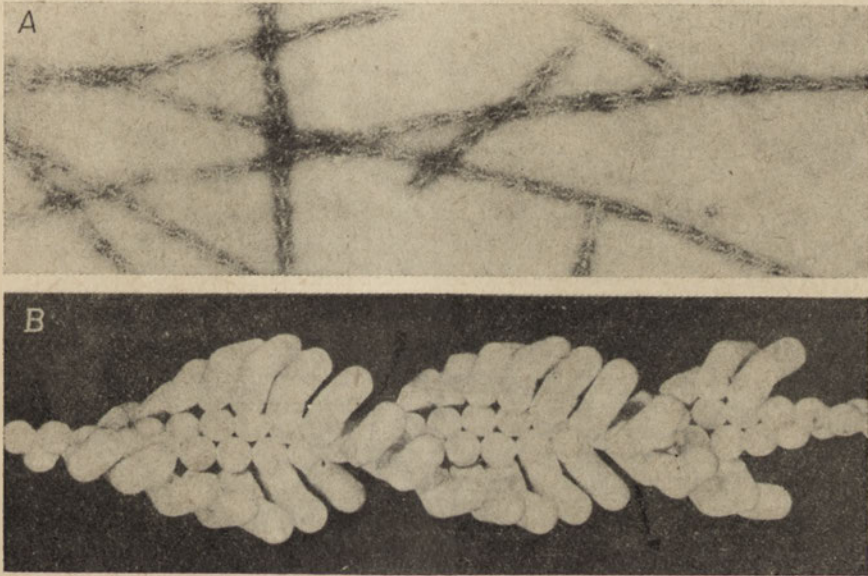
Można wyróżnić trzy stany mięśnia: stan rozkurczu, stan skurczu odwracalnego i skurczu nieodwracalnego występującego w stężeniu pośmiertnym — *rigor mortis*.

Badacze angielscy Andrew Huxley i Niedergerke oraz Hugh Huxley i Hanson stwierdzili, że długość filamentów podczas skurczu nie ulega zmianie, również nie ulega zmianie szerokość prążka anizotropowego, następuje natomiast przesunięcie obu rodzajów filamentów względem siebie i w roku 1954 niezależnie ogłosili teorię skurczu mięśnia tzw. teorię przesuwania filamentów (77, 78).

Późniejsze prace w pełni potwierdziły założenia tej teorii i od szeregu lat model skurczu mięśni opierający się na przesuwaniu filamentów jest powszechnie akceptowany. Wzajemne zachodzenie obu rodzajów filamentów stwarza możliwość bezpośredniego kontaktu miozyny z aktyną. Wszystkie badania biochemiczne i fizjologiczne okazały się zgodne z postulowanym modelem, w którym ilość wypustek miozyny wystających na zewnątrz trzonu grubych filamentów wchodzących aktualnie w reakcję z aktyną zależy od stopnia zachodzenia obu rodzajów filamentów na siebie (79). W ostatnich latach uwaga badaczy została skoncentrowana na szcze-

gółach zmian strukturalnych zachodzących w filamentach a nawet w poszczególnych białkach mięśniowych podczas skurczu i rozkurczu. Badania dotyczyły głównie zachowania wypustek miozynowych. Bardzo pomocne w tych pracach okazały się układy modelowe składające się z pojedynczych filamentów aktynowych nie przymocowanych do linii Z oraz z miozyny lub jej fragmentów (13).

W nieobecności ATP miozyna tworzy uorganizowane agregaty z aktyną odpowiadające nieodwracalnej interakcji obu filamentów podczas *rigor mortis*. O wiele bardziej wygodne jest użycie zamiast całej miozyny jej fragmentów H-meromiozyny lub fragmentu S_1 . Otrzymuje się w ten sposób filanty aktyny „dekorowane” miozyną. Fragmenty miozyny przyłączają się pod kątem do długiej osi nici aktynowej tworząc struktury podobne do grotów strzał (rysunek 7A, B) (80).



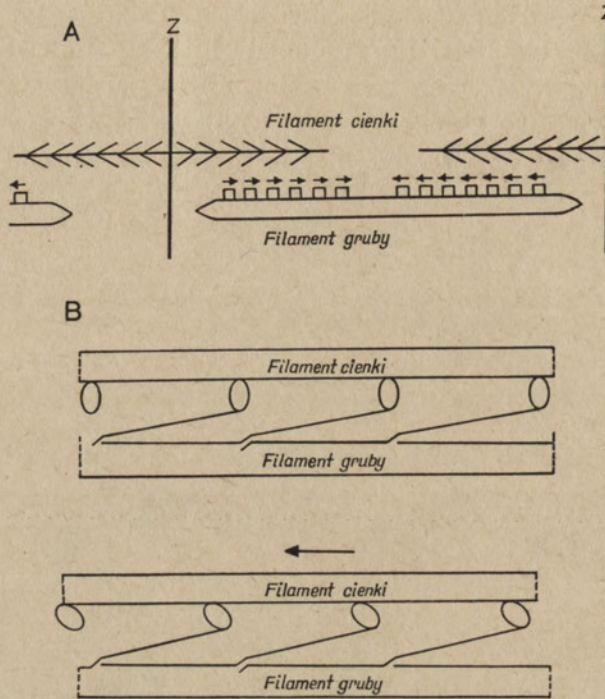
Rys. 7. Filanty aktynowe „dekorowane” fragmentem miozyny S_1

A — obraz mikroskopowo-elektronowy otrzymany techniką negatywowego barwienia, B — model uzyskany na podstawie analizy matematycznej (wg 80)

Analiza takich struktur barwionych negatywowo okazała się nadzwyczaj owocna. Z jednej strony pozwoliła wykazać, że wszystkie monomery aktynowe są równocenne i że do każdego z nich przyłącza się jedna głowa cząsteczki miozyny oraz, że filanty aktynowe wykazują strukturalną polarność (80). Ta strukturalna polarność monomerów aktyny po obu stronach linii Z oraz wypustek miozyny po obu stronach środkowej strefy M wydaje się umożliwiać przesunięcie filamentów w mięśniu *in vivo* (rysunek 8A).

Trójwymiarowa rekonstrukcja „dekorowanych” filamentów aktyny umożliwiła również obliczenie kąta, pod którym wypustki przyłączają się do

aktyny, jest on równy w przybliżeniu 45° . Tworzenie grotów w wyniku interakcji F-aktyny z miozyną jest tak specyficzne, że technika „dekorowania” znalazła ostatnio zastosowanie do identyfikacji filamentów aktyny w innych komórkach poza mięśniową wykazujących obecność prymitywnych układów lokomocyjnych. Takie aktynopodobne filamety znaleziono między innymi w cytoplazmie śluzowców (81), w fibroblastach zarodków kurcząt (82), u ameby (83), w leukocytach (84) oraz w płytkach krwi (85).



Rys. 8. Schemat interakcji grubych i cienkich filamentów,

A — Strukturalna polarność mostków poprzecznych w grubych filamentach i cząsteczek aktyny w cienkich filamentach (wg 88), B — Zmiany orientacji przestrzennej mostków poprzecznych podczas przesuwania filamentów (wg 88)

Równolegle prowadzone badania na całych mięśniach przy użyciu metody dyfrakcji promieni X i mikroskopu elektronowego zmierzały do wykazania zmian kąta nachylenia wypustek miozynowych i odległości od filamentów aktyny w zależności od stanu mięśnia. Pierwsi *R e e d y*, *H o l m e s* i *T r e g e a r* (86) wykazali na mięśniach skrzydeł owadów, że wypustki te nachylone są w stosunku do grubych filamentów w stanie *rigor mortis*, są natomiast ułożone prostopadle do nich w stanie rozkurczu.

H u x l e y (87) porównując mięśnie w stanie *rigor mortis* i w stanie spoczynku wykazał, że mostki poprzeczne muszą być zdolne do obrotu w miejscu wystawania z grubych filamentów tak, że mogą osiągnąć filamety cienkie przy różnej odległości między filamentami i przyłączyć się

zawsze w jednakowy sposób, zapewniający tę samą orientację przestrzenną główki miozyny. Badania H a s e l g r o v e w pracowni H u x l e y a (88) wskazują na radialny ruch mostka poprzecznego podczas skurczu. Tak więc można sądzić, że kiedy mięsień kurczy się mostki poprzeczne ulegają powtarzalnemu cyklowi przemian: początkowo mogą być przymocowane do filamentów aktynowych pod kątem prostym, następnie przez zmiany kąta nachylenia powodują przesunięcie filamentu aktynowego wzdłuż miozynowego, w ostatniej części cyklu połączenie zostaje przerwane i mostek powraca do pozycji wyjściowej (rysunek 8B) (88). Z tymi zmianami konformacyjnymi sprzężona jest defosforylacja ATP dostarczająca energii do wykonania pracy. Obserwacje wskazują na to, że podczas jednego cyklu na jeden mostek poprzeczny przypada rozszczepienie jednej cząsteczki ATP (89, 90).

IV-2. Białka regulujące

Wszystkie powyższe rozważania obejmowały jedynie interakcję miozyny z aktyną zachodzącą w czasie skurczu mięśnia. Już dawno było wiadomo, że tylko wówczas gdy w mięśniu obecny jest ATP interakcja ta jest odwracalna, to znaczy tylko w takich warunkach może nastąpić rozkurcz. Po wyczerpaniu ATP skurcz staje się nieodwracalny i następuje *rigor mortis* (tabela 2).

Tabela 2

Wpływ stężenia Ca^{++} na interakcję aktyny z miozyną

| Stan fizjologiczny mięśnia | Interakcja aktyny z miozyną | (Mg ATP) | Ca^{++} |
|----------------------------|-----------------------------|----------|-----------------|
| rozkurcz | brak | obecne | $\leq 10^{-7}M$ |
| skurcz | odwracalna | obecne | $> 10^{-6}M$ |
| <i>rigor mortis</i> | nieodwracalna | brak | |

Z kolei „teoria wapniowa” skurczu mięśnia postulowała, że czynnikiem zapoczątkowującym skurcz jest uwalnianie wapnia z sarkoplazmatycznego reticulum, podczas gdy ponowna akumulacja tego kationu prowadzi do rozkurczu (1). Badania na układach modelowych wykazały jednak, że czysta aktyna aktywuje miozynę niezależnie od stężenia jonów wapnia. Klucz do wyjaśnienia tego pozornego paradoksu stanowiło dopiero odkrycie białek regulujących — tropomiozyny i troponiny, które decydują o tym, czy aktyna i miozyna mogą ze sobą reagować, a więc czy nastąpi skurcz (91).

Wydaje się, że w nieobecności wapnia interakcja między składnikami troponiny: TN-I i TN-C jest taka, że TN-I jest w stanie blokować współ-

działanie aktyny z enzymatycznym centrum miozyny w wyniku czego aktywność ATP-azy jest bardzo niska, ATP nie jest rozszczepiany i mięśnie pozostają w stanie spoczynku. Zwiększenie stężenia wapnia w mioplaźmie powoduje wiązanie się tego kationu do TN-C. Wiązanie to pociąga za sobą prawdopodobnie zmiany konformacyjne białka tak, że TN-C może wówczas neutralizować działanie inhibitora — TN-I, skutkiem czego następuje interakcja aktyny z miozyną, hydroliza ATP i skurcz. Hipotezę tę popierają ostatnie obserwacje sugerujące, że cząsteczka TN-C istotnie wykazuje pewne zmiany konformacyjne pod wpływem wapnia (92, 93), jak również że ilość wiązanego wapnia przez TN-C zależy od obecności TN-I (94).

Ponieważ jedna cząsteczka troponiny rozmieszczona jest wzdłuż cienkiego filamentu z okresowością co siedem monomerów aktyny (57, 69), powstał problem w jaki sposób może ona skutecznie blokować w stanie rozkurczu mięśnia wszystkie siedem cząsteczek aktyny. Pierwsze próby wyjaśnienia tego mechanizmu uzyskano ostatnio na podstawie analizy metodą dyfrakcji optycznej obrazów mikroskopowoelektronowych parakryształów aktyny oraz badania mięśni w różnych stanach fizjologicznych przy pomocy niskokątowej dyfrakcji promieni X. Hanson i wsp. (57) oraz V i b e r t i wsp. (95) zauważyli przemieszczanie nici tropomiozynowych w cienkich filamentach. Wyniki sugerują, że w rozkurczu nici te wysuwają się na zewnątrz spirali F-aktyny zasłaniając te rejony monomerów aktyny do których następuje przyłączanie wypustek miozyny. W obecności wapnia następuje przesunięcie tropomiozyny w głąb rowka spirali F-aktyny pozwalające na interakcję tego białka z miozyną i skurcz. H u x l e y natomiast zaobserwował, że miejsca cząsteczek F-aktyny do których wiążą się fragmenty miozyny (S_1) pokrywają się z miejscami wiązania tropomiozyny do „niedekorowanych” filamentów tak, że fragmenty te przyłączając się do monomerów aktyny przesuwają nici tropomiozyny głębiej w rowek (96). Wyniki te również sugerują, że w mięśniu spoczynkowym nici tropomiozynowe znajdują się w takim położeniu w rowkach spirali F-aktyny, że blokują przestrzennie przyłączanie się wypustek miozyny zasłaniając odpowiednie rejony cząsteczek aktyny.

Są to pierwsze próby wyjaśnienia w jaki sposób tropomiozyna, chociaż sama bezpośrednio nie wpływa na interakcję aktyny z miozyną, przenosi działanie troponiny wzdłuż długiej osi swej cząsteczki.

PIŚMIENNICTWO

1. Dąbrowska R., Drabikowski W., *Post. Biochem.* 16, 405 (1970).
2. Szent-Györgyi A. G., w *Structure and Function of Muscle II*, red. Bourne G. H., Academic Press, New York 1960, str. 1.

3. Needham D. M., w *Structure and Function of Muscle II*, red. Bourne G. H., Academic Press, New York 1960, str. 55.
4. Bendall J. R., w *Muscles, Molecules and Movement*, red. Heinemann Educational Books Ltd., London 1969, str. 3.
5. Needham D. M., w *Machina Carnis, The Biochemistry of Muscular Contraction in its Historical Developments*, Cambridge University Press, Cambridge 1971, str. 146.
6. Huxley H. E., Hanson J., w *Structure and Function of Muscle I* red. Bourne G. H., Academic Press, New York 1960, str. 183.
7. Huxley H. E., *Science* **164**, 1356 (1969).
8. Weber K., Osborn M., *J. Biol. Chem.* **244**, 4406 (1969).
9. Holtzer A., Lowey S., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1370 (1959).
10. Tonomura Y., Appel P., Morales M. F., *Biochemistry* **5**, 515 (1966).
11. Greshman L. C., Stracher A., Dreizen P., *J. Biol. Chem.* **244**, 2726 (1969).
12. Lowey S., Cohen C., *J. Mol. Biol.* **4**, 293 (1962).
13. Rice R. V., Brady A. C., Depue R. H., Kelly R. E., *Biochem. Z.* **345**, 370 (1966).
14. Zobel C. R., Carlson F. D., *J. Mol. Biol.* **7**, 78 (1963).
15. Lowey S., Slayter H. S., Weeds A. G., Baker H., *J. Mol. Biol.* **42**, 1 (1969).
16. Szent-Györgyi A. G., *Arch. Biochem. Biophys.* **42**, 305 (1953).
17. Mueller H., Perry S. V., *Biochem. J.* **85**, 431 (1962).
18. Kominz D. R., Mitchell E. R., Nihei T., Kay C. M., *Biochemistry* **4**, 2373 (1965).
19. Slayter H. S., Lowey S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1611 (1967).
20. Dreizen P., Gershman L. C., *Biochemistry* **9**, 1688 (1970).
21. Perrie W. T., Perry S. V., *Biochem. J.* **119**, 31 (1970).
22. Sarkar S., Sreter F. A., Gergely J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **68**, 946 (1971).
23. Weeds A. G., Lowey S., *J. Mol. Biol.* **61**, 701 (1971).
24. Lowey S., Risby D., *Nature* **234**, 81 (1971).
25. Kendrick-Jones J., Szentkiralyi E. M., Szent-Györgyi A. G., XXXVII Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 1972, str. 47.
26. Huxley H. E., *J. Mol. Biol.* **7**, 281 (1963).
27. Huxley H. E., Brown W., *J. Mol. Biol.* **30**, 383 (1967).
- 27a. Kąkol I., Grupy tiolowe miozyny a jej struktura i funkcja, P.W.N., Warszawa, 1972.
28. Pepe F. A., *J. Mol. Biol.* **27**, 203 (1967).
29. Masaki T., Takaiti C., Ebashi S., *J. Biochem. (Tokyo)* **64**, 909 (1968).
30. Morimoto K., Harrington W. F., *J. Biol. Chem.* **247**, 3052 (1972).
31. Pepe F. A., *J. Cell. Biol.* **28**, 505 (1966).
32. Knappeis G. G., Carlsen F., *J. Cell. Biol.* **38**, 202 (1968).
33. Starr R., Offer G., *FEBS Letters* **15**, 40 (1971).
34. Offer G. W., XXXVII Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 1972, str. 87.
35. Tsuboi K. K., *Biochim. Biophys. Acta.* **160**, 420 (1968).
36. Spudich J. A., Watt S., *J. Biol. Chem.* **246**, 4866 (1971).
37. Adelstein R. S., Kuehl W. M., *Biochemistry* **9**, 1355 (1970).
38. Elzinga M., *Biochemistry* **9**, 1365 (1970).
39. Straub F. B., Reuer G., *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 455 (1950).
40. Chrambach A., Barány M., Finkelman F., *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 456 (1961).

41. Strzelecka-Golaszewska H., Drabikowski W., *Acta Biochem. Biophys.* **162**, 581 (1968).
42. Oosawa F., Kasai M. J., *J. Mol. Biol.* **4**, 10 (1962).
43. Kasai M., Asakura S., Oosawa F., *Biochim. Biophys. Acta.* **57**, 13 (1962).
44. Hanson J., Lowy J., *Proc. Roy. Soc. (London) B* **160**, 449 (1969).
45. Hanson J., Lowy J., *J. Mol. Biol.* **6**, 46 (1963).
46. Holtzer A., Clark R., Lowey S., *Biochemistry* **4**, 2401 (1965).
47. Ooi T., *Biochemistry* **6**, 2433 (1967).
48. Rowe A. J., *Proc. Roy. Soc. (London) B* **160**, 437 (1964).
49. Peng C. M., Kung T. H., Hsiung L. M., Tsao T. C., *Sci. Sinica* **14**, 219 (1965).
50. Woods E. F., *Biochemistry* **8**, 4336 (1969).
51. Ooi T., Mihashi K., Kobayashi H., *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 1 (1962).
52. Laki K., Maruyama K., Kominz D. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 323 (1962).
53. Drabikowski W., Gergely J., *J. Biol. Chem.* **237**, 3412 (1962).
54. Martonosi A., *J. Biol. Chem.* **237**, 2795 (1962).
55. Drabikowski W., Nowak E., *Eur. J. Biochem.* **5**, 376, (1968).
56. Drabikowski W., Nowak E., Baryłko B., Dąbrowska R., XXXVII Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 1972, str. 245.
57. Hanson J., Lednew W., O'Brien E. J., Bennet P. M., XXXVII Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 1972, str. 311.
58. Haselgrove J. C., XXXVII Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 1972, str. 341.
59. Drabikowski W., Dąbrowska R., Baryłko B., *FEBS Letters* **12**, 148 (1971).
60. Drabikowski W., Rafałowska U., Dąbrowska R., Szpacenko A., Baryłko B., *FEBS Letters* **19**, 259 (1971).
61. Greaser M. L., Gergely J., *J. Biol. Chem.* **246**, 4226 (1971).
62. Wilkinson J. M., Perry S. V., Cole H. A., Trayer I. P., *Biochem. J.* **127**, 215 (1972).
63. Schaub M. C., Perry S. V., Häcker W., *Biochem. J.* **126**, 237 (1972).
64. Hartshorne D. J., Pyun H. Y., *Biochem. Biophys. Acta.* **229**, 698 (1971).
65. Greaser M. L., Gergely J., *Fed. Proc.* **29**, 463 (1970).
66. Drabikowski W., Dąbrowska R., Baryłko B., *Acta Biochim. Polon.* **20**, 181, (1973).
67. Greaser M. L., Gergely J., XXXVII Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 1972, str. 235.
68. Hartshorne D. J., XXXVII Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 1972, str. 225.
69. Ohtsuki I., Masaki T., Nonomura X., Ebashi S., *J. Biochem. (Tokyo)* **61**, 817 (1967).
70. Ebashi S., Ebashi F., *J. Biochem. (Tokyo)* **58**, 7 (1965).
71. Masaki T., Endo M., Ebashi S., *J. Biochem. (Tokyo)* **62**, 630 (1967).
72. Goll D., Suzuki A., Temple J., Holmes G. R., *J. Mol. Biol.* **67**, 469 (1972).
73. Maruyama K., Ebashi S., *J. Biochem. (Tokyo)* **58**, 13 (1965).
74. Briskey E. J., Saraydarian K., Mommaerts W. F. H. M., *Biochem. Biophys. Acta.* **133**, 424 (1967).
75. Drabikowski W., Nowak E., *Eur. J. Biochem.* **5**, 209 (1968).
76. Drabikowski W., Nonomura Y., Maruyama K., *J. Biochem. (Tokyo)* **63**, 761 (1968).
77. Huxley A. F., Niedergengerke R., *Nature* **173**, 971 (1954).

78. Huxley H. E., Hanson J., *Nature* **173**, 973 (1954).
79. Huxley H. E., *Sci. Amer.* **213**, 18 (1965).
80. Moore P. B., Huxley H. E., De Rosier D. J., *J. Mol. Biol.* **50**, 279 (1970).
81. Nachmias V. T., Huxley H. E., Kessel D., *J. Mol. Biol.* **50**, 83 (1970).
82. Yang Y., Perdue J. F., *J. Biol. Chem.* **247**, 4503 (1972).
83. Pollard T., Shelton E., Weihung R., Korn E. D., *J. Mol. Biol.* **50**, 91 (1970).
84. Senda N., Shibata N., Tatsumi N., Kondo K., Hamada K., *Biochim. Biophys. Acta.* **181**, 191 (1969).
85. Bettex-Galland M., Lüscher E. F., *Biochim. Biophys. Acta.* **49**, 536 (1961).
86. Reedy M. K., Holmes K. C., Tregear R., *Nature* **207**, 1276 (1965).
87. Huxley H. E., *Proc. Roy. Soc. (London) B* **178**, 131 (1971).
88. Huxley H. E., *J. Mol. Biol.* **37**, 507 (1968).
89. Mommaerts W. F. H. M., *Physiol. Rev.* **49**, 427 (1969).
90. Davies R. E., w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. M. and Greville G. D., London, Academic Press, 1965 str. 29.
91. Ebashi S., Endo M., *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **18**, 123 (1968).
92. Murray A. C., Kay C. M. *Biochemistry* **11**, 2622 (1972).
93. Eerd J. P., Kawasaki Y. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **47**, 859 (1972).
94. Potter J., Gergely J., *Fed. Proc.* **31**, 1626 (1972).
95. Vibert P. J., Haselgrove J. C., Lowy J., Poulsen F. R., *Nature* **236**, 182 (1972).
96. Huxley H. E., XXXVII Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 1972, str. 361.
97. Dąbrowska R., Baryłko B., Nowak E., Drabikowski W., *FEBS Letters* **29**, 239 (1973).
98. Ebashi S., Endo M., Ohtsuki I., *Q. Rev. Biophys.* **2**, 351 (1969).

BARBARA BARYŁKO *

Charakterystyka i znaczenie białek wiążących wapń

Characterization and Role of the Calcium Binding Proteins

Recent investigations on calcium binding proteins isolated from different animal tissues or cell organelles are reviewed.

Badania ostatnich lat wskazują, że w wielu biologicznych procesach istotną rolę odgrywają białka posiadające wysokie powinowactwo do jonów wapniowych. Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie ogólnej charakterystyki oraz postulowanej funkcji kilku z niedawno wyizolowanych białek, ze zwróceniem szczególnej uwagi na ich zdolność do wiązania wapnia.

I. Białka mięśniowe wiążące wapń

I-1. Troponina

W ostatnich latach ugruntował się pogląd, że regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśnia zachodzi w wyniku zmian w stężeniu wolnego wapnia. Zagadnienia te szeroko omawiał artykuł R. Dąbrowskiej i W. Drabikowskiego (1). Skurcz mięśniowy zapoczątkowany jest wiązaniem przez miofibryle wapnia, uwolnionego z błon sarkoplazmatycznego reticulum (2). Badania ostatnich lat wykazały, że w miofibrylach jedynym miejscem wiązania wapnia potrzebnego do skurczu jest troponina (3, 4, 5). Krzywa Scatcharda wiązania wapnia do troponiny wskazuje na co najmniej dwa rodzaje miejsc wiążących: jednego o wysokiej stałej wiązania, większej od $10^6 M^{-1}$ i drugiego o niskiej — $10^4 M^{-1}$. Troponina wiąże

* Mgr, Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa.

Stosowane skróty: pCMB — p-chlorortęciobenzoesan; NEM — N-etylomaleimid; TN-B — składnik troponinowy wykazujący interakcję z aktyną i tropomiozyną; TN-I — składnik troponinowy hamujący aktywność ATP-azową aktomiozyny; TN-C — składnik wiążący wapń CaBP — (*calcium binding protein*) — białko wiążące wapń, wyizolowane ze śluzówki jelita.

silnie około 4 mole Ca/10⁵g białka i około 11 moli z niską stałą wiązania. Ilość wapnia, silnie związanego z troponiną nie zmienia się w zakresie pH 6,5—8,0 (5). Odczynniki blokujące grupy sulfhydrylowe takie jak pCMB czy NEM, nie mają wpływu na wiązania wapnia do troponiny (3,5). Związany z troponiną wapń może być częściowo wymieniony na inne kationy dwuwartościowe takie jak Cd²⁺, Sr²⁺, Pb²⁺, Mn²⁺. Natomiast Mg²⁺, Ba²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ i Co²⁺ praktycznie nie mają zdolności do wymiany z wapniem. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że powinowactwo kationów dwuwartościowych do troponiny zależy od ich promienia jonowego. Jednakże lantanowce, których promień jonowy jest bardzo zbliżony do promienia jonowego wapnia i które tworzą, podobnie jak wapń, wiązania elektrostatyczne, wymieniają wapń tylko w niewielkim stopniu. Świadczy to, że miejsce wiążące wapń w troponinie jest wysoce specyficzne dla tego kationu (6).

Wyniki analizy sedymentacyjnej, jak i siania molekularnego poprzez Sephadex G-50, G-100 lub G-200, pozwalały uważać troponinę za jednorodną, globularną białko, o ciężarze cząsteczkowym około 85 000 daltonów (7). Dopiero dzięki zastosowaniu wymiennicy jonowych jak DEAE-Sephadex czy SP-Sephadex oraz elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu wykryto, że troponina składa się z trzech składników nazwanych TN-B, TN-I i TN-C o ciężarach cząsteczkowych odpowiednio 40 200, 23 500, 18 300 daltonów. Występują one w stosunku molowym 1 : 1 : 1. Tylko jedna z komponent, TN-C, posiada zdolność wiązania wapnia. TN-C odznacza się dużą stabilnością: jest odporna na trawienie trypsyną; co więcej krótkotrwała inkubacja w temperaturze 100°C nie powoduje zmian jej charakterystycznych właściwości. Analiza aminokwasowa TN-C wykazuje znaczną przewagę aminokwasów kwaśnych w stosunku do zasadowych, tak że wypadkowy ładunek ujemny wynosi około 35 równoważników kwasowych na cząsteczkę, a punkt izoelektryczny przypada na pH 3,8. Cząsteczka TN-C zawiera znaczne ilości fenyloalaniny i niewielką ilość tyrozyny, co uwidacznia się w widmie absorpcji czterema maksimumami w długości fali 253, 259, 265 i 269nm, charakterystycznymi dla reszt fenyloalaninowych oraz w stosunku absorpcji 278/260nm, który wynosi około 1. TN-C wiąże 1 mol Ca ze stałą wiązania rzędu 10⁶M⁻¹. Ilość wapnia wiązana przez TN-C jest więc mniejsza od ilości jaką wiąże cała troponina. Ponieważ pozostałe składniki troponinowe nie wykazują powinowactwa do wapnia, wydaje się prawdopodobne, że wpływają one w jakiś sposób na ilość wapnia związanego przez TN-C (9). Prace Eerda i Kawasaki (10) oraz Murray'a i Kay'a (11) sugerują, że w zależności od stężenia jonów wapniowych w cząsteczce TN-C następują zmiany konformacyjne. Wydaje się, że zmiany te przenoszone przez pozostałe składniki troponinowe i tropomiozynę na system aktomiozynowy pozwalają na interakcję miozyny z aktyną lub ją blokują, regulując w ten sposób cykl skurczowo-rozkur-

czowy. Dokładniejsze omówienie tych zagadnień znajdzie czytelnik w artykule przeglądowym, poświęconym molekularnym podstawom skurczu mięśnia (12).

I-2. Calsequestrin

W stanie rozkurczu stężenie wolnego wapnia w komórce mięśniowej jest bardzo niskie, poniżej $10^{-6}M$, a cały wapń zmagazynowany jest w błonach sarkoplazmatycznego reticulum, które posiadają zdolność do wiązania wapnia, ze stałą wiązania rzędu 10^7M^{-1} .

Ostatnio MacLennan i Wong (13) wyizolowali z błon sarkoplazmatycznego reticulum białko wykazujące wysokie powinowactwo do wapnia. Białku temu, nazwanemu calsequestrin, autorzy przypisują bezpośrednią rolę przy wiązaniu wapnia przez błony sarkoplazmatycznego reticulum. Stanowi ono około 70% wszystkich białek błony. Jego ciężar cząsteczkowy wynosi około 44 000 daltonów. Calsequestrin ma charakter kwaśny, cząsteczka zawiera 146 reszt kwasu asparaginowego i glutaminowego, a jedynie 33 reszty lizyny i arganiny. Wydaje się, że calsequestrin związane jest hydrofobowo z wewnętrzną stroną błon sarkoplazmatycznego reticulum. Calsequestrin posiada zdolność wiązania dość znacznych ilości wapnia. Maksymalna ilość wapnia, jaką może wiązać jedna cząsteczka, wynosi około 40moli ze stałą dysocjacji $4 \times 10^{-5}M$. Niestety, stała wiązania jest zbyt niska, aby akumulację Ca^{2+} przez błony sarkoplazmatycznego reticulum można było wytłumaczyć prostym wiązaniem do calsequestrin, tym bardziej, że wapń nie jest wiązany przez to białko w sposób specyficzny. Kationy takie jak Sr^{2+} czy Cd^{2+} użyte w stężeniach ekwimolarnych do jonów wapniowych, a także KCl, $MgCl_2$, ATP, w stężeniach fizjologicznych, w bardzo dużym stopniu zmniejszają wiązanie wapnia. Calsequestrin jest białkiem termostabilnym, inkubacja w temperaturze 100° tylko w 20% zmniejsza wiązanie wapnia. Odczynniki specyficzne na grupy SH, jak mersalyl i NEM, nie mają wpływu na wiązanie wapnia przez calsequestrin. MacLennan i Wong wysuwają przypuszczenie, że wapń może być wiązany przez grupy karboksylowe kwasu asparaginowego i glutaminowego. Jednakże podany przez autorów wzrost ilości wiazanego wapnia w pH 5—7 wskazuje, że stopień dysocjacji grup anionowych, zaangażowanych w wiązanie wapnia musi również wzrastać w tym zakresie pH, podczas gdy wartości pK dla grup karboksylowych kwasu asparaginowego i glutaminowego wynoszą około 4. Wydaje się więc, że miejscem wiązania wapnia nie są jedynie grupy karboksylowe, ale mogą być także grupy imidazolowe, jak to sugeruje Carvalho (14).

Według ostatnich badań, w błonach sarkoplazmatycznego reticulum znajduje się jeszcze jedno białko o ciężarze cząsteczkowym 57 000 daltonów, mogące brać udział w wiązaniu wapnia (15, 16).

Można więc sądzić, że wyizolowany przez MacLennana calsequestrin nie jest jedynym białkiem błon zaangażowanym w wiązanie wapnia.

I-3. Aktyna

Innym białkiem miofibrylarnym, wykazującym wysokie powinowactwo do jonów wapniowych jest aktyna. Aktyna *in vitro* może występować w dwóch formach: w formie globularnej, zwanej w skrócie G-aktyną i fibrylarną zwanej F-aktyną. Obie formy mogą wzajemnie przechodzić jedna w drugą zależnie od warunków jonowych środowiska. Przejście formy G w F jest procesem polimeryzacji polegającym na łączeniu się cząsteczek G-aktyny w agregaty o wysoce uporządkowanej strukturze. W mięśniach aktyna występuje w formie fibrylarniej. Cząsteczka G-aktyny o ciężarze około 45 000 daltonów wiąże 1 mol wapnia (17, 18) ze stałą dysocjacji niższą niż $10^{-5}M$ (19). Wapń ten może być całkowicie wymieniony na inne kationy dwuwartościowe, które mają promień jonowy zbliżony do promienia jonowego wapnia, takie jak Cd^{2+} , Mn^{2+} . Inne metale dwuwartościowe jak Ni^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , których promień jonowy jest mniejszy, ulegają tylko częściowej wymianie. Stront i bar o promieniu jonowym większym od wapniowego, praktycznie nie ulegają wymianie z wapniem. Ta korelacja pomiędzy promieniem jonowym a wymienialnością sugeruje, że jednym z głównych czynników określających zdolność kationów do zastępowania wapnia jest konfiguracja miejsca wiążącego (18, 20, 20a). G-aktyna posiada również związany ATP w ilości 1 mola na mol białka. Zaobserwowano ścisłą korelację pomiędzy wiązaniem wapnia i ATP. Usunięcie wapnia z G-aktyny przez traktowanie EDTA powoduje bardzo szybkie uwolnienie ATP i prowadzi do nieodwracalnej denaturacji białka (21). Cząsteczka G-aktyny posiada 5 grup SH, które odznaczają się różną reaktywnością. Zablokowanie niektórych z nich połączone jest z uwolnieniem wapnia i ATP oraz zanikaniem zdolności do polimeryzacji (17, 22, 23). Ogólnie przyjęty jest pogląd, że zarówno wapń jak i nukleotyd są konieczne do utrzymania odpowiedniej struktury aktyny. Wyizolowana F-aktyna wykazuje również zdolność do wiązania wapnia. Jednakże wapń związany z F-aktyną jest bardzo trudno wymienialny, a wymiana może nastąpić jedynie po sonifikacji (24, 25). Do niedawna sądzono, że i w mięśniach F-aktyna zawiera związany wapń. Ostatnie badania jednak (16, 27) sugerują, że *in vivo* kationem związanym z F-aktyną jest magnez.

I-4. Parwalbuminy

Parwalbuminami nazwano grupę białek sarkoplazmatycznych, występujących w mięśniach białych niższych kręgowców żyjących w wodzie tj. ryb i płazów. Stanowią one około 5% wszystkich białek mięśniowych.

Parwalbuminy, mające niski ciężar cząsteczkowy, można oddzielić od albumin o wysokim ciężarze cząsteczkowym stosując Sephadex G-75. Uzyskana frakcja jest heterogenna, a dalszy rozdział na DEAE-celulozie ujawnia obecność wielu białek. Tak np. z mięśni karpia i z mięśni dorsza wyizolowano po trzy frakcje (28, 29, 30) i po dwie frakcje z mięśni ryb chrzęstnoszkieletowych (31) i żaby (32). Wszystkie wyizolowane parwalbuminy mają podobne własności. Są bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie. Ich ciężar cząsteczkowy wynosi od 9 000 do 12 000 daltonów. Wszystkie są kwaśne, a ich punkt izoelektryczny leży pomiędzy pH 4,0—4,5.

Cała grupa parwalbumin ma bardzo charakterystyczny skład aminokwasowy. Aminokwasy takie jak metionina, tyrozyna, tryptofan i prolina występują tylko w niektórych frakcjach i to w niewielkich ilościach, np. główna frakcja parwalbuminowa z dorsza nie zawiera tryptofanu ani tyrozyny. Wysoki procent wszystkich aminokwasów stanowią natomiast fenylalanina, a także kwas asparaginowy i glutaminowy. Inną charakterystyczną cechą parwalbumin jest brak wolnego N-końcowego aminokwasu w cząsteczce, który występuje w formie zacetylowanej (30, 31, 33). Najlepiej poznana jest budowa cząsteczek głównej frakcji parwalbumin dorsza (30) i karpia (33). Sekwencje aminokwasowe są bardzo podobne dla obu białek, których cząsteczki składają się z 108 reszt aminokwasowych, a aminokwasem C-końcowym dla obu jest glicyna. α -heliks stanowi około 40% struktury cząsteczki parwalbuminy pochodzącej z frakcji uzyskanej z mięśni karpia i 52 aminokwasy, leżące w sześciu regionach, znajdują się w obszarze tej struktury.

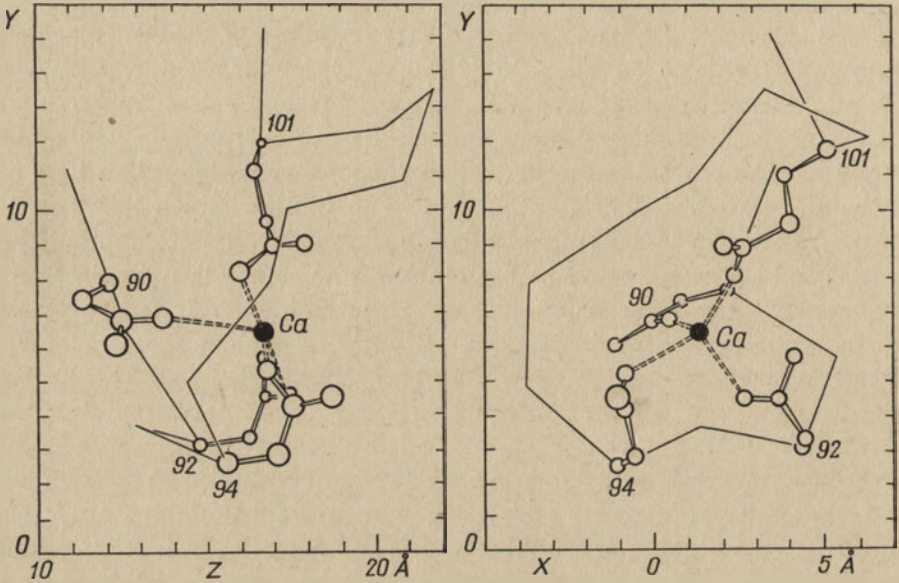
Parwalbuminy wykazują zdolność do wiązania wapnia. Białka głównej frakcji parwalbumin dorsza i dwóch frakcji parwalbuminowych z mięśni żaby posiadają dwie klasy miejsc wiążących wapń: jedna klasa o wysokiej stałej wiązania ($K_d = 0,1 \times 10^{-6} - 0,4 \times 10^{-6} M$) i druga klasa o niższej stałej wiązania ($K_d = 2 \times 10^{-6} - 9 \times 10^{-6} M$). Białka te wiążą dwa mole wapnia na mol białka z wysoką stałą wiązania i 3—6 moli wapnia na mol białka z niską stałą wiązania (34).

Parwalbuminy łatwo ulegają krystalizacji (28, 29, 30, 33). Analiza rentgenograficzna kryształów parwalbumin z mięśni karpia pozwoliła wykazać, że wapń może być związany przez trzy reszty kwasu asparaginowego (Asp) (90, 92, 94) i jedną resztę kwasu glutaminowego (Glu) (101), (rysunek 1). Wstępne obserwacje autorów sugerują, że drugi jon wapnia może wiązać się do dwu reszt kwasu asparaginowego (Asp 51, 53) i dwu reszt kwasu glutaminowego (Glu 59, 62) (33).

Rozdzielone, homogene białka parwalbumin poddawano trawieniu chymotrypsyną i trypsyną, a następnie otrzymane peptydy rozfrakcjonowano metodą chromatografii bibułowej. Otrzymane podjednostki peptydowe frakcji pochodzących z mięśni różnych ryb były bardzo podobne, co świadczy o ich zbliżonej sekwencji aminokwasowej (35).

Rola parwalbumin nie jest jeszcze znana. Są sugestie, że białka te

mogą spełniać u niższych zwierząt rolę czynnika wiążącego wapń podczas skurczu mięśnia. W takim przypadku rola ich byłaby podobna do roli, jaką odgrywa jedna z komponent troponinowych TN-C podczas skurczu mięśnia szkieletowego ssaków.



Rys. 1. Koordynacyjne wiązanie wapnia przez Asp-90, Asp-92, Asp-94 i Glu-101 w głównej frakcji parwalbuminowej karpia (wg 33).

II. Białka wiążące wapń w tkance nerwowej

Jony wapnia są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania tkanki nerwowej. Są one bowiem konieczne do utrzymania bariery przepuszczalności błony komórki nerwowej w stanie spoczynkowym jak i w stanie pobudzonym, jak również w procesie uwalniania neurotransmiterów; uwolnienie transmittera wymaga szybkiego wzrostu stężenia wolnego Ca^{+2} , brak jonów Ca^{+2} blokuje uwalnianie transmittera (cyt. za 36, 37). Rolę w utrzymaniu odpowiedniego stężenia jonów wapniowych w komórce nerwowej mogłyby odgrywać mitochondria i endoplazmatyczne reticulum, które — jak się wydaje — mają zdolność gromadzenia wapnia. Jest również bardzo prawdopodobne, że ważną rolę w regulacji stężenia wapnia w komórce odgrywa błona komórkowa, aktywnie usuwająca wapń na zewnątrz (38, 39).

II-1. Fosfoproteid wiążący wapń

Badania zmierzające do określenia substancji wiążących wapń w komórce nerwowej zapoczątkowali Wolff i Siegel (36, 37). Autorzy ci

wyzolowali z tkanki mózgowej świni dwa białka o wysokim powinowactwie do wapnia. Obydwa białka mają niski ciężar cząsteczkowy (11 500 i 13 000 daltonów). Ich skład aminokwasowy jest podobny: zawierają duże ilości kwasu asparaginowego i glutaminowego, a także treoniny, seryny, leucyny i glicyny. Jedno z tych białek, o ciężarze cząsteczkowym 11 500 posiada w cząsteczce 10 reszt fosforanowych, jest więc fosfoproteidem. Fosfoproteid wiąże 1 mol wapnia na mol ze stałą dysocjacji $2,5 \times 10^{-5} M$. Wiązanie wapnia jest zależne od pH, optimum wiązania przypada na pH 7,4. Wapń związany z tym białkiem jest uwalniany w obecności 0,1 M NaCl, podczas gdy KCl w tym samym stężeniu nie zmienia wiązania wapnia. Fakt ten może sugerować pewną zależność pomiędzy depolaryzacją błony nerwowej a uwalnianiem wapnia (40). Poddanie fosfoproteidu działaniu alkalicznej fosfatazy powoduje zmniejszenie zdolności do wiązania wapnia, co wskazuje na udział reszt fosforanowych. Rola biologiczna frakcji białkowych wiążących wapń jak również ich lokalizacja są przedmiotem dalszych badań. Istnieją sugestie, że jedno z tych białek może brać udział w transporcie wapnia do komórki nerwowej, natomiast drugie może być włączone w regulację stężenia wolnego wapnia wewnątrz komórki.

II-2. Białko S-100

Innym białkiem charakterystycznym dla tkanki nerwowej, wykazującym powinowactwo do jonów wapniowych, jest białko S-100. Zostało ono wyizolowane po raz pierwszy przez Moore'a, który nadał mu tę nazwę w celu podkreślenia, że jest ono całkowicie rozpuszczalne w nasyconym siarczanie amonu w pH obojętnym (41). Badania immunologiczne białek S-100 pochodzących z tkanki mózgowej różnych kręgowców jak ryb, płazów, ptaków i ssaków (41, 42, 43) wykazywały duże podobieństwo. Wszystkie one reagowały jednakowo z przeciwciałem anti-S-100 wołu.

Ciężary cząsteczkowe białek S-100 leżą w granicach 20—25 000 daltonów. Skład aminokwasowy białek pochodzących z różnych źródeł jest również podobny. Zawierają one znacznie większe ilości kwasu asparaginowego i glutaminowego niż aminokwasów zasadowych, co nadaje im elektroujemny charakter. Cząsteczka białka S-100 posiada 1 mol tryptofanu, 3 mole tyrozyny i 3 grupy SH. Fenyloalanina występuje w dość dużych ilościach, a stosunek tyrozyny do fenyloalaniny jest niski.

Calissano i wsp. (44) badali wpływ jonów Ca^{+2} na białko S-100 wyizolowane z mózgu wołu. Białko S-100 wiąże 8—10 moli wapnia ze stałą dysocjacji rzędu $10^{-8} M$. Pomimo tak niskiej stałej wiązania, wapń ma znaczny wpływ na strukturę cząsteczki. Widma różnicowe wskazują, że jony wapnia „odmaskowują” tryptofan, a także dwie reszty tyrozynowe i część reszt fenyloalaninowych. Wapń „odsłania” również dwie z trzech grup SH, które w jego obecności są zdolne reagować z DTNB. W obecności EDTA — tryptofan, reszty tyrozynowe, fenyloalaninowe i grupy SH są

„zamaskowane”. Zaobserwowano też wpływ wapnia na rozkład białka S-100 przez enzymy proteolityczne, przy czym wpływ ten był znacznie większy w przypadku chymotrypsyny niż trypsyny. Jest to zgodne z obserwacjami, wskazującymi, że wapń wywiera wpływ na budowę cząsteczki w rejonie aminokwasów aromatycznych.

Działanie wapnia jest specyficzne i inne kationy dwuwartościowe np. Mg^{+2} czy Sr^{+2} , nie powodują w cząsteczce białka S-100 prawie żadnych zmian. Białko S-100 jest termolabilne, inkubacja w temperaturze powyżej 80° powoduje całkowity zanik zdolności do reagowania z przeciwciałami (42). Obecność wapnia w czasie ogrzewania zapobiega całkowitej inaktywacji białka S-100.

Do niedawna sądzono, że białko S-100 jest białkiem jednorodnym. Eluowane było jako pojedynczy pik z DEAE-celulozy, DEAE-sephadex oraz Sephadex G-100; migruje ono jako pojedynczy prążek na żelu poliakrylamidowym, również analiza sedymentacyjna wykazywała homogenność preparatu białka S-100. Jednakże okazało się, że białko S-100 można rozdzielić na szereg frakcji, stosując różne bufory i stężenia akrylamidu. R u s c a i C a l i s s a n o, rozdzielając białka S-100 na żelu poliakrylamidowym w obecności wapnia, otrzymali 5 frakcji, podczas gdy w obecności EDTA uzyskali tylko 1 frakcję (45). Badając heterogenność białka S-100 A n s o r i N e u h o f f wywnioskowali, że pojawienie się szeregu prążków może być związane z utlenianiem się grup SH obecnych w tym białku, przez inicjatory polimeryzacji żelu np. nadsiarczanem amonu (46). Jednakże prace z grupy M a n d e l'a (47) wydają się świadczyć, że frakcje białka S-100 nie są artefaktami powstałymi w czasie procedury rozdzielania na żelu poliakrylamidowym. Autorzy stwierdzili, że białko S-100 z mózgu wołu rozdziela się na dwa składniki, o dużej ruchliwości elektroforetycznej (*fast migrating component* — FMC) i mniejszej ruchliwości elektroforetycznej (*slow migrating component* — SMC). Stosunek tych dwóch składników jest charakterystyczny dla danego obszaru mózgu. Zaobserwowano również różnice gatunkowe w występowaniu tych dwu frakcji, np. w mózgu świni 86% stanowi frakcja o mniejszej ruchliwości, natomiast w mózgu owcy 95% stanowi frakcja o dużej ruchliwości elektroforetycznej. Różnice w składzie aminokwasowym preparatów S-100 pochodzących z tych zwierząt, jak również różnice w końcowych aminokwasach wskazują, że są to dwa odrębne białka.

Heterogenność białka S-100 może być wynikiem różnej kombinacji kilku łańcuchów polipeptydowych i może być podobnego typu jak w przypadku izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej. Hipotezę tę potwierdzałyby dane uzyskane przez D a n n i e s i L e v i n a (48). Autorzy ci, rozdzielając preparat białka S-100 z mózgu wołu na żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu otrzymali jeden prążek, odpowiadający ciężarowi cząsteczkowemu 7 000 daltonów. Wskazywałoby to na podjednostkową strukturę białka S-100. Ciężar cząsteczkowy białka S-100, ozna-

czony metodą siania molekularnego, wynosi około 21 000, można więc przypuszczać, że jest to trimer złożony z trzech podjednostek o ciężarze cząsteczkowym 7 000.

Lokalizacja białka S-100 jest niezwykle trudna ze względu na jego dobrą rozpuszczalność. Są dane wskazujące na jego obecność głównie w cytoplazmie komórek glejowych i w jądrach neuronów (49, 50).

Rola białka S-100 nie jest jeszcze ustalona. De Robertis obserwował, że podanie przeciwciał anti-S-100 w warunkach *in vitro* powoduje zniszczenie zakończeń nerwowych. Zastosowanie przeciwciał *in vivo* powoduje zanik własności elektrofizjologicznych u mięczaków (51). Calissano i Bangham zaobserwowali, że białko S-100 w obecności jonów wapniowych zwiększa przepuszczalność błony liposomalnej dla kationów (52).

Pewną korelację zaobserwowano pomiędzy syntezą białka S-100 a procesem uczenia się (53). Po treningu szczurów wzrastała synteza białka S-100 w komórkach hipokampa. Wprowadzenie przeciwciał anti-S-100 dokomorowo, hamowało proces „uczenia się” nie wpływało natomiast na ogólne zachowanie się zwierząt.

III. Białko tkanki chrzęstnej

Wykazano, że w kostniejącej chrząstce znajduje się substancja o wysokim powinowactwie do jonów wapniowych (54, 55). Wittur i wsp. (56) stwierdzili, że jest to glikoproteid o ciężarze cząsteczkowym około 200 000 daltonów. Związek ten posiada dwa rodzaje miejsc wiążących wapń — o stałej dysocjacji rzędu $10^{-7}M$ i $10^{-4}M$. Cząsteczka glikoproteidu wiąże 2 mole wapnia ze stałą dysocjacji $10^{-7}M$ i aż 600 moli ze stałą dysocjacji $10^{-4}M$. Czerwień rutenowa hamuje wiązanie wapnia do obydwu miejsc wiążących. Fakt ten świadczy, że wapń jest wiązany przez komponentę cukrową. Glikoproteid ten znaleziono zarówno w chrząstce kostniejącej jak i w chrząstce nie ulegającej kostnieniu. Sugerowana rola tego związku w procesie kostnienia pozostaje więc nadal nie wyjaśniona.

IV. Białko jelitowe wiążące wapń

Wapń dostarczany organizmowi z pokarmem jest absorbowany w komórkach nabłonkowych jelita. Absorpcja wapnia jest ściśle związana z obecnością witaminy D. U zwierząt rachitycznych (z niedoborem witaminy D), absorpcja wapnia jest bardzo mała, natomiast po podaniu witaminy D, znacznie wzrasta. Pojawienie się specyficznej frakcji białkowej w śluzówce jelita, wiążącej wapń, po raz pierwszy zaobserwowali Wasserman i Taylor (57, 58). Frakcję tę nazwano *calcium binding protein* — CaBP. Stanowi ona około 2,5% całkowitych rozpuszczalnych białek

śluzówki jelita. Ciężar cząsteczkowy tej frakcji, oznaczany zarówno metodą siania molekularnego przy użyciu Sphadex G-100, jak i na żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu, wynosi około 28 000 daltónów. Analiza składu aminokwasowego wskazuje, że cząsteczka CaBP zawiera znaczną ilość leucyny, lizyny, alaniny oraz bardzo dużo kwasu asparaginowego i glutaminowego (odpowiednio 28,4 i 31,8 moli na mol), które to aminokwasy nadają białku kwaśny charakter. Punkt izoelektryczny CaBP leży pomiędzy pH 4,0—4,4. Pomiar dychroizmu kołowego sugerują, że α -heliks stanowi 30—40% struktury cząsteczki CaBP (59).

Ilość wapnia, jaka może być związana przez CaBP, zależy od szeregu czynników, między innymi od pH (60). CaBP posiada dwa optima wiązania wapnia — przy pH 6,6 oraz przy pH 9,6. W pH 7,2 jedna cząsteczka CaBP wiąże 1 mol wapnia ze stałą dysocjacji $4 \times 10^{-6} \text{M}$. W obecności jonów Na^+ i K^+ obserwowano niewielkie zmniejszenie zdolności do wiązania wapnia. Nie jest jednak wiadomo, czy jest to kompetycja jonów Na^+ lub K^+ do miejsca wiążącego wapń, czy też zachodzą w tym przypadku zmiany konformacyjne cząsteczki. Wykazano także, że kationy takie jak stront i bar, które są absorbowane przez jelito są również wiązane przez CaBP. Wiązaniu tych kationów towarzyszy zmniejszenie ilości wiążanego wapnia. Powinowactwo dla tych kationów jest jednak dużo niższe niż dla wapnia. Stała dysocjacji dla Sr^{+2} jest rzędu 10^{-4}M , dla baru 10^{-3} . Również Zn^{+2} , Cd^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} i Fe^{+2} , użyte w dużym nadmiarze w stosunku do Ca^{+2} ($\text{Me}^{+2} — 1 \text{mM}$, $\text{Ca}^{+2} — 5 \times 10^{-6} \text{M}$) zmniejszały wiązanie wapnia.

Zaobserwowano, że z wielu badanych związków organicznych, jedynie lizolecytyny mają hamujący wpływ na wiązanie wapnia przez CaBP. Działanie lizolecytyny próbuje się tłumaczyć w następujący sposób: lizolecytyna zawiera grupę acylową oraz czwartorzędową grupę amoniową w reszcie cholinowej. Łącząc się z białkiem grupa acylowa może tworzyć hydrofobowe wiązanie z niepolarnym regionem cząsteczki CaBP w taki sposób, że dodatnio naładowany azot w reszcie cholinowej wiąże się w miejscu wiązania wapnia. Za sugestią tą przemawia stwierdzenie, że inne pochodne cholinowe, nie posiadające polarnej grupy acylowej są bez wpływu. Stwierdzono również, że grupy SH w cząsteczce CaBP nie biorą udziału w wiązaniu wapnia. Zablokowanie grup SH N-etylomaleimidem, jodoacetamidem jak również obecność merkaptoetanolu, który zapobiega wytwarzaniu się mostków S—S, nie mają wpływu na zdolność CaBP do wiązania wapnia. Cukry takie jak laktoza, sacharoza, fruktoza, a także aminokwas lizyna zwiększające absorpcję wapnia przez śluzówkę jelita również nie mają wpływu na wiązanie wapnia przez CaBP.

Frakcje białkowe wiążące silnie wapń, pojawiające się w śluzówce jelita w obecności witaminy D, wyizolowano z wielu zwierząt (60, 61, 62, 63). Ciężary cząsteczkowe CaBP otrzymanych ze śluzówek jelita szczura, świni i człowieka są rzędu 12 000—13 000 daltónów, a więc dwukrotnie niższe niż ciężar cząsteczkowy CaBP wyizolowanego z kurczaków. Frakcje biał-

kowe — IIA i IIB, występujące w śluzówce szczura w obecności witaminy D wiążą 1 mol wapnia na mol białka, z różną stałą wiązania (IIA — $3,5 \times 10^6$ i IIB — $5,5 \times 10^6 M^{-1}$). Ruchliwość tych dwu białek w elektroforzezie zależy od obecności jonów Ca^{+2} . Po usunięciu wapnia przez dodanie EDTA, ruchliwość ich znacznie zwiększa się. Różnice w ciężarach cząsteczkowych i stałej wiązania wapnia białka CaBP z różnych źródeł autorzy przypisują różnicom gatunkowym (61).

Stosując znakowane fluoresceiną przeciwciała anty—CaBP wykazano, że białko CaBP jest zlokalizowane na powierzchni mikrokosmków jelita, a także w komórkach kubkowych (64). Lokalizacja CaBP jak również jego własności wskazują, że odgrywa ono rolę w transporcie wapnia przez komórki nabłonkowe jelita. Najbardziej prawdopodobne wydaje się przypuszczenie, że białko to wiąże wapń na powierzchni komórek nabłonkowych.

Białko wiążące wapń, o podobnym charakterze do CaBP z jelita, wyizolowano ostatnio z nerki człowieka (65). Ciężar cząsteczkowy tego białka wynosi około 25 000 daltonów. W elektroforezie na żelu poliakrylamidowym frakcja ta wędruje szybko do anody, co świadczy o jej ujemnym ładunku. Obserwacje Pia zolo i wsp. wskazują, że absorpcja wapnia w nerce może być również zależna od witaminy D.

W homogenatach śluzówki jelita zwierząt rachitycznych występuje frakcja białkowa, nazwana frakcją A, której ilość znacznie maleje po podaniu zwierzęciu witaminy D (66,67). Równolegle do tego procesu wzrasta ilość białka wiążącego wapń. Autorzy wysuwają przypuszczenie, że witamina D, a właściwie jej aktywna forma — 1,25-dwuhydroksycholekalciferol (68), powoduje przekształcenie białka A w CaBP. Ponieważ frakcja A ma wyższy ciężar cząsteczkowy niż CaBP, rola witaminy D może polegać na stymulacji hydrolizy białka A do fragmentu, który posiada zdolność do wiązania wapnia.

V. Mitochondrialne białka wiążące wapń

Aktywny transport wapnia przez błony mitochondrialne zachodzi przy udziale specyficznego przenośnika lub układu przenośników. Na przykład Moore (69) stwierdził, że czerwien rutenowa, barwnik specyficzny dla komponenty cukrowej, hamuje transport wapnia przez błony mitochondrialne. Uzyskane wyniki wskazują, że heterosacharydy, glikoproteidy lub glikolipidy, mogą brać udział w transporcie wapnia przez te błony.

Frakcja glikoproteidowa, zdolna do silnego wiązania wapnia, została wyizolowana ostatnio przez Sottocase i wsp. z mitochondriów wątroby wołu (70). Ciężar cząsteczkowy badanej frakcji autorzy określili na około 42 000 daltonów. Frakcja ta zawierała znaczne ilości węglowodanów:

na 10⁵g białka znaleziono 1,88 mola kwasu siałowego, 7,60 mola heksozamin (głównie galaktozoaminy i glukozoaminy), około 19 moli cukrów obojętnych (głównie glikozy i ksylozy) a także około 30% fosfolipidów. Wyizolowany glikoproteid jest bogaty w kwas asparaginowy i glutaminowy, glicynę i serynę, a ubogi w aminokwasy aromatyczne. Badając zdolność tego glikoproteidu do wiązania wapnia stwierdzono optimum wiązania przy pH 8,4. Stałe wiązania w różnych pH zmieniają się w granicach 10⁷—10⁵M⁻¹ (71). Krzywa Scatcharda wskazuje na dwa rodzaje miejsc wiązania wapnia. W optymalnych warunkach cząsteczka glikoproteidu posiada 3 miejsca silnie wiążące wapń o stałej dysocjacji rzędu 10⁻⁷M. Analogicznie jak w całych mitochondriach sole lantanu hamują silne i słabe wiązania wapnia. Czerwień rutenowa także zmniejsza zdolność do wiązania wapnia, co sugeruje, że reszty cukrowe mogą być zaangażowane w tym procesie. Czynniki rozprzegające oksydatywną fosforylację jak np. 2,4-dwunitrofenol, a także inhibitory łańcucha oddechowego (np. antymycyna A) i transportu energii (oligomycyna i walinomycyna) nie mają wpływu na wiązanie wapnia przez glikoproteid.

Tabela 1

| Materiał biologiczny | Białka | C. cząst. | Parametry wiązania wapnia | | | | Miejsce wiązania wapnia |
|-----------------------|------------------------------------|-----------|---------------------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------------------------|
| | | | n ₁ | K ₁ [M] | n ₂ | K ₂ [M] | |
| Tkanka mięśniowa | TN-C (8) | 18 300 | 1 | 10 ⁻⁷ | | | |
| | Calsequestrin (13) | 44 000 | 40 | 4 × 10 ⁻⁵ | | | reszty kw. glu. i asp. |
| | Aktyna (19, 20) | 45 000 | 1 | 10 ⁻⁵ | | | |
| | Parwalbuminy (33, 34) | 12 000 | 2 | 10 ⁻⁷ | 3—6 | 2—9 × 10 ⁻⁶ | kw. asp 90, 92, 94 i kw. glu 101 |
| Tkanka nerwowa | Fosfoproteid (37) | 11 500 | 1 | 2,5 × 10 ⁻⁵ | | | |
| | S-100 (44) | 21 000 | 8—10 | 10 ⁻³ | | | |
| Chrząstka | Glikoproteid (56) | 200 000 | 2 | 10 ⁻⁷ | 600 | 10 ⁻⁴ | reszty cukrowe |
| Jelito | CaBP (59) | 28 000 | 1 | 4 × 10 ⁻⁶ | | | |
| Błony mitochondrialne | Glikoproteid rozpuszczalny (70) | 42 000 | 3 | 10 ⁻⁷ | 25 | 10 ⁻⁵ | reszty cukrowe |
| | Glikoproteid nierozpuszczalny (72) | 67 000 | 4 | 10 ⁻⁶ | 60 | 10 ⁻⁵ | |

Obliczenia wskazują, że glikoproteid ten stanowi 0,5—1% całkowitej ilości białek mitochondrialnych a ilość wapnia związana silnie przez to białko jest równa ilości wapnia jaką mogą związać silnie całe mitochondria. Wydaje się, że ta frakcja glikoproteidowa — izolowana przez S o t t o c a s e e i wsp. — pochodzi głównie z przestrzeni międzybłonowej. L e h n i n g e r

i wsp. (72) otrzymali z mitochondriów również glikoproteid wiążący wapń, nierozpuszczalny w wodzie, o ciężarze cząsteczkowym 67 000 daltonów. Frakcja ta zawiera na 10⁵g białka 4 mole heksozamin, około 440 moli cukrów obojętnych i niewielkie ilości kwasu siałowego oraz około 900 moli fosforu na 10⁵g, z czego 135 moli nie ulega ekstrakcji mieszaniną chloroformu z metanolem, co sugeruje, że fosfor ten jest związany z białkiem. Wyizolowana przez Lehningera frakcja jest więc glikolipofosfoproteidem, wykazującym znaczne powinowactwo do jonów wapniowych. Krzywa Scatcharda wskazuje na dwa rodzaje miejsc wiążących wapń. Stała dysocjacji dla silnego wiązania wynosi około $4 \times 10^{-6}M$, a ilość miejsc wiążących — 4 mole/mol białka, stała dysocjacji dla słabego wiązania jest rzędu $5 \times 10^{-4}M$, a ilość miejsc wiązania — 60 moli na mol białka.

Czynnik otrzymany przez Lehningera wykazuje duże podobieństwo do czynnika rozpuszczalnego, wyizolowanego przez Sottocase (70). Być może, nierozpuszczalne białko Lehningera jest zdenaturowaną formą białka rozpuszczalnego, otrzymanego przez Sottocase i wsp. Nie można jednak wykluczyć, że oba czynniki są różne; obydwaj biorą udział w transporcie wapnia, ale zlokalizowane są w innym miejscu błony mitochondrialnej.

Uwagi końcowe

Omówione białka, pomimo, że występują w różnych tkankach i spełniają różne funkcje, posiadają wiele cech wspólnych. Wszystkie oprócz glikoproteidu wyizolowanego przez Lehningera z mitochondriów są rozpuszczalne w wodzie, a ich ciężary cząsteczkowe są na ogół niskie. Stałe wiązania leżą w granicach 10^7 — 10^5M^{-1} . Jedynie białko S-100 wykazuje stosunkowo słabe wiązania. Jednakże wpływ wapnia na strukturę cząsteczki białka S-100 jest tak specyficzny, że wydawało się celowym omówienie tego białka razem z białkami wykazującymi wysokie powinowactwo do jonów wapniowych. Ciężary cząsteczkowe omawianych białek oraz ich parametry wiązania wapnia zestawiono w tabeli 1. Wszystkie z tych białek charakteryzuje wysoka zawartość aminokwasów kwaśnych w stosunku do zasadowych, co nadaje im ładunek ujemny, a ilość obecnych w nich reszt fenyloalaniny jest wyższa niż tyrozyny (tabela 2). Tylko w stosunku do niektórych z tych białek istnieją dotychczas sugestie co do udziału poszczególnych reszt aminokwasów w wiązaniu wapnia. Tak np. aminokwasy kwaśne wydają się być miejscem wiązania wapnia w przypadku parwalbumin i calsequestrin, natomiast dla glikoproteidów sugeruje się, że bezpośredni udział w wiązaniu wapnia biorą reszty cukrowe.

Wiele, nieraz zasadniczych, problemów dotyczących struktury i funkcji omówionych w niniejszym artykule białek pozostaje nadal niewyjaśnio-

nych. Jeśli rozważyć jednak, że z wyjątkiem aktywny, wszystkie one zostały wykryte i wyizolowane dopiero w ostatnich latach to i tak postęp w tej dziedzinie jest ogromny.

Tabela 2

| Aminokwasy mole/10 ³ g białka | Białka tkanki mięśniowej | | | | Białka tkanki nerwowej | | | Jelito |
|---|--------------------------|---------------------------|----------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------|--------------|
| | TN-C (8) | Calsequ- strin (13) | Aktyna (73) | Parwal- buminy (30) | Białko „13 000” (36) | Fosfo- proteid (37) | S-100 (48) | CaBP (59) |
| Tyrozyna | 8,4 | 13,6 | 33,8 | 0 | 10,8 | 43,4 | 14,3 | 30,0 |
| Fenyloalanina | 52,0 | 54,6 | 27,1 | 83,4 | 54,6 | 61,0 | 57,2 | 39,8 |
| Kw. glutaminowy | 188,0 | 163,0 | 92,0 | 83,4 | 118,0 | 183,0 | 172,0 | 113,5 |
| Kw. asparaginowy | 133,5 | 168,0 | 80,5 | 100,0 | 118,0 | 125,0 | 105,0 | 102,0 |
| Suma aminokwasów kwaśnych | 321,5 | 331,0 | 172,5 | 183,4 | 236,0 | 308,0 | 277,0 | 215,5 |
| Arginina | 32,3 | 15,9 | 41,8 | 8,3 | 23,0 | 8,7 | 9,5 | 17,8 |
| Lizyna | 51,4 | 59,2 | 43,4 | 100,0 | 119,0 | 61,0 | 38,0 | 70,6 |
| Suma aminokwasów zasadowych | 83,7 | 75,1 | 85,2 | 108,3 | 142,0 | 69,7 | 47,5 | 88,4 |
| Wypadkowy ła- dunek ujemny | 237,8 | 255,9 | 87,3 | 75,1 | 94,0 | 238,3 | 229,5 | 127,1 |

PIŚMIENNICTWO

1. Dąbrowska R., Drabikowski W., *Post. Biochem.* **16**, 405 (1970).
2. Ebashi S., Endo M., *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **18**, 123 (1968).
3. Ebashi S., Kodama A., Ebashi F., *J. Biochem.* (Tokyo) **64**, 465 (1968).
4. Fuchs F., Briggs F. N., *J. Gen. Physiol.* **51**, 655 (1968).
5. Drabikowski W., Baryłko B., *Acta Biochim. Polon.* **18**, 353 (1971).
6. Fuchs F., *Biochim. Biophys. Acta* **245**, 221 (1971).
7. Drabikowski W., Nowak E., Baryłko B., Dąbrowska R., XXXVII Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, **245**, 1972.
8. Drabikowski W., Dąbrowska R., Baryłko B., *Acta Biochim. Polon.* **20**, 181 (1973).
9. Potter J., Gergely J., *Fed. Proc.* **31**, 501 (1972).
10. Eerd J.-P., Kawasaki Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **47**, 859 (1972).
11. Murray A. C., Kay C. M., *Biochemistry* **11**, 2622 (1972).
12. Dąbrowska R., Drabikowski W., *Post. Biochem.* (praca przygotowana do druku).
13. MacLennan D. H., Wong P.T.S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 1231 (1972).
14. Carvalho A. P., *Eur. J. Biochem.* **27**, 491 (1972).
15. Ikemoto N., Bhatnagar G. M., Gergely J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **44**, 1510 (1971).
16. Zubrzycka E., Sarzała M. G., X Zjazd PTBioch. Poznań 1972, str. 13.

17. Barany M., Finkelman F., Therattil-Anthony T., *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 28 (1962).
18. Strzelecka-Golaszewska H., Drabikowski W., *Acta Biochim. Polon.* **14**, 494 (1968).
19. Martonosi A., Molino C. M., Gergely J., *J. Biol. Chem.* **239**, 1057 (1964).
20. Strzelecka-Golaszewska H., *Acta Biochim. Biophys.* (w druku).
- 20a. Kasai M., Oosawa F., *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 520 (1968).
21. Strzelecka-Golaszewska H., Nagy B., Gergely J., *Arch. Biochem. Biophys.* (w druku).
22. Tonomura Y., Yoshimura J., *J. Biochem.* **50**, 79 (1962).
23. Drabikowski W., Gergely J., *J. Biol. Chem.* **238**, 640 (1963).
24. Barany M., Finkelman F., *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 98 (1962).
25. Kasai M., Oosawa F., *Biochim. Biophys. Acta* **172**, 300 (1969).
26. Kasai M., *Biochim. Biophys. Acta* **172**, 171 (1969).
27. Weber A., Herz R., Reiss I., *Biochemistry* **8**, 2266 (1969).
28. Konosu S., Hamoir G., Pechere J.-F., *Biochem. J.* **96**, 98 (1965).
29. Kretsinger R. H., Dangelat D., Bryan R. F., *J. Mol. Biol.* **59**, 213 (1971).
30. Pechere J.-F., Capony J.-P., Ryden L., *Eur. J. Biochem.* **23**, 421 (1971).
31. Gerday Ch., Teuwis J. C., *Biochim. Biophys. Acta* **271**, 320 (1972).
32. Pechere J.-F., Demaille J., Capony J.-P., *Biochim. Biophys. Acta* **236**, 391 (1971).
33. Nockolds C. E., Kretsinger R. H., Coffee C. J., Bradshaw R. A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **69**, 581 (1972).
34. Beznonana G., Capony J.-P., Pechere J.-E., *Biochim. Biophys. Acta* **278**, 110 (1972).
35. Pechere J.-F., Capony J.-P., *Comp. Biochem. Physiol.* **28**, 1089 (1969).
36. Wolff D. J., Siegel F. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **150**, 578 (1972).
37. Wolff D. J., Siegel F. L., *J. Biol. Chem.* **247**, 4180 (1972).
38. Nakamaru Y., Schwartz A., *Acta Biochim. Biophys.* **144**, 16 (1971).
39. Diamond I., Goldberg A. L., *J. Neurochem.* **18**, 1419 (1971).
40. Wolff D. J., Huebner J., Siegel F. L., Transactions of the American Society for Neurochemistry III Annual Meeting, Washington, 1972.
41. Moore B. W., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **19**, 739 (1965).
42. Kessler D., Levin L., Fasman G., *Biochemistry* **7**, 758 (1968).
43. Dannies P. S., Levin L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **37**, 587 (1969).
44. Calissano P., Moore B. W., Friesen A., *Biochemistry* **8**, 4318 (1969).
45. Rusca G., Calissano P., *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 74 (1970).
46. Ansorg R., Neuhoff V., *Intern. J. Neurosci.* **2**, 151 (1971).
47. Uyemura K., Vincendon G., Gombos G., Mandel P., *J. Neurochem.* **18**, 429 (1971).
48. Dannies P. S., Levin L., *J. Biol. Chem.* **246**, 6276 (1971).
49. Hyden H., Mc Ewen B. S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **55**, 354 (1966).
50. Cicero T. J., Cowan W. M., Moore B. W., Suntzeff V., *Brain Res.* **18**, 25 (1970).
51. De Robertis E., *Science*, **156**, 907 (1967).
52. Calissano P., Bangham A. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **43**, 504 (1971).
53. Hyden H., Lange P. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **67**, 1959 (1970).
54. Barret A. J., w „Comprehensive Biochemistry” red. Florkin M. and Stotz E. H., Elsevier, 26B, 1968, str. 425.
55. Bachra B. N., *Int. Rew. Connect. Tiss. Res.*, **5**, 165 (1970).

56. Vittur F., Pugliarello M. C., de Bernard B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **48**, 143 (1972).
57. Wasserman R. H., Taylor A. N., *Science* **152**, 791 (1966).
58. Taylor A. N., Wasserman R. H., *Acta Biochim. Biophys.* **119**, 536 (1967).
59. Wasserman R. H., Corradino R. A., Taylor A. N., *J. Biol. Chem.* **243**, 3978 (1968).
60. Ingersoll R. J., Wasserman R. H., *J. Biol. Chem.* **246**, 2808 (1971).
61. Hitchman A. J. W., Harrison J. E., *Canad. J. Biochem.* **50**, 758 (1972).
62. Harmeyer J., De Luca H. F., *Acta Biochim. Biophys.* **133**, 247 (1969).
63. Drescher D., De Luca H. F., *Biochemistry* **10**, 2302 (1971).
64. Taylor A. N., Wasserman R. H., *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 107 (1970).
65. Piazzolo P., Schleyer M., Franz E., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 1480 (1971).
66. Wasserman R. H., Taylor A. N., *J. Biol. Chem.* **243**, 3987 (1968).
67. Drescher D., De Luca H. F., *Biochemistry* **10**, 2308 (1971).
68. Holick M. F., Schones H. K., De Luca H. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 803 (1971).
69. Moore C. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **42**, 298 (1972).
70. Sottocasa G., Sandri G., Panfili E., Gazzotti P., Vasington F. D., Carafoli E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **47**, 808 (1972).
71. Sottocasa G., Sandri G., Panfili E., de Bernard B., Gazzotti P., Carafoli E., FEBS, 1972, Amsterdam, Abs. of Comm. str. 635.
72. Gomez-Puyou A., Gomez-Puyou M. T., Becker G., Lehninger A. L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **47**, 812 (1972).
73. Carsten M. E., Katz A. M., *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 534 (1964).

W dniach 9—12 lipca br. odbyło się w Jabłonie Międzynarodowe Sympozjum „Białka wiążące wapń” zorganizowane przez Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego. Sprawozdanie z sympozjum ukaże się w jednym z najbliższych numerów „Postępów Biochemii”, a całość referatów w tomie sympozjalnym wydanym wspólnie przez PWN i Elsevier Co.

BEATA BRYSCH *)

Jądrowe RNA organizmów eukariotycznych

Nuclear RNA of the Eucaryotic Organisms

In nucleated (eucaryotic) cells RNAs exist which are exclusively localized in the nucleus. These RNAs are composed of two groups of molecules: heterogeneous nuclear RNA — HnRNA (high molecular, polydispersed, metabolically unstable, with DNA-like base composition, unmethylated and small molecular monodispersed nuclear RNA — snRNA (low molecular, monodispersed, metabolically stable, with different base composition in different subfraction of this RNA, methylated).

In this review some properties and function of these RNAs in the cell are presented.

Jądro komórkowe oprócz syntezy tRNA, mRNA i rRNA, które lokalizują się następnie w cytoplazmie jest również miejscem syntezy swoistych klas RNA pozostających po syntezie wyłącznie na terenie jądra. Dla uproszczenia te ostatnie klasy RNA będziemy nazywać „jądrowym RNA”. Populacje cząsteczek tego typu stwierdzono w komórkach zarówno roślinnych jak i zwierzęcych wziętych z ustroju lub hodowanych w kulturach, w komórkach zróżnicowanych i embrionalnych, nowotworowych i prawidłowych, dzielących się i będących w spoczynku. Występowanie jądrowego RNA wydaje się być zatem ogólną cechą organizmów eukariotycznych.

Na występowanie jądrowego RNA pierwszy zwrócił uwagę Harris (1) wykazując, że pewna grupa cząsteczek jądrowego RNA jest szybko

*) Mgr, Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, Gliwice.

Wykaz stosowanych skrótów: RNA — kwas rybonukleinowy, tRNA — transportujący kwas rybonukleinowy, mRNA — informacyjny kwas rybonukleinowy, rRNA — rybosomalny kwas rybonukleinowy, mlRNA — kwas rybonukleinowy podobny do informacyjnego (ang. messenger-like ribonucleic acid), HnRNA — heterogeny, jądrowy kwas rybonukleinowy (ang. heterogeneous nuclear ribonucleic acid), D-RNA — jądrowy kwas rybonukleinowy podobny do kwasu dezoksyrybonukleinowego (ang. DNA-like RNA), D-RNA₁ — jądrowy kwas rybonukleinowy podobny do kwasu dezoksyrybonukleinowego, komplementarny do strefy informacyjnej operonu, D-RNA₂ — jądrowy kwas rybonukleinowy podobny do kwasu dezoksyrybonukleinowego, komplementarny do strefy akceptorowej operonu, snRNA — monodispersyjny, metabolicznie stabilny, niskocząsteczkowy kwas rybonukleinowy, RNP — kompleksy rybonukleoproteidowe, RNaza — rybonukleaza, DNA — kwas dezoksyrybonukleinowy, DNaza — dezoksyrybonukleaza, poliA — kwas poliadenylowy, GC — guanina, cytozyna, EDTA — etylenodwuaminoczieteroocjan.

syntetyzowana i degradowana na terenie jądra. Autor ten doszedł do wniosku, że ta klasa RNA nie może być prekursorem RNA cytoplazmatycznego. Prace Harrisa pozostały w zapomnieniu przez wiele lat i dopiero badania z pracowni McCarty'ego (2) nad metabolizmem RNA jądrowego potwierdziły ten fakt na podstawie pomiarów szybkości wbudowywania i uwalniania radioaktywnych prekursorów.

Doświadczenia wykonane techniką hybrydyzacji konkurencyjnej między RNA jądrowym a RNA cytoplazmatycznym wykazały, że wszystkie sekwencje RNA cytoplazmatycznego są obecne w jądrze lecz nie odwrotnie; cząsteczki jądrowego RNA zawierają sekwencje nie występujące na terenie cytoplazmy. Cząsteczki jądrowego RNA są lepszym konkurentem o homologiczne miejsca na DNA niż cząsteczki RNA cytoplazmatycznego izolowane z tych samych komórek. Wykazano wielką różnorodność cząsteczek jądrowego RNA, które ogólnie można ująć w dwie grupy:

I. heterogenny, szybkoznakujący się RNA,

II. niskocząsteczkowy, monodispersyjny, stabilny metabolicznie RNA.

Piśmiennictwo omawiające obie grupy jądrowego RNA jest obecnie już bardzo obszerne. Nie pretendując do całkowitego omówienia tego zagadnienia pragnę w niniejszym artykule dokonać przeglądu podstawowych prac uwzględniających zwłaszcza ostatnie poglądy na strukturę i funkcję jądrowego RNA.

I. Heterogenny RNA jądrowy

Ta klasa RNA znana jest także pod nazwami: szybko-metabolizujący się RNA jądrowy, DNA-podobny RNA jądrowy (D-RNA), RNA podobny do informacyjnego RNA (ang. messenger-like RNA—mlRNA), RNA olbrzymocząsteczkowy (ang. „giant RNA”). Może najwłaściwszy wydaje się tu termin heterogenny, jądrowy RNA (ang. heterogenic nuclear RNA—HnRNA), gdyż nie przesądza on mało jeszcze poznanej roli biologicznej, a z drugiej strony podkreśla najbardziej istotną cechę fizyczną tej klasy cząsteczek. Tego terminu lub skrótu HnRNA będę używała dalej.

I-1. Występowanie HnRNA

Większość badań dotyczących HnRNA prowadzono na komórkach dzielących się—głównie komórkach linii HeLa. Obecność tej klasy RNA stwierdzono również w nie dzielących się komórkach takich jak niedojrzałe erytrocyty (3). Prace Daneholta i wsp. donoszą o istnieniu HnRNA w chromosomach politenicznych u *Chironomus* (4, 5, 6). Początkowo sądzono, że HnRNA jądrowy jest zlokalizowany zarówno w jąderkach jak i w nukleoplazmie. Okazało się jednak, że rozkład tego RNA między jąderko

i nukleoplazmę jest funkcją siły jonowej. Przy dostatecznie dużej sile jonowej uzyskuje się jąderko całkowicie pozbawione HnRNA. Uważa się więc, że frakcja HnRNA występuje wyłącznie w nukleoplazmie (7).

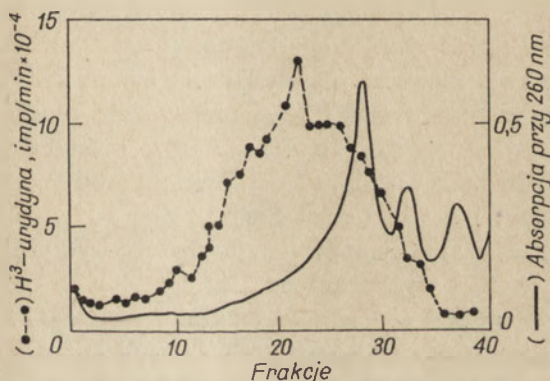
I-2. Skład zasad

W odróżnieniu od wysokiej zawartości GC w rRNA (około 60 mol⁰/o), frakcja HnRNA zawiera mniej niż 50. mol⁰/o GC, podobnie do składu zasad DNA (stąd nazwy „DNA-like RNA” i „mlRNA”) (3, 8).

I-3. Struktura i polidispersyjność

Badania przy pomocy mikroskopu elektronowego wykazują, że cząsteczki HnRNA stanowią pojedyncze łańcuchy o długości 5—6 μ (9).

W trakcie wirowania w liniowym gradiencie sacharozy HnRNA sedymentuje w szerokim zakresie; od 18 do 120S (11). Na rycinie 1 pokazano profil sedymentacji HnRNA znakowanego ³H-urydyną. Polidispersyjny charakter HnRNA jest na tym przykładzie doskonale widoczny.



Ryc. 1. Profil wirowania pulsowo znakowanego RNA izolowanego z jąder komórek linii HeLa w liniowym gradiencie sacharozy (wg 11).

Wyniki wcześniejszych badań (9) wykazały, że niskie siły jonowe w pH 9 obniżają tylko nieznacznie stałą sedymentacji HnRNA. Nieznaczne obniżenie wartości stałej sedymentacji HnRNA wskazuje raczej na częściowe niszczenie struktury drugorzędowej a nie na dysocjację cząsteczek HnRNA na podjednostki. Dwuwartościowe kationy nie są potrzebne do utrzymania tej struktury, ponieważ EDTA w niskiej sile jonowej nie zmienia profilu sedymentacji. Gdy przed ekstrakcją HnRNA do lizatu komórkowego dodano egzogenne RNA, nie wykryto przypadkowej agregacji tych molekuł z HnRNA w czasie ekstrakcji.

Trawienie DNazą lub pronazą nie wpływa na właściwości sedymentacji HnRNA (3). Powyższe dane sugerują, że cząsteczki szybkoznakującego się jądrowego RNA nie są agregatami mniejszych komponent lecz dużymi molekułami składającymi się z pojedynczych łańcuchów polinukleotydowych, posiadających częściowo uporządkowaną strukturę drugorzędową.

I-4. Kompleksy HnRNA z białkiem

HnRNA występuje w kompleksach nukleoproteinowych. W czasie wirowania uzyskano kompleksy o stałej sedymentacji dochodzącej nawet do 5000S (7). Badania nad fizycznymi właściwościami cząsteczek rybonukleoproteinowych izolowanych z jąder wątroby szczura wykazały stabilność na wysokie stężenie soli i oporność na niejonowy detergent Triton X-100 (10). Natomiast dezoksycholan sodu niszczy ich strukturę, w przeciwieństwie do działania na polisomy i rybosomy. Przypuszcza się, że dezoksycholan sodu powoduje oddysocjowanie białka z tych kompleksów, na co wskazuje obniżenie stałej sedymentacji przy zachowaniu całkowitej ilości radioaktywnego RNA w kompleksach, oraz obniżenie zawartości pewnych frakcji białkowych. Rozpuszczenie kompleksów przy pomocy dezoksycholanu może sugerować obecność lipidów lub lipoproteidów. Wysoka gęstość właściwa w gradiencie CsCl, ($1,38\text{g/cm}^3$) wyklucza jednak obecność dużych ilości komponent lipidowych. Ponadto ani lipaza ani fosfolipaza w stężeniach, które trawią lipoproteidy nie działa na cząstki jądrowe rybonukleoproteidów zawierających HnRNA. Jeśli więc lipidy byłyby częścią składową struktury opisywanych kompleksów musiałyby być obecne w bardzo małych ilościach i skompleksowane z białkiem, które chroniłoby je przed działaniem lipaz. Z badań Scherrera i wsp. (11) wynika, że kompleksy HnRNA z białkiem posiadają charakterystyczną gęstość właściwą w gradiencie CsCl wynoszącą od $1,40$ do $1,45\text{g/cm}^3$. Kompleksy rybonukleoproteinowe mRNA polisomów traktowanych EDTA posiadają taką samą gęstość właściwą w gradiencie CsCl. Ci sami autorzy stwierdzili również, że w cytoplazmie jest obecny RNA o cechach RNA informacyjnego, jednak ten RNA jest niezwiązany z polisomami i występuje w kompleksie z białkiem. Gęstość właściwa w gradiencie CsCl tego kompleksu wynosi również $1,40$ — $1,45\text{g/cm}^3$.

Wirowanie w gradiencie sacharozy frakcji RNA uzyskanej z cytoplazmatycznych kompleksów rybonukleoproteidowych wolnych i związanych z polisomami wykazuje ten sam zakres stałych sedymentacji (6S do 35S) dla obu frakcji RNA. Doświadczenia hybrydyzacyjne wykazują, że frakcja RNA z kompleksów cytoplazmatycznych związanych z polisomami zawiera podfrakcje o identycznej charakterystyce hybrydyzacyjnej do podfrakcji uzyskanych z frakcji RNA z kompleksów cytoplazmatycznych niezwiązanych z polisomami (11). Oznacza to, że obie cytoplazmatyczne frakcje RNA są złożone z tego samego typu sekwencji. Odsetek hybrydów omawianych

powyżej RNA z DNA spada jeżeli DNA wysyci się uprzednio molekułami jądrowego RNA, co wskazuje na fakt, że cząsteczki HnRNA jądrowego zawierają identyczne sekwencje do sekwencji obecnych we frakcjach cytoplazmatycznego mRNA związanego i niezwiązanego z polisomami.

I-5. Sekwencje poliA w HnRNA

W cząsteczkach HnRNA oraz mRNA stwierdzono obecność segmentu bogatego w sekwencje poliA, prawdopodobnie kowalentnie przyłączonego do końca 3' (12, 13, 14, 15). Dalsze badania wykazały, że sekwencje poliA znajdują się głównie w lekkich frakcjach HnRNA (16).

Segment poliA zawiera od 150—250 nukleotydów, jest odporny na trawienie RNazą trzustkową i RNazą T₁, a wyizolowany z preparatów RNA daje pojedynczy szczyt w elektroforezie na żelu poliakrylamidowym. Segment poliA wyizolowany z HnRNA komórek puchlinowego mięsaka 180 myszy zawiera 96,7% kwasu adenilowego, 1,9% kwasu guanilowego, 0,7% kwasu cytydylowego i 0,7% kwasu urydylowego (15). Badania nad kinetyką znakowania poliA trytowaną adenozyną wykazały, że poliA jądrowe ulega wcześniej wyznakowaniu izotopem niż poliA polisomalne. W miarę upływu czasu znakowania ³H-adenozyną iloraz radioaktywności poliA jądrowe — spada, co sugeruje jądrowe pochodzenie polisomalnego poliA polisomalne

segmentu poliA (12). Badania przy pomocy inhibitorów syntezy RNA (aktynomycyna D) lub inhibitorów syntezy poliA (kordycepina = 3'-dezoksyadenozyna) wykazały, że synteza segmentu poliA jest raczej niezależna od procesu transkrypcji (12). Wysokie dawki aktynomycyny D (5µ/ml) hamują syntezę HnRNA w 96%, syntezę mRNA w 93%, natomiast synteza segmentu poliA nie ulega zahamowaniu w tak wysokim stopniu. Wyniki badań z aktynomycyną D sugerują, że segment poliA może być przyłączony do cząsteczki RNA po zakończeniu procesu transkrypcji. Hamowanie syntezy segmentu poliA kordycepiną (3'-dezoksyadenozyną) jest zrozumiałe ponieważ antybiotyk ten działa jak analog adenozyiny. Z drugiej strony Penman i wsp. (17) stwierdzili, że kordycepina nie jest inhibitorem syntezy HnRNA jądrowego, natomiast w bardzo wysokim stopniu hamuje syntezę mRNA.

I-6. Metabolizm HnRNA

Charakterystyczną cechą HnRNA jest niestabilność metaboliczna. Okresy półtrawienia cząsteczek tego typu RNA są jeszcze krótsze od szybko metabolizującego mRNA i wynoszą od 3 minut do kilku godzin (18, 7, 19). Badania Scherrera i wsp. (11) nad kinetyką rozpadu HnRNA pochodzącego z komórek HeLa wykazały, że lekkie frakcje tego RNA (6—35S) roz-

padają się wolniej niż ciężkie frakcje, oraz że rozpad HnRNA następuje w sposób dwufazowy; obserwuje się fazę szybką i fazę wolną rozpadu. W fazie szybkiej rozpadu lekkie frakcje HnRNA rozpadają się 4 razy wolniej (okres półtrwania = 80 minut) niż ciężkie frakcje HnRNA (okres półtrwania = 20 minut). W fazie wolnej rozpadu frakcja 6—35S HnRNA ulega rozpadowi z okresem półtrwania o wiele dłuższym bo wynoszącym 14 godzin, frakcja ciężka, czterokrotnie szybciej.

I-7. Powtarzające się sekwencje w HnRNA

HnRNA jądrowy zawiera sekwencje zasad powtarzające się wiele razy (20). Odcinki cząsteczek HnRNA zawierających powtarzające się sekwencje zasad ulegają hybrydyzacji z większą prędkością niż odcinki HnRNA zawierające unikalne sekwencje. Okazało się, że prędkość właściwa hybrydyzacji HnRNA jest większa od prędkości właściwej hybrydyzacji mRNA (20). Wskazuje to na fakt, że cząsteczki HnRNA jądrowego są bogatsze w powtarzające się sekwencje w porównaniu z mRNA. Dane te w pewnym stopniu potwierdzają poglądy Georgieva (21) na syntezę RNA jądrowego.

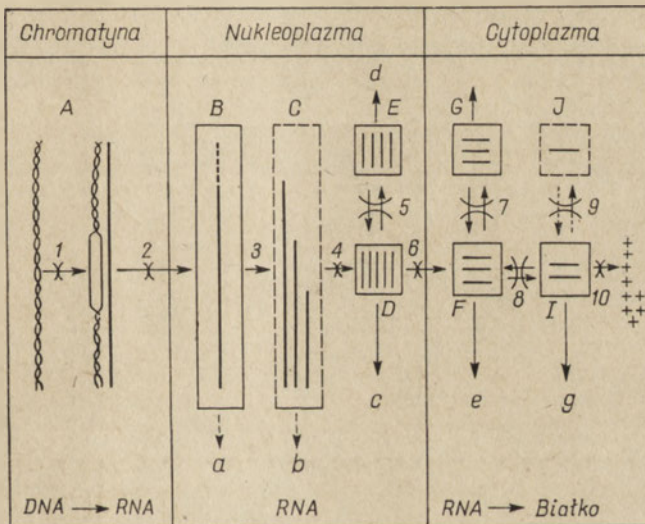
Według tego autora miejsca akceptorowe operonu charakteryzują się wielokrotnością wynikającą z obecności powtarzających się sekwencji zasad w tej strefie operonu. D-RNA₂ jako część RNA komplementarna do strefy akceptorowej operonu jest bogatsza w opisywane sekwencje niż D-RNA₁ komplementarna do strefy informacyjnej operonu, a będący prekursorem dla RNA informacyjnego. W czasie hybrydyzacji HnRNA z homologicznym DNA, krzywa hybrydyzacyjna nigdy nie osiąga plateau, co sugeruje, że HnRNA jest mieszaniną molekuł o różnych prędkościach właściwych hybrydyzacji. Część HnRNA pozostaje nieskompleksowana z DNA nawet po przedłużonej inkubacji, co przemawia za obecnością pewnych frakcji HnRNA transkrybowanych z niepowtarzających się sekwencji DNA (22). Ponadto techniką hybrydyzacji zlokalizowano powtarzające się sekwencje w HnRNA. Stwierdzono ich obecność zarówno przy końcu 5'cząsteczki (23) jak i przy końcu 3'cząsteczki HnRNA (24). Obecność powtarzających się sekwencji w HnRNA sugeruje prawdopodobną rolę tego RNA w regulacji aktywności genetycznej w organizmach eukariotycznych.

I-8. HnRNA jako prekursor mRNA

Nasuwa się pytanie czy omawiana, szybko metabolizująca frakcja HnRNA, przypominająca składem zasad DNA i mRNA może być prekursorem mRNA?

Początkowe badania autoradiograficzne z 1962 r. wykazujące zanikanie znakowania radioaktywnymi prekursorami RNA w jądrowej frakcji, a pojawianie się znakowania w cytoplazmie po przeniesieniu komórek do nie-

radioaktywnego medium sugerowały, że całe jądrowe RNA jest prekursorem mRNA. Dokładniejsze badania *Harrisa* (1) wykazały jednak, że większość RNA jądrowego ulega degradacji w jądrze. Istnieje możliwość, że nieznaczna część tego RNA może przechodzić do cytoplazmy i pełnić rolę mRNA (2), a większość HnRNA pozostaje wyłącznie w jądrze. Wśród autorów rozważających zagadnienie zależności między HnRNA a mRNA nie ma zgodności poglądów. *Penman* i wsp. (7) na podstawie badań porównujących kinetykę syntezy HnRNA, oraz mRNA wyciągnęli wniosek o niezależności metabolicznej mRNA i HnRNA jądrowego. Wyznakowanie HnRNA radioaktywnym prekursorem występuje od razu, natomiast we frakcji mRNA wyznakowanie występuje z 30 minutowym opóźnieniem. Ponadto znakowanie w mRNA wzrasta cały czas liniowo, natomiast w HnRNA jądrowym logarytmicznie. W późniejszym doniesieniu *Penman* i wsp. (17) badając działanie kordycepiny na syntezę różnych klas RNA stwierdzili całkowite zahamowanie syntezy mRNA przez ten antybiotyk, a brak zahamowania syntezy HnRNA. Autorzy sugerują możliwość istnie-



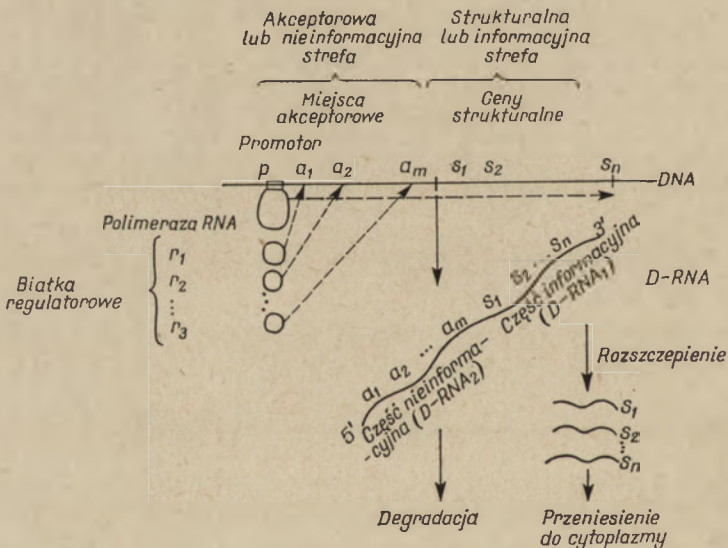
Ryc. 2 Hipotetyczny model tworzenia mRNA w komórkach zwierzęcych (wg 11).

Etapy prowadzące do powstania mRNA: 1 — Synteza ołbrzymicząsteczkowego HnRNA w chromatynie po uczynieniu genomu; 2 — Uwolnienie ołbrzymicząsteczkowego HnRNA (B) z matrycy DNA lub chromatyny; 3 — Rozszczepienie ołbrzymicząsteczkowego HnRNA do krótszych fragmentów (C); proces rozpadu do mononukleotydów (b); 4 — Dalsze rozszczepienie do frakcji drobnocząsteczkowej RNA (D); Krótkożyjące RNA tej frakcji ulega degradacji do mononukleotydów (a); 5 — Magazynowanie w nukleoplazmie długożyjących RNA frakcji „D” w postaci puli zapasowej (E); proces rozpadu do mononukleotydów (d); 6 — Przeniesienie do cytoplazmy części długożyjących RNA frakcji „D” w postaci puli F; jednoczesny proces rozpadu puli F do mononukleotydów (e); 7 — Przejście części puli F w cząsteczki RNA nie posiadające zdolności łączenia się z rybosomami (G); 8 — Przejście części frakcji F w aktywne cząsteczki mRNA i ich łączenie się z rybosomami (I); jednoczesny proces rozpadu mRNA do mononukleotydów (g); 9 — Możliwa jest obecność mRNA w polirybosomach nieaktywnych w syntezie białka (J); 10 — Synteza polipeptydów przy udziale aktywnego mRNA.

Symbol X — oznacza etapy, które mogą podlegać procesom regulacji w komórce.

nia dwóch różnych polimeraz o różnych wrażliwościach na kordycepinę, odpowiedzialnych za proces transkrypcji HnRNA i mRNA.

Stwierdzenie obecności segmentu poliA zarówno w HnRNA jak i mRNA o właściwościach poprzednio opisanych oraz wykazanie, że kordycepina oprócz wybiórczego hamowania syntezy pewnych klas RNA (m.in. mRNA) hamuje syntezę omawianego segmentu poliA uzasadnia pogląd D a r n e l l a o syntezie mRNA z HnRNA (12). Pogląd ten jest przeciwstawny hipotezie P e n m a n a, że synteza mRNA jest niezależna od syntezy HnRNA. Według D a r n e l l a, po zakończeniu transkrypcji HnRNA jądrowego, segment poliA zostaje doczepiony do końca 3' cząsteczki. Jedna lub kilka nukleaz może odcepić mRNA plus jednostkę poliA a następnie rozkładać pozostałą część HnRNA, albo też może następować enzymatyczna degradacja całego HnRNA za wyjątkiem jednostki mRNA, do której następnie zostaje doczepiony segment poliA. Modyfikacja cząsteczki przez przyłączenie segmentu poli-A ma być konieczna do przeniesienia utworzonych molekuł mRNA z jądra do cytoplazmy. Za słuszością koncepcji, że HnRNA jest prekursorem mRNA przemawiają badania S c h e r r e r a i wsp. (11) nad kompleksami rybonukleoproteidowymi (RNP) w jądrze i w cytoplazmie (patrz rozdział 4). Autor ten stwierdził w cytoplazmie obecność kom-



Ryc. 3. Hipotetyczny model struktury operonu organizmów eukariotycznych (wg 21).

pleksów RNP nie związanych z polisomami o gęstości w gradiencie CsCl identycznej do gęstości kompleksów jądrowych (HnRNA — białko). RNA z tych kompleksów posiada sekwencje identyczne do mRNA i HnRNA. Autor przedstawił hipotetyczny model tworzenia mRNA w komórkach

zwierzęcych, opowiadając się za zależnością pomiędzy olbrzymiocząsteczkowym HnRNA a mRNA typu prekursor-produkt, (Ryc. 2.).

Model zaproponowany przez Scherrera ma pewne wspólne elementy z modelem struktury operonu w organizmach eukariotycznych opracowanym przez Georgieva (21), (Ryc. 3.).

Według hipotezy Georgieva HnRNA jest produktem wielkiego operonu. Każdy operon czyli „elementarna jednostka transkrypcji” zawiera dwie strefy: akceptorową — czyli nieinformacyjną i strukturalną — czyli informacyjną. Strefa akceptorowa zawiera miejsca dla przyczepu różnych specyficznych białek. Na początku tej strefy znajduje się promotor — miejsce przyczepu polimerazy RNA, następne miejsca akceptorowe stanowią operatory — miejsc przyczepu białek regulatorowych (represorów lub derepresorów). Miejsca akceptorowe operonu charakteryzują się występowaniem powtarzających się sekwencji zasad.

Strefa strukturalna umieszczona za strefą akceptorową zawiera cistrony niosące informację dla syntezy białek strukturalnych, enzymów i białek regulatorowych (represorów lub derepresorów). W wyniku takiej organizacji operonu synteza HnRNA rozpoczyna się od transkrypcji strefy akceptorowej, po czym następuje transkrypcja cistronów strukturalnych. Każda syntetyzowana cząsteczka RNA jądrowego stanowi komponent HnRNA i zawiera od końca 5' sekwencje komplementarne do strefy akceptorowej operonu (tą część cząsteczki HnRNA nazywa się D-RNA₂) a od końca 3' sekwencje komplementarne do strefy informacyjnej (D-RNA₁).

Nieinformacyjna część RNA jądrowego (część od końca 5' cząsteczki) ma być degredowana natomiast fragment RNA od końca 3' stanowi prawdopodobnie prekursor dla mRNA i w kompleksie z białkiem w postaci informosomów zostaje przetransportowany do cytoplazmy.

I-9. Inne domniemane role HnRNA

Oprócz roli HnRNA jako prekursora dla mRNA, możliwe są jeszcze inne funkcje tej klasy RNA.

Kodowanie białek działających wyłącznie w jądrze powinno odbywać się przy pomocy RNA nie opuszczającego jądra (2). Może to dotyczyć kwaśnych białek jądrowych, histonów, polimeraz kwasów nukleinowych, białek strukturalnych aparatu mitotycznego. HnRNA mógłby mieć funkcje kodującego tego rodzaju białka; są to jednak spekulacje nie poparte danymi eksperymentalnymi.

II. Monodispersyjne, metabolicznie stabilne, niskocząsteczkowe RNA

W piśmiennictwie tę klasę RNA oznacza się symbolem snRNA (25), tym też symbolem będę posługiwała się dalej. Najwięcej informacji dotyczącej charakterystyki snRNA dostarczają badania grupy Penman a oraz Buscha.

II-1. Rozmieszczenie snRNA w komórce

Cząsteczki należące do klasy niskocząsteczkowego, monodispersyjnego jądrowego RNA występują zarówno w jąderku jak i nukleoplazmie (frakcja jądrowa, pozajądrowa). Weinberg i Penman spostrzegli jedenaście frakcji RNA oznaczonych kolejno według wzrastającej ruchliwości elektroforetycznej literami alfabetu: A, B, C, D, E, F, G, G', H, J, K, L (25, 26). Przy pomocy techniki opracowanej przez Penmana (18) uzyskuje się rozdzielanie jądra na nukleoplazmę i jąderko, co umożliwia szczegółowe badanie lokalizacji poszczególnych frakcji RNA w komórce. Osiem z nich (A, B, C, D, F, H, K, L) znajduje się tylko w jądrze, frakcje E, G, G', J są w jądrze i cytoplazmie, frakcje A, B, F, są wyłącznie jąderkowe a frakcje C, D, H, K, L znajdują się głównie w nukleoplazmie. W późniejszych badaniach innych autorów wykazano dwie frakcje drobnocząsteczkowego RNA oznaczone jako x_1 i x_2 , występujące zarówno w jądrze (we frakcji jąderkowej i pozajądrowej) jak i w cytoplazmie (27).

II-2. Metody uzyskiwania frakcji snRNA

Weinberg i Penman po rozdzieleniu jądra na jąderko i nukleoplazmę i po ekstrakcji RNA z tych frakcji, charakteryzowali poszczególne snRNA elektroforetycznie, stosując żele poliakrylamidowe (8—10%) (25, 26). Natomiast w pracowni Buscha (28, 29) po uzyskaniu frakcji RNA o stałej sedymentacji 4—7S przez wirowanie zonalne w liniowym gradiencie sacharozy, poddawano je dalszemu rozdziałowi chromatograficznemu na Sephadex G—100, uzyskując trzy szczyty. Dalszą szczegółową analizę RNA z poszczególnych szczytów, przeprowadzono również na żelach poliakrylamidowych. Niektóre z frakcji udało się uzyskać w stanie elektroforetycznie homogenym preparatywną elektroforezą (28). W późniejszych badaniach (30) w celu lepszego oczyszczenia frakcji 4—7S RNA stosowano chromatografię na DEAE-Sephadex. Tą metodą udało się snRNA rozdzielić na kilka komponent o jednakowych stałych sedymentacji i jednakowych ruchliwościach elektroforetycznych, a więc zachowujących się w czasie wirowania i elektroforezy preparatywnej jak frakcje homogenne. Przykładem może być nukleoplazmatyczne 4,5S RNA, które używając DEAE-Sephadex rozdzielono na trzy frakcje różniące się między sobą właściwościami (31).

Dwie frakcje drobnocząsteczkowego RNA oznaczone przez x_1 i x_2 uzyskano przez ekstrakcję fenolem a następnie chromatografię na kolumnie z metylovaną albuminą (27).

II-3. Niektóre właściwości snRNA

Stała sedymentacji snRNA wynosi 4-7S. RNA x_1 i x_2 wyizolowane przez Frederiksena (27) podobnie do snRNA opisywanego przez Buscha i Pen-

mana zajmują region 4-7S w czasie wirowania w liniowym gradiencie sacharozy. Wielkość cząsteczek dla poszczególnych snRNA wynosi od 100-260 nukleotydów (26). Każda z frakcji snRNA natomiast zachowuje się jak homogenna populacja molekuł jeśli chodzi o wielkość cząsteczek. Nie można wykluczyć, że pomiędzy poszczególnymi molekułami danej frakcji snRNA istnieją subtelne różnice w składzie nukleotydowym. Frakcje snRNA różnią się między sobą ilością cząstek przypadających na komórkę. Najbardziej liczna jest frakcja nukleoplazmatyczna „D” występująca w ilości około 10^6 cząsteczek na komórkę HeLa (25). Frakcja „K” i „L” występują tylko w ilości po około 2×10^4 cząsteczek na komórkę HeLa (26).

II-4. Metylacja snRNA

Podobnie do tRNA i rRNA, snRNA jest jeszcze jednym RNA zawierającym grupy metylowe (26). Posiada charakterystyczną dla siebie metylację (32) wskazującą na to, że snRNA nie może być produktem degradacji innych metylowanych RNA. Świadczą o tym uzyskane metylowane produkty alkalicznej hydrolizy 4—6S RNA, gdzie głównym metylowanym produktem degradacji alkalicznej są duże fragmenty nie posiadające ładunku, oraz fragmenty trój- i dwunukleotydowe. Alkaliczna degradacja tRNA lub rRNA daje metylowane fragmenty nie większe niż dwunukleotydowe. Ponadto przebieg reakcji metylacji snRNA przy pomocy ^{14}C -metylometioniny jest inny niż w tRNA i rRNA (29).

II-5. Skład zasad snRNA — frakcje snRNA bogate w urydynę

Skład zasad różnych snRNA różni się istotnie (25). *Hodnet i Busch* (28) zwrócili uwagę na frakcje RNA jądrowego bogatego w urydynę stanowiące 40—50% snRNA. Frakcja U_1 -odpowiednik frakcji „D+E” opisywanych przez *Penmana* (26) — po elektroforezie daje trzy pasma: U_{1a} , U_{1b} , U_{1c} , a frakcja U_2 odpowiadająca frakcji „C” *Penmana* okazuje się elektroforetycznie homogenną. Obie frakcje prawie nie posiadają zdolności akceptorowej w stosunku do aminokwasów w odróżnieniu od tRNA, a iloraz $\frac{\text{AU}}{\text{GC}}$ jest większy niż dla tRNA (28). Frakcje U_1 i U_2 nie różnią się między sobą zawartością urydyny ani guaniny. Jedynie frakcja U_1 w porównaniu do frakcji U_2 jest bogatsza w cytozynę.

Bogatą w urydynę frakcję RNA znaleziono w chromatynie ekstrahowanej z jąder przy pomocy 2M NaCl (33). Stała sedymentacji tego RNA wynosi około 7S, a po elektroforezie frakcja ta daje 3 pasma. Frakcja 7S posiada inny skład zasad $\left(\frac{\text{AU}}{\text{GC}} \text{około } 1\right)$ i mniejszą ruchliwość elektroforetyczną w porównaniu do niskocząsteczkowego RNA cytoplazmy. Frakcja ta stanowi dużą część, bo aż 48—50% niskocząsteczkowego RNA wątrobiaka.

II-6. W jakiej formie występuje snRNA, czy jest wolny, czy związany w kompleksie?

Weinberg i Penman wykazali, że frakcje snRNA są luźno związane z chromatyną (26). Kompleksy snRNA z białkami różnią się od kompleksów HnRNA z białkiem. Próbowano oddzielić snRNA od chromatyny stosując niskie stężenie soli (0,01M—0,3M).

Już 0,2M roztwór soli powoduje prawie całkowite (około 90%) dysocjowanie snRNA od chromatyny, w przeciwieństwie do silnie związanego HnRNA, który w 0,3M roztworze soli dysocjuje zaledwie w znikomej części. Stosując 0,2M roztwór soli można selektywnie ekstrahować snRNA nawet z jąder nierozdrobnionych. Kompleksy snRNA z białkami sedymentują jako cząsteczki o stałej sedymentacji mniejszej od 30S. Fakt, że frakcje snRNA w kompleksach z białkami sedymentują w zakresie około 15S, a czyste frakcje tego RNA posiadają zakres stałej sedymentacji około 4—7S, nasuwa przypuszczenie, że cząstki snRNA są zasocjowane tylko z kilkoma cząsteczkami białka. Niektóre snRNA obecne w jąderku są mocno związane z jego strukturą. Weinberg i Penman (25) opisują jąderkową frakcję „A”, której nie można uwolnić z jąderka ani trawieniem materiału jąderkowego DNazą ani wysoką siłą jonową. Wspomniana już frakcja „E” oznaczona też jako (28S A), wykazuje przejściową asocjację z jąderkowym 28S rRNA i prawdopodobnie bierze udział w transporcie tego RNA do nukleoplazmy i cytoplazmy. Również grupa Buscha (34) opisuje frakcje snRNA występujące wyłącznie w jąderku, zasocjowane z 28S jąderkowym RNA (U_3 i 8S). W porównaniu do ilości 28S jąderkowego RNA występują one w stosunku 1:2 co sugeruje, że nie wszystkie molekuly 28S RNA są z nimi związane w danym czasie. Luźne związanie snRNA z chromatyną przemawiać może za tym, że również samo DNA nie jest silnie związane z snRNA, w przeciwieństwie np. do kompleksu DNA-histon. Ponieważ dysocjowanie snRNA zachodzi już w 0,2 M NaCl możliwe jest, że *in vitro* ten RNA występuje w stanie wolnym, rozpuszczalnym w soku jądrowym, względnie w formie labilnych kompleksów nukleoproteinowych ulegających zniszczeniu w procesie izolowania.

II-7. Metabolizm snRNA

W odróżnieniu od niestabilnego metabolicznie HnRNA oraz bardziej od niego stabilnych prekursorów rRNA, snRNA wykazują dużą stabilność. Okresy półtrwania dla różnych frakcji snRNA są jednak różne i wynoszą od 20 godzin do kilku dni (26).

Badanie kinetyki pulsowego znakowania snRNA jest utrudnione obecnością niestabilnego HnRNA. Dzięki słabszej asocjacji snRNA z białkiem można obserwować znakowanie snRNA selektywnie eluowanego 0,2M NaCl (26). Frakcje nukleoplazmatyczne „C” i „D” są wyznakowane już

po 15 minutach, oraz są syntetyzowane nawet po zahamowaniu syntezy 45S prekursorów rRNA.

Znakowane cząsteczki snRNA przeżywają 24 godziną ekspozycję na radioaktywny prekursor i 48 godziną inkubację w środowisku nieradioaktywnym, co potwierdza ich stabilność i sugeruje, że muszą przeżywać mitozę, gdyż okres ich życia wydaje się być dłuższym od czasu generacji komórek. Synteza snRNA nie jest skoordynowana z syntezą DNA; w okresie „S” utrzymuje się na stałym poziomie oraz nie jest zahamowana w okresie fazy G₁ i G₂ (26).

II-8. Czy snRNA może być artefaktem wynikającym z degradacji większych cząsteczek RNA?

Grupa B u s c h a przedstawia następujące dane dla 4—7S RNA bogatych w urydynę wykluczające tę możliwość (29):

- a) Ilość 4—7S RNA jest powtarzalnie stała,
- b) Skład zasad jest różny od składu innych wysokomolekularnych RNA,
- c) W jądrach wątrobiaka, które posiadają dużą ilość 4—7S RNA, zawartość RNAzy jest niska,
- d) Aktywność RNAzy w czasie preparatyki jąder była hamowana niskim pH i obecnością kwasu cytrynowego,
- e) Frakcje snRNA nie mogą być produktem degradacji rRNA powstającym w czasie izolowania snRNA ponieważ po dodaniu 18S i 28S rRNA przed ekstrakcją snRNA, nie spostrzegano degradacji rRNA podczas ekstrakcji fenolem,
- f) Frakcje jądrowe bogate w urydynę są znajduwane również w całych komórkach, a więc nie mogą być produktami degradacji w czasie izolowania jąder,
- g) Frakcje bogate w urydynę jednakowo się ekstrahują fenolem na zimno i na ciepło.

Dodatkowe argumenty podali W e i n b e r g i P e n m a n: (26). Istnieje niezależność metaboliczna snRNA od rRNA i HnRNA, za czym przemawia różny wpływ antybiotyków na syntezę wymienionych klas RNA. Niskie dawki aktynomycyny D (0,04μg/ml) hamujące całkowicie syntezę 45S rRNA hamują tylko w pewnym stopniu syntezę snRNA, 3-dezoksyadenozyna częściowo hamuje syntezę snRNA i tRNA, nie wpływając na syntezę HnRNA.

III. Uwagi końcowe

Z przedstawionych danych widzimy, że istnieje wielka różnorodność stabilnego, niskocząsteczkowego RNA jądrowego. Poszczególne snRNA oprócz pewnych wspólnych cech, jak jednorodność wielkości cząsteczek w

obrębie danej frakcji snRNA, stabilność metaboliczna snRNA, niezależność metaboliczna od innych RNA (rRNA, tRNA, HnRNA) wykazują wiele istotnych różnic (różną lokalizację, różną czułość na antybiotyki, różne okresy półtrwania, różny skład zasad), które mogą sugerować różnorodność funkcji jakie mogłyby spełniać w jądrze żywej komórki. Howard i Stubblefield (35) spostrzegli zmiany w profilach elektroforetycznych na żelu poliakrylamidowym drobnocząsteczkowego stabilnego metabolicznie RNA jądrowego, izolowanego z limfocytów ludzkich transformowanych i nie-transformowanych fitochemaglutyniną (PHA). W limfocytach transformowanych fitochemaglutyniną jedna z frakcji tego RNA występuje w zmniejszonej ilości w porównaniu z snRNA z limfocytów nietransformowanych, pojawiają się natomiast trzy dodatkowe frakcje o małej ruchliwości elektroforetycznej. Autorzy sugerują, że te zmiany w metabolizmie snRNA limfocytów są związane z transformacją tych komórek. Inni autorzy obserwują różnice ilościowe i jakościowe między snRNA izolowanym z jaj jeżowców morskich a snRNA izolowanym z komórek raka Ehrlicha (36). Autorzy ci przypuszczają, że można będzie uzyskać informacje dotyczące funkcji snRNA przez badania tego RNA podczas rozwoju jeżowca morskiego. Przypuszcza się, że prawdopodobną rolą snRNA są bliżej niezbrane funkcje w procesie regulacji aktywności genetycznej. Odnośnie takiej roli ciekawe obliczenie podaje Prestayk i Busch dla frakcji 7S bogatej w urydynę (33). Z obliczeń autorów wynika, że w jądrze komórki wątrobowej istnieje około 10^6 molekuł 7S RNA bogatego w urydynę. Ponieważ jądro takie zawiera około 5×10^5 aktywnych genów, na aktywny locus genowy przypadać może około 1—2 molekuł 7S RNA. Mogłoby to wystarczyć do aktywności lub inhibicji locus genowego w chromosomie. Również w chromosomach politenicznych i w nukleoplazmie jąder komórek gruczołów śliniankowych u *Chironomus tentans* stwierdza się obecność kilku frakcji drobnocząsteczkowego RNA (37). Szczególnie ciekawe wydają się być dwie z nich, ulegające nagromadzeniu w jądrze po dłuższej inkubacji z radioaktywnym prekursorem. Frakcja 8S występuje tylko w nukleoplazmie, natomiast frakcja 7S znajduje się w nukleoplazmie, chromosomach i jąderku, oraz pojawia się znacznie później niż 8S (po 16 godzinnym wyznakowaniu). Gromadzenie obu tych frakcji w jądrze może sugerować, że posiadają one jeszcze niepoznaną rolę w regulacji aktywności genetycznej.

PIŚMIENNICTWO

1. Harris H., (1963), w „Progress in Nucleic Acid Research”, red.: Davidson J. N., Cohn W. E., tom 2, str. 19, Academic Press, New York and London.
2. Shearer R. W., McCarthy B. J., (1967), *Biochemistry*, 6, 283.
3. Attardi G., Parnas H., Hwang M.-I. H., Attardi B., (1966), *J. Mol. Biol.*, 20, 145.

4. Daneholt B., Edström J.-E., Egyhazi E., Lambert B., Ringborg U., (1969a), *Chromosoma*, **28**, 379.
5. Daneholt B., Edström J.-E., Egyhazi E., Lambert B., Ringborg U., (1969b), *Chromosoma*, **28**, 399.
6. Daneholt B., Edström J.-E., Egyhazi E., Lambert B., Ringborg U., (1969c), *Chromosoma*, **28**, 418.
7. Penman S., Vesco C., Penman M., (1968), *J. Mol. Biol.*, **34**, 49.
8. Soeiro R., Birnboim H. C., Darnell J. E., (1966), *J. Mol. Biol.*, **19**, 362.
9. Fujisawa T., Muramatsu M., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **169**, 175.
10. Faiferman I., Hamilton M. G., Pogo A. O., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **232**, 685.
11. Scherrer K., Spohr G., Granboulan N., Morel C., Grosclaude J., Chezzi C., (1970), Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, **35**, 539.
12. Darnell J. E., Philipson L., Wall R., Adesnik M., (1971), *Science*, **174**, 507.
13. Lee Se Y., Mendecki J., Brawerman G., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 1331.
14. Lim L., Canellakis E. S., (1970), *Nature*, **227**, 710.
15. Mendecki J., Lee Se Y., Brawerman G., (1972), *Biochemistry*, **11**, 792.
16. Ryskov A. P., Farashyan V. R., Georgiev G. P., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 568.
17. Penman S., Rosbash M., Penman M., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **67**, 1878.
18. Penman S., (1966), *J. Mol. Biol.* **17**, 117.
19. Soerio R., Vaughan M. H., Warner J. R., Darnell J. E., (1968), *J. Cell Biol.* **39**, 112.
20. Darnell J. E., Balint R., (1970), *J. Cell Physiol.*, **76**, 349.
21. Georgiev G. P., (1969), *J. Theoret. Biol.*, **25**, 473.
22. Pagoulatos G. N., Darnell J. E., (1970), *J. Mol. Biol.* **54**, 517.
23. Ryskov A. P., Mantieva V. L., Avakian E. R., Georgiev G. P., (1971), *FEBS Letters*, **12**, 141.
24. Coutelle Ch., Ryskov A. P., Georgiev G. P., (1970), *FEBS Letters*, **12**, 21.
25. Weinberg R. A., Penman S., (1968), *J. Mol. Biol.*, **38**, 289.
26. Weinberg R. A., Penman S., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **190**, 10.
27. Frederiksen S., Tønnesen T., Hellung-Larsen P., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**, 238.
28. Hodnett J. L., Busch H., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 6334.
29. Moriyama Y., Hodnett J. L., Prestayko A. W., Busch H., (1969), *J. Mol. Biol.*, **39**, 335.
30. Moriyama Y., Ip P., Busch H., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **209**, 161.
31. El-Khatib S. M., Ro-Choi T. S., Choi Y. C., Busch H., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3416.
32. Zapisek W. F., Saponara A. G., Enger M. D., (1969), *Biochemistry*, **8**, 1170.
33. Prestayko A. W., Busch H., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **169**, 327.
34. Prestayko A. W., Tonato M., Busch H., (1970), *J. Mol. Biol.*, **47**, 505.
35. Howard E., Stubblefield E., (1972), *Exp. Cell. Res.*, **70**, 460.
36. Frederiksen S., Hellung-Larsen P., (1972), *Exp. Cell. Res.*, **71**, 289.
37. Egyhazi E., Daneholt B., Edström J.-E., Lambert B., Ringborg U., (1971), *J. Cell Biol.*, **48**, 120.

TOMASZ GOŁASZEWSKI *

Losy metaboliczne rybosomowych kwasów rybonukleinowych

Metabolic Fates of Ribosomal Ribonucleic Acids

The metabolic events occurring in the course of posttranscriptional processing of rRNA molecules (partial depolymerizations, methylation and assembling with proteins), in bacterial and eucaryotic cells, are discussed.

W procesie biosyntezy rybosomowych kwasów rybonukleinowych (rRNA) można wyróżnić dwa etapy. Pierwszy z nich, to transkrypcja określonych sekwencji polinukleotydowych w DNA, stanowiących zespół cistronów dla rRNA, określanych skrótowo rDNA (por. 1). Etap drugi — to proces dojrzewania struktury cząsteczek pierwotnego transkryptu. Proces ten odbywa się na drodze trzech głównych ciągów reakcji. Są nimi: kilkustopniowa hydroliza enzymatyczna łańcuchów polinukleotydowych rRNA, ich metylacja i stopniowe przyłączanie białek do cząsteczek rRNA. Zespalanie się rRNA z białkami może być uważane za początek procesu powstawania cząstek rybonukleoproteidowych (cząstek RNP) — pierwotnych i pośrednich form rozwojowych pojawiających się w trakcie biogenezy podjednostek strukturalnych rybosomu.

Wyszczególnione tu trzy główne ciągi reakcji określamy mianem „obróbki potranskrypcyjnej” łańcuchów polinukleotydowych (ang. „*post-transcriptional processing*”).

* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

Stosowane skróty: rRNA — rybosomowe kwasy rybonukleinowe; tRNA — RNA przenoszący aminokwasy; mRNA — informacyjny RNA; rDNA — „rybosomowy kwas dezoksyrybonukleinowy”, zespół cistronów dla rRNA łącznie z przedzielającym DNA; G+C oraz A+U — sumaryczna zawartość, odpowiednio: guaniny i cytozyny oraz adeniny i uracylu w kwasach nukleinowych; S — wartości stałych sedymentacji; cząstki RNP — cząstki rybonukleoproteidowe, prekursor podjednostek rybosomowych; oznaczenia: nS rRNA i nS cząstki RNP są skrótowo opisane: rRNA lub cząstka RNP o stałej sedymentacji n. Cudzysłów użyty w odniesieniu do stałej sedymentacji („nS”) prekursorowych rRNA bakteryjnych dla odróżnienia ich od cząsteczek dojrzałych rRNA, bądź dla odróżnienia 30S podjednostek rybosomowych od prekursorowych cząstek RNA („30S”) przekształcających się w 50S podjednostki rybosomowe. Skrótowe określenie: 3'- lub 5'-koniec cząsteczki rRNA oznacza, że grupa hydroksylowa związana z atomem węgla nr 3 lub 5 rybozy pozostaje niezwiązana wiązaniem fosfodwuestrowym z kolejnym nukleotydem.

I. Procesy dojrzewania strukturalnego łańcuchów rRNA

I-1. Pierwotne produkty transkrypcji rDNA

Wielkość cząsteczek pierwotnych transkryptów rDNA u organizmów prokariotycznych (bakterie i sinice) i u eukariontów jest jednym z wyznaczników cezury dzielącej obie grupy organizmów. Metabolizm rRNA w obu typach komórek odróżnia się również kilkoma innymi cechami. Mamy tu na myśli wielkość cząsteczek dojrzałych strukturalnie — i zarazem funkcjonalnie — rRNA (oraz wielkość podjednostek strukturalnych rybosomu), liczbę cistronów dla rRNA (niewielka w komórce prokariotów, znacznie wyższa eukariontów), skompartamentyzowanie syntezy rRNA u organizmów wyższych w przeciwieństwie do pojedynczej puli cistronów rRNA u bakterii i sinic. O zagadnieniach tych pisaliśmy szerzej w innym artykule (1). Dodajmy, że „obróbka potranskrypcyjna” rRNA jest znacznie bardziej skomplikowana u eukariontów niż w komórkach organizmów prokariotycznych (por. 2).

Można przypuszczać (3), że u eukariontów pierwotnymi produktami transkrypcji rDNA są wielkocząsteczkowe 65S rRNA, 85S rRNA, 100S rRNA i 120S rRNA (te ostatnie — jako oligomery 45S rRNA), które ulegają rozpadowi z jednoczesnym uwolnieniem 45S rRNA (4). Badania nad rRNA o stałych sedymentacji powyżej 45S nie były dotychczas szeroko prowadzone i przyjmuje się, że u eukariontów prekursorowy rRNA charakteryzuje się stałymi sedymentacji 38S—45S i masami cząsteczkowymi 3,5—4,5 miliona daltonów, w zależności od stanowiska systematycznego organizmu (por. 5, 6).

U prokariotów pierwotnymi produktami transkrypcji rDNA są cząsteczki niewiele większe od dojrzałych rRNA o stałych sedymentacji 16S i 23S (7—11). Jest to zagadnienie jeszcze nie wyjaśnione, podobnie jak problem dojrzewania rRNA w chloroplastach i mitochondriach (12, 13). „Obróbka potranskrypcyjna” rRNA w tych organellach przebiega podobnie jak u bakterii (12, 13).

W wszystkich organizmach występuje — prócz wysokopolimeryzowanych rRNA — niskocząsteczkowy 5S rRNA (14). O ile u bakterii 5S rRNA powstaje na cistronach zespolonych z cistronami dla 16S rRNA i 23S rRNA (por. 1, 15), to u organizmów wyższych cistrony dla 5S rRNA są przestrzennie odgraniczone od cistronów kierujących syntezą 18S rRNA i 25—28S rRNA (16—19).

U eukariontów wysokopolimeryzowane rRNA powstają pod kontrolą chromatyny jąderkotwórczej, czyli organizatora jąderkowego, kierującego zarazem procesem rozwoju jąderka (19—24, por. 25). 5S rRNA powstaje natomiast poza jąderkiem, najprawdopodobniej — w nukleoplazmie (17, 26, 27). Sugerowano (26), że nowosyntetyzowany 5S rRNA przedostaje się

do cytoplazmy, a następnie jest przekazywany do jąderka, gdzie zostaje wbudowany do cząstek RNA, a częściowo ulega hydrolizie (Schemat 1).

Pomimo przestrzennego odgraniczenia, cistrony dla 5S rRNA i dla wysokocząsteczkowych rRNA działają wspólnie: synteza 5S rRNA roz-

1. Transkrypcja rDNA w nukleoplazmie
 - transport 5S rRNA w formie rozpuszczalnej
2. Akumulacja 5S rRNA w cytoplazmie *
 - transport 5S rRNA w formie rozpuszczalnej
3. 5S rRNA w jąderku
 - hydroliza 75% puli 5S rRNA
4. Wbudowanie 5S rRNA do cząstek RNP o stałej sedymentacji 55S (zawierających 32 S rRNA — por. 136).

Schemat 1. Losy metaboliczne 5S rRNA w komórkach HeLa. Schemat opracowany przez grupę Penmana (26).

* autorzy zastrzegają, że problem występowania 5S rRNA w cytoplazmie — w postaci rozpuszczalnej — nie jest rozstrzygnięty; 5S rRNA gromadzi się w cytoplazmie w warunkach sztucznych — w obecności aktynomycyny D w pożywce (w stężeniu 0.04μg/ml), gdy jąderko ulega uszkodzeniu. Niewyjaśniona jest również przyczyna dużej „nadprodukcji” 5S rRNA w komórkach HeLa — blisko 75% zsyntetyzowanego 5S rRNA ulega następnie hydrolizie.

poczyna się podczas embriogenezy w okresie gastrulacji (28), podobnie jak synteza innych rRNA (29—31) w różnych organizmach. Bezjąderkowe mutanty ropuchy płata (*Xenopus laevis*), pozbawione cistronów dla 18S rRNA i 28S rRNA, ale zawierające zespół cistronów dla 5S rRNA (19), nie syntetyzują niskocząsteczkowego rRNA (32). Mechanizm tej współzależności nie jest jednak znany. Z drugiej zaś strony, synteza 5S rRNA zachodzi podczas kariokinezy (w stadium metafazy), kiedy synteza 18S rRNA i 28S rRNA jest wstrzymana (18).

W organizmach eukariotycznych — prócz 5S rRNA — występuje też niskocząsteczkowy 5,8—7S rRNA (o masie 3—5×10⁴ daltonów) (33, 34). Stanowi on wewnątrzcząsteczkowe zagięcie łańcucha 28S rRNA i wiąże się z tym ostatnim za pomocą wiązań niekowalencyjnych (33—36). Po od dysocjowaniu 7S rRNA od cząsteczki 28S rRNA zarodków żaby (*Rana pipiens*) — co następuje podczas 10-cio minutowego podgrzania dupleksu do 45°C — uwalnia się cząsteczka 27S rRNA (36).

I-2. Istota „obróbki potranskrypcyjnej” rRNA

Dojrzewanie struktury łańcuchów polinukleotydowych RNA różnych klas sedymentacyjnych — w tym także tRNA (por. 8,37) — jest obecnie szeroko badane. Główną uwagę kieruje się na jądro rRNA u eukariontów — procesy „obróbki” tego rRNA są już dosyć dobrze poznane.

U pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) — najszerszej badanego przedstawiciela prokariotów — 16S rRNA powstaje z cząsteczki prekursorowej

(„16S”) większej od dojrzałego rRNA o około 50 000 daltonów (7). 16S rRNA u *Bacillus subtilis* powstaje z cząsteczki większej o około 130 000 daltonów (10). Prekursorem 23S rRNA (czyli „23S” rRNA) u *E. coli* jest cząsteczka większa od dojrzałej formy o około 100 000 daltonów (10). 5S rRNA powstaje u bakterii, być może, z cząsteczki prekursorowej (38). Dyskutowano możliwość, że 5S rRNA uwalniany jest wraz z 23S rRNA ze wspólnej cząsteczki pierwotnego transkryptu rDNA (10, 39). Sugerowano jednak również, że dojrzewanie 5S rRNA przebiega niezależnie od „obróbki” 23S rRNA (11).

Wysunięto hipotezę, w myśl której 16S rRNA i 23S rRNA uwalniane są z matrycy rDNA przed zakończeniem procesu transkrypcji wspólnej — potencjalnie — cząsteczki rRNA (8, 40, 41). W takim ujęciu, wspólny prekursor ulegałby rozszczepieniu na cząsteczki dojrzałych rRNA *in statu nascendi*.

Istnieją dane (2, 42) sugerujące, że bakteryjny 23S rRNA powstaje w wyniku dimeryzacji cząsteczek 16S rRNA. Po krótkotrwałym znakowaniu komórek *E. coli* za pomocą ³H-uracylu, piętno wykrywane jest we frakcjach polinukleotydowych o stałych sedymentacji 16S lub niższych; frakcje o stałych sedymentacji pośrednich, między 16S i 23S, piętna natomiast nie zawierają (42). Podkreślono jednak, że dimeryzacji — jeśli miałyby ona miejsce — musiałyby ulegać cząsteczki 16S rRNA odmienne od tych, które wchodzi w skład podjednostek rybosomowych typu 30S. Od dawna wiadomo bowiem, że istnieją duże różnice w składzie nukleotydowym 16S rRNA i 23S rRNA — cząsteczek występujących w podjednostkach rybosomu typu 30S i 50S (43).

Nowosyntetyzowany rRNA u bakterii (ang. „nascent rRNA”) łączy się z białkami jeszcze podczas transkrypcji rDNA (42). O interakcji rRNA-białko powiemy szerzej w rozdziale II. Tu dodać należy, iż właściwe zespalanie rRNA z białkami rybosomowymi, zachodzące u bakterii również w późniejszych etapach „obróbki” potranskrypcyjnej, uzależnione jest od prawidłowego przebiegu procesów metylacji rRNA (44). Metylacjom ulega nowosyntetyzowany rRNA wysokocząsteczkowy (45), jak też rRNA obecny w cząstkach RNP (44) — w tym ostatnim przypadku w grę wchodzi reakcje metylacji w późniejszych etapach „obróbki”. Dodać tu warto, że 5S rRNA metylacjom nie ulega (45). Badania nad metylacją bakteryjnych rRNA sugerują, że proces ten u prokariotów zachodzi bardziej stopniowo niż w komórkach eukariotycznych (44,46, patrz niżej).

Niedawno wykazano (47), że u sinicy *Anacystis nidulans* występują prekursorowe formy rRNA o cząsteczkach nieco większych niż dojrzałe rRNA. Cząsteczka o masie $0,7 \times 10^6$ daltonów jest prekursorem cząsteczki 16S rRNA (o masie $0,56 \times 10^6$ daltonów), natomiast prekursorem 23S rRNA ($1,1 \times 10^6$ daltonów) okazała się cząsteczka bardzo zbliżona pod względem ruchliwości elektroforetycznej do dojrzałego rRNA (47). Dane te sugerują,

że u sinic, podobnie jak u bakterii, w czasie „obróbki” następuje utrata stosunkowo krótkich łańcuchów polinukleotydowych rRNA.

Podobnie przebiega proces dojrzewania rRNA w chloroplastach. Stwierdzono (12), że w plastydach zielonych z liści tytoniu (*Nicotiana rustica*) prekursorem dla niżej spolimeryzowanego rRNA (o masie $0,56 \times 10^6$ daltonów) jest cząsteczka o masie $0,70 \times 10^6$ daltonów, natomiast prekursorem cięższego rRNA ($1,1 \times 10^6$ daltonów) jest cząsteczka o masie $1,3 \times 10^6$ daltonów.

Niedawno wykazano (13), że w mitochondriach grzyba *Neurospora crassa* występuje 32S rRNA — prekursor dwóch wysokopolimeryzowanych rRNA dojrzałych strukturalnie. 32S rRNA ($2,40 \times 10^6$ daltonów) przekształca się w formę pośrednią rRNA ($1,60 \times 10^6$ daltonów), a następnie — w dojrzały 25S rRNA ($1,28 \times 10^6$ daltonów). Prekursorowy 32S rRNA może jednak przekształcać się też w formę pośrednią (o masie $0,90 \times 10^6$ daltonów), z której powstaje następnie dojrzały 19S rRNA (o masie $0,72 \times 10^6$ daltonów). W czasie kolejnych przekształceń cząsteczki rRNA, podlegają utracie fragmenty łańcucha polinukleotydowego bogate w guaninę i cytozynę (G+C). Podobne zjawisko obserwuje się podczas „obróbki” jądrowego rRNA prekursorowego (patrz niżej).

Stopniowa depolimeryzacja łańcuchów rRNA w czasie „obróbki posttranskrypcyjnej” odbywa się przy udziale enzymów rybonukleolitycznych o wysokiej specyficzności (48, 49). Już dawniej stwierdzano (50, 51) aktywność enzymów depolimeryzujących RNA w jądrach i jąderkach u różnych organizmów, niewiele zaś nadal wiadomo o rybonukleazach plastydialnych i mitochondrialnych. Niedawno wykryto endonukleazę (enzym depolimeryzujący RNA począwszy od środka cząsteczki) w jąderkach komórek HeLa (52, 53). Enzym ten depolimeryzuje *in vitro* prekursorowy rRNA zawarty w cząstkach RNP — prekursorach podjednostek rybosomowych. Wysoce specyficzną egzonukleazę (enzym depolimeryzujący RNA począwszy od jednego z końców cząsteczki) wyizolowano z jąder komórek Ehrlicha (54). Podobną rybonukleazę — działającą hydrolytycznie na rRNA począwszy od końca cząsteczki zawierającego wolną grupę 3'-hydroksylową — wyizolowano z jąder i nukleoplazmy komórek L (55).

W jądrach komórkowych u różnych organizmów występują rRNA o różnych wartościach stałych sedymentacji, określanych często na podstawie ruchliwości elektroforetycznej (5, 27, 45, 56). Dla pierwotnych produktów transkrypcji rDNA o stałej sedymentacji 45S podawane są masy cząsteczkowe około 4,5 miliona daltonów (5, 6, 36, 45). Niedawno wykazano (57), że w komórkach L występuje heterogenna populacja cząsteczek prekursorowego rRNA o stałych sedymentacji 45S, 46S oraz 47S. Ze względu na fakt, iż 47S rRNA ulega znakowaniu wcześniej niż 45S rRNA, sugerowano (57), że 47S rRNA może być pierwotnym produktem transkrypcji rDNA. U drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) wykryto prekursorowy 35S rRNA (2,5 miliona daltonów) (58). U ropuchy płatanna (*Xenopus*

laevis) wykryto 40S rRNA (2,6 miliona daltonów) (59, 60). U muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) (61), pierwotniaka *Tetrahymena pyriformis* (62), peizaka (*Amoeba proteus*) (63) i drożdży (*Schizomyces pombe*) (64) wykryto 37S — 38S rRNA (około 2,8 miliona daltonów). Przytoczone tutaj



Schemat 2. Proces skracania łańcuchów polinukleotydowych prekursorowego rRNA

a. Schemat opracowany przez grupę Buscha (67—69, 71, 72) dla komórek guza Novikoffa wątroby szczura. Krzyżykami oznaczono fragmenty łańcucha polinukleotydowego, które w trakcie „obróbki potranskrypcyjnej” 45S rRNA i form pośrednich rRNA są odrzucane i nie wchodzi w skład dojrzałych rRNA cytoplazmatycznych. Fragment P1 — masa cząsteczkowa $0,69 \times 10^6$ daltonów; P2 — $0,80 \times 10^6$ daltonów; P3 — $0,37 \times 10^6$ daltonów (por. 69).

b. Schemat opracowany przez grupę Penmana (73) dla komórek HeLa, szeroko omawiany przez grupę Loeninga (69).

A. Droga główna kolejnych rozpadów prekursorowego rRNA i form pośrednich rRNA. Należy zwrócić uwagę, że 41S rRNA rozpada się na cząsteczkę 32S rRNA i 20S rRNA w sposób zachowawczy — bez utraty „nadmiaru” łańcucha.

B. Droga zaburzonej przemiany rRNA, przebiega zazwyczaj z niewielką intensywnością, w pewnych warunkach, np. po zakażeniu poliwirusowym komórek, intensywność tej drogi znacznie wzrasta. Z 41S rRNA powstaje 36S rRNA.

C. Droga zaburzonej przemiany: podczas rozpadu 41S rRNA — prócz 28S rRNA — „nietypowy” 24S rRNA — prekursor 18S rRNA, zamiast 20S rRNA (patrz A.).

Krzyżykami oznaczono fragmenty łańcucha odrzucane podczas „obróbki”. ■ oznacza 7S rRNA w cząsteczce 32S rRNA i 28S rRNA. W cząsteczce 45S rRNA komórek HeLa (Schemat 2b A.) 3'- i 5'-koniec zaznaczono według pozycji 55 i 140.

dane reprezentują zapewne wartości przybliżone i w toku dalszych badań mogą ulec pewnym poprawkom. Niemniej jednak na ich podstawie można wnosić, że wielkość pierwotnego produktu transkrypcji rDNA (określonego mianem „jednostki transkrypcyjnej rRNA”) (5) jest charakterystyczna dla organizmów o określonej pozycji ewolucyjnej (por. 5, 6). Dla ścisłości należy dodać, że stwierdzano znaczne różnice między masami cząsteczkowymi prekursorowego rRNA u pokrewnych gatunków (59), a niedawno doniesiono (65), że w komórkach liści i korzeni fasoli złotej (*Phaseolus aureus*) występują dwa odmienne typy prekursorowego rRNA.

Produkty depolimeryzacji prekursorowego rRNA — formy pośrednie rRNA określane również, choć niezupełnie ściśle, prekursorowymi — charakteryzują się stałymi sedymentacji 41S (3, 1×10^6 daltonów, np. w komórkach HeLa) (52, 59, 66), 35S (2, 3×10^6 daltonów, np. w komórkach guza Novikoffa) (67—70), 32S (2, 1×10^6 daltonów, np. w komórkach HeLa) (59); należy do nich także jąderkowy 28S rRNA (komórki guza Novikoffa), którego cząsteczka jest o około 10% większa niż cząsteczka dojrzałego 28S rRNA cytoplazmatycznego (1, 7×10^6 daltonów) (71, 72). W jądrach komórek HeLa wykryto (73) — w niewielkich ilościach — 36S rRNA ($2,5 \times 10^6$ daltonów) i 24S rRNA (1, 4×10^6 daltonów). Dwa ostatnie rRNA są najprawdopodobniej produktami zaburzonej „obróbki” — nagromadzają się bowiem podczas infekcji wirusem polio komórek HeLa (73). 24S rRNA jest wówczas prekursorem 18S rRNA. Ten ostatni powstaje w warunkach normalnych z 20S rRNA (0, 95×10^6 daltonów) (59, 73). W komórkach guza Novikoffa bezpośrednim prekursorem dojrzałego 18S rRNA (0, 7×10^6 daltonów) jest 23S rRNA ($1,3 \times 10^6$ daltonów) (69). 23S rRNA powstaje z rozpadu cząsteczki 45S rRNA — równocześnie z uwolnieniem 35S rRNA (67—69). Przytoczone dane zestawiono na Schemacie 2.

Niskocząsteczkowy 7S rRNA występuje łącznie z 28S rRNA, a być może jest obecny w 32S rRNA (33—36, 73). Wiadomo, że *in vitro* powstawanie dupleksu 7S rRNA—27S rRNA w jądrach żaby (*Rana pipiens*) jest utrudnione (36).

Depolimeryzacja poszczególnych rRNA odbywa się w jąderku, po przyłączeniu białek do łańcucha polinukleotydowego. Dojrzałe podjednostki rybosomowe powstałe w jąderku (por. roz. II) przedostają się — *via* nukleoplazma — do cytoplazmy, gdzie — przy udziale czynnika asocjacji podjednostek (74) i informacyjnego RNA — powstają rybosomy pełne i agregaty polisomalne (75).

Współreakcja (interakcja) rRNA z białkami zarówno u bakterii, jak i u eukariontów umożliwia prawidłowy przebieg procesu „obróbki” — białka chronią łańcuch polinukleotydowy przed niespecyficznym działaniem rybonukleaz (por. 2). Podobną rolę w stosunku do mRNA pełnią białka wykrywane w cytoplazmatycznych informosomach (76) i w jądrowych informoferach (77).

Analogiczne znaczenie może mieć metylacja rRNA zachodząca pod-

czas „obróbki potranskrypcyjnej”. Dzięki metylacji może bowiem zwiększać się „stopień upakowania” łańcuchów polinukleotydowych, które wówczas stają się mniej dostępne na działanie rybonukleaz (por. 78). Metylacja umożliwia też prawidłowe zespalanie się rRNA z białkami (11, 44—46). Najprawdopodobniej, właściwe umetylowanie rRNA jest niezbędne dla funkcjonalnej dojrzałości rRNA obecnego w rybosomach na terenie cytoplazmy.

Podczas „obróbki” rRNA metylacji ulegają bądź 2'-grupy hydroksylowe reszt rybozy (O-metylacje) (79), bądź też — zasady azotowe (N-metylacje) (80). W jądrowym rRNA komórek HeLa stwierdzono obecność trzech metylowanych zasad azotowych: N⁴-metylocytozynę, N⁶-metyloadeninę i N⁶-dwumetyloadeninę (81). Ogólnie przyjmuje się, że u bakterii ulegają metylacji głównie zasady azotowe rRNA (por. 2, 80), natomiast u eukariontów zachodzi przede wszystkim O-metylacja (79, 82).

Dzięki metylacji 2'-grup hydroksylowych zwiększa się trwałość wiązania fosfodwuestrowego tworzonego przez sąsiednią 3'-grupę -OH (2, 37). Nie może bowiem wówczas powstać cykliczny nukleotyd (2', 3'-nukleozidomonofosforan) — pośredni produkt działania rybonukleaz cyklizujących (por. 83).

I-3. Przebieg „obróbki potranskrypcyjnej”

W badaniach nad przebiegiem „obróbki” posługiwano się techniką sztucznej hybrydyzacji rRNA-rDNA, analizą sedymentacyjną rRNA, analizą składu nukleotydowego i elektroforezą rRNA na żelach poliakrylamidowych. Posługiwano się też techniką „znakowania—przemieszczania” piętna (ang. „pulse—chase”): po wbudowaniu radioaktywności do rRNA, ulega ona przemieszczeniu do kolejno powstających intermedatów pod wpływem nadmiaru nieznakowanych zasad azotowych, nukleozydów względnie nukleotydów.

Najlepiej poznane są losy metaboliczne rRNA u eukariontów. Do badań używano najczęściej komórek HeLa, komórek L, komórek guza Novikoffa i komórek wątroby szczura.

Pracownicy grupy Scherrera (84, 85) wykazali, że w jąderkach komórek HeLa występuje szybkoznakujący się (w ciągu 3—5 minut) wielkocząsteczkowy RNA o stałej sedymentacji 45S. Piętno tego RNA przemieszcza się po 15—20 minutach do 32S rRNA wykrywanego również w jąderku i do 18S rRNA obecnego w cytoplazmie. Perry (86) określił 45S RNA mianem prekursorowego rRNA. Autor ten już uprzednio wykazał (87), że podczas inkubacji komórek L z promieniotwórczymi prekursorami RNA, jąderkowy kwas rybonukleinowy ulega znakowaniu w pierwszej kolejności — dopiero później radioaktywny RNA wykrywany jest w cytoplazmie. Przeważającą część RNA cytoplazmy stanowi rRNA, a zatem można było sądzić, że właśnie w jąderku powstaje ta klasa polimeru.

Sugestia ta została potwierdzona doświadczalnie: po dezaktywacji jąderka za pomocą mikrowiązki światła nadfioletowego komórki wykazywały niemal 90% spadek syntezy RNA (88). Okazało się, że jąderkowy RNA cechuje się wysoką zawartością G+C (89—92), podobnie jak rRNA wykrywany w rybosomach cytoplazmatycznych. Skład nukleotydowy RNA wytwarzanego w jąderku *in vitro* zależy od stężenia histonów — białek wprzęgniętych prawdopodobnie w procesy regulacji aktywności genomu jądrowego (93).

W ostatnich latach stwierdzono (94—97), że u różnych organizmów występuje specyficznie jąderkowa polimeraza RNA. Cykliczny peptyd, amantyna, wyizolowany z muchomora (*Amanita phalloidea*), hamuje aktywność polimerazy RNA występującej w nukleoplazmie, nie wpływa natomiast na polimerazę jąderkową.

Wysokocząsteczkowy RNA wykrywany w jąderku uznany więc został za prekursorowy rRNA (84—86, 98, 99). Jak wspomniano, 45S rRNA komórek HeLa syntetyzuje się w ciągu 3—5 minut, a po około 15 minutach rozpada się on na 32S rRNA i 18S rRNA. Znakowanie 28S rRNA wykrywanego w cytoplazmie ma miejsce dopiero po upływie około godziny od rozpoczęcia syntezy 45S rRNA (2, 100, 101). Znaczyłoby to, że „obróbka” łańcuchów rRNA przekształcających się ostatecznie w 18S rRNA i 28S rRNA przebiega odmiennymi drogami: przebieg dojrzewania tego ostatecznie wydaje się bardziej skomplikowany. Jest to zjawisko bardziej powszechne — również u roślin obserwowano znacznie późniejsze pojawianie się piętna w 18S rRNA (por. 102).

Sugerowano (57, 103—105), że 18S rRNA i 28S rRNA u ssaków wywodzą się z dwu puli prekursorowego rRNA powstających w nukleoplazmie i w jąderku. Próbowano udowodnić, że synteza rRNA zachodzi zarówno w jąderku, jak i w chromatynie nukleoplazmatycznej (106). Sugerowano (107), iż u muchówki *Chironomus tentans* dojrzewanie rRNA odbywa się w nukleoplazmie. Nie wykluczano, że ostateczne dojrzewanie strukturalne jąderkowego rRNA — po wstępnej „obróbce” w nukleoplazmie — odbywa się w jąderku (108). O udziale poszczególnych struktur jądra, a także jąderka, w syntezie RNA mówiliśmy szerzej w innym artykule (25).

Depolimeryzacja prekursorowego rRNA i jego form pośrednich w czasie „obróbki potranskrypcyjnej” ma charakter niezachowawczy, tzn. towarzyszy jej utrata części łańcuchów polinukleotydydowych. W pracowni Perry'ego (5) rozważano niezachowawczy charakter depolimeryzacji rRNA w aspekcie ewolucyjnym. Na podstawie badań własnych i badań innych autorów pracownicy grupy Perry'ego sugerowali, że istnieją dwa podstawowe typy pierwotnych transkryptów rDNA. U ssaków (mysie komórki L) i ptaków (fibroblasty kurczęcia) masa cząsteczkowa pierwotnego transkryptu rDNA jest rzędu 4 milionów daltonów, natomiast u roślin (drożdże, tytoń) i niższych zwierząt, łącznie z gadami (owady: *Drosophila*, *Chironomus* i *Rhynchosciara*, pierwotniaki: *Tetrahymena* i pełzak *Amoeba*,

pierścienica *Urechis*, komórki wątroby jaszczurki *Iguana iguana*, zarodki żaby *Rana pipiens* oraz komórki gonad pstrąga — *Salmo gairdneri*) masa cząsteczkowa prekursorowego rRNA wynosi około 3 milionów daltonów. O ile u ptaków i ssaków w trakcie „obróbki” rRNA ulega utracie około 50% cząsteczki łańcucha polinukleotydu — łączna masa dojrzałych rRNA wynosi około 2,5 miliona daltonów — to u roślin i niższych zwierząt dojrzewanie prekursorowego rRNA wiąże się z utratą około 25% łańcucha. Sugerowano więc, że w miarę rozwoju filogenetycznego organizmów zmniejsza się „ekonomiczność” procesu dojrzewania rRNA (5). W takim ujęciu, najbardziej „ekonomicznym” byłby proces „obróbki” rRNA u prokariotów, u których prekursorowe „16S” i „23S” formy rRNA niewiele tylko przewyższają masą cząsteczkową łańcuchy dojrzałych rRNA.

Dyskutowano (45, 59), czy fragmenty polinukleotydu odrzucane w czasie „obróbki” rRNA mogą spełniać jakąkolwiek rolę regulacyjną w procesie syntezy rRNA i w procesie zespalania się tego RNA z białkami rybosomowymi. Jest to jednak mało prawdopodobne ze względu na krótki okres trwania tych fragmentów (59). Powstają one zapewne na matrycy tzw. przedzielającego (ang. *spacer*) rDNA zespolonego z cistronami dla rRNA (por. 1). U organizmów na niższych szczeblach rozwoju ewolucyjnego (owady, płazy, gady) przedzielający rDNA nie ulega, najprawdopodobniej, transkrypcji — wskazywałyby na to elektronogramy rDNA (5, 109). Nie wykluczone jest jednak, że u ssaków liczba cistronów kodujących odrzucane w czasie „obróbki” segmenty rRNA uległa zwiększeniu w toku ewolucji (5).

W miarę dojrzewania rRNA zmniejsza się w nim zawartość G+C. O ile fragmenty odrzucane zawierają około 77% G+C, to zawartość obu zasad azotowych w dojrzałych rRNA komórek HeLa wynosi 65% (por. 5). Podkreślić tu trzeba, że przedzielający rDNA wykazuje wyższą zawartość G+C niż rDNA kodujący sekwencje nukleotydu wykrywane w dojrzałych rRNA (por. 1). Fakty te mogą być wskazówką, co do udziału określonych segmentów rDNA (cistronów dla rRNA i przedzielającego rDNA) w syntezie poszczególnych sekwencji polinukleotydu prekursorowego rRNA (odpowiadających dojrzałym rRNA i fragmentów odrzucanych) (110, 111).

W badaniach nad składem nukleotydu rRNA wielce pomocne okazały się doświadczenia hybrydyzacyjne. Okazało się, że rDNA komórek guza Novikoffa wykazuje 0,25%, 0,35% i 0,52% komplementarności w stosunku — odpowiednio — do: jąderkowych 28S rRNA, 35S rRNA i 45S rRNA, a jedynie 0,08% — w stosunku do 18S rRNA i 0,19% — do 28S rRNA wykrywanych w cytoplazmie (67). Z doświadczeń kompetycyjnych wynika, że cytoplazmatyczny 28S rRNA współzawodniczy o miejsce na nici rDNA z jąderkowym 28S rRNA, 35S rRNA i 45S rRNA odpowiednio w 84%, 63% i 43%, natomiast 18S rRNA nie wykazuje podobnego współzawodnictwa ani z jąderkowym 28S rRNA, ani z 35S rRNA, współzawod-

niczy natomiast w 17% z 45S rRNA (67). Przytoczone wyniki świadczą przekonująco, że w miarę skracania łańcucha rRNA podczas „obróbki” zmniejsza się podobieństwo jego składu nukleotydowego do rDNA (por. 27).

Z licznych prac wiadomo, że prekursorowy rRNA o stałej sedymentacji 45S zawiera pojedyncze sekwencje nukleotydowe odpowiadające dojrziałym 28S rRNA i 18S rRNA (59, 112, 113). Obecność sekwencji polinukleotydowych obu dojrziałych rRNA w 45S rRNA komórek guza Novikoffa wykazano również metodami chemicznymi (68).

Stwierdzono (114), że sekwencje odpowiadające 18S rRNA i 28S rRNA występują nie tylko w 45S rRNA, lecz również w 41S rRNA komórek HeLa. Z drugiej jednak strony, 32S rRNA zawiera — prócz odcinków odrzucanych w czasie „obróbki” — jedynie łańcuch odpowiadający 28S rRNA. Znaczy to, iż podczas rozpadu 41S rRNA uwalnia się 32S rRNA i prekursor 18S rRNA—20S rRNA (114).

Badania hybrydyzacyjne wykazały, że również u drożdży *Schizomyces pombe* prekursorowy rRNA (o stałej sedymentacji 38S) zawiera pojedyncze sekwencje polinukleotydowe 18S rRNA i 25S rRNA (64). Prekursorowy 42S rRNA u drożdży *Saccharomyces carlsbergensis*, a także formy pośrednie 37S rRNA i 32S rRNA, zawierają pojedyncze sekwencje odpowiadające obu dojrziałym rRNA (115, por. 116). Rozpad 32S rRNA na 29S rRNA (stanowiącego bezpośredni prekursor cytoplazmatycznego 26S rRNA) i 18S rRNA (bezpośredni prekursor cytoplazmatycznego 17S rRNA) byłby rozpadem zachowawczym, bez utraty łańcucha (por. dane o „obróbce” rRNA u *S. cerevisiae* — 58).

Bezpośrednim prekursorem cytoplazmatycznego 28S rRNA w komórkach guza Novikoffa jest jąderkowy rRNA o analogicznej stałej sedymentacji (71). W obu rRNA wykazano obecność identycznych, podobnie umetylowanych, sekwencji nukleotydowych (72). Współczynnik specyficzności (czyli stosunek zawartości A+U/G+C (por. 117)) dla obu rRNA jest zbliżony i wynosi około 0,50. Wskazuje to, iż przekształceniu rRNA jąderkowego w cytoplazmatyczny nie towarzyszy poważniejsza zmiana struktury I-rzędowej. Wiadomo (69), że od jąderkowego 28S rRNA odłącza się wówczas fragment łańcucha o masie około 370 000 daltonów.

Jąderkowy 28S rRNA powstaje w komórkach HeLa z 32S rRNA (118). O ile 32S rRNA zawiera 70% G+C, to jąderkowy 28S rRNA — 67%, a cytoplazmatyczny 28S rRNA — 66%. Fakt, iż 18S rRNA zawiera znacznie mniej obu nukleotydów (56%) (114), dodatkowo potwierdza, że odłącza się on od prekursorowego rRNA we wcześniejszych etapach „obróbki”. Podobnym potwierdzeniem są wyniki badań nad rRNA w komórkach guza Novikoffa: o ile jąderkowe 45S rRNA, 35S rRNA i 28S rRNA oraz cytoplazmatyczny 28S rRNA zawierają wspólny 600-nukleotydowy fragment bogaty w G+C, to 18S rRNA fragmentu takiego nie zawiera (119).

Bezpośrednim prekursorem 18S rRNA w komórkach guza Novikoffa jest jąderkowy 23S rRNA (48). Oba rRNA zawierają podobną ilość dwu-

nukleotydów stabilnych w środowisku zasadowym, a na 5'-końcu cząsteczki zawierają układ pGp (5', 3'-guanozynodwufosforan), co wskazuje na wspólne ich pochodzenie. Jednakże, o ile 18S rRNA zawiera na swym 3'-końcu adenozyne, to 23S rRNA — urydyne. Wynikałoby stąd, że 23S rRNA zawiera łańcuch odpowiadający 18S rRNA na swoim 5'-końcu (48).

W komórkach HeLa bezpośredni prekursor 18S rRNA — 20S rRNA — odłącza się od 41S rRNA (59, 73), jednakże może również odłączyć się fragment „nietypowy” o stałej sedymentacji 24S — nieznaczny ilościowo rRNA wykrywany w jąderku (73).

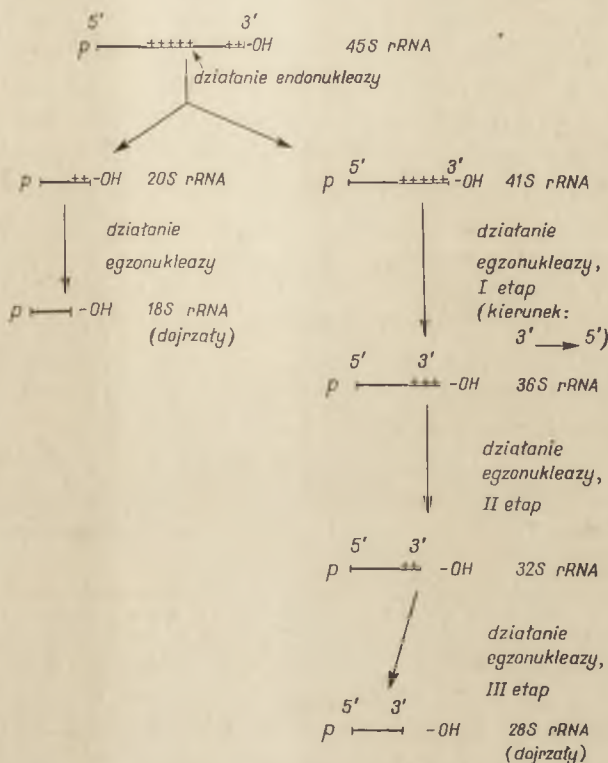
Od niedawna prowadzone są badania nad „obróbką potranskrypcyjną” rRNA u roślin wyższych (por. 120). Obecność prekursorowego rRNA stwierdzono u grochu (121), marchwi (56), pietruszki (102), jaworu (*Acer pseudoplatanus*) (122). W tym ostatnim przypadku wykryto 42S rRNA ($2,9 \times 10^6$ daltonów) i produkt jego rozpadu — 36S rRNA ($2,3 \times 10^6$ daltonów). 36S rRNA rozpada się z kolei na cząsteczkę 27S rRNA — bezpośredni prekursor dojrzałego 26S rRNA i 20S rRNA — bezpośredni prekursor 17S rRNA (122).

U roślin, podobnie jak w komórkach HeLa (patrz wyżej), mniejsza cząsteczka rRNA pojawia się w cytoplazmie wcześniej niż cząsteczka większa (102, 122). Pewnym wyjątkiem w tym względzie okazały się komórki śliliankowe muchówki *Chironomus* — „obróbka” 23S rRNA (prekursora dla 18S rRNA) trwa w tych komórkach około 90 minut, a więc znacznie dłużej niż u większości organizmów zwierzęcych i roślinnych.

Badania nad czasem znakowania się (a więc i syntezy) obu wysokopolimeryzowanych rRNA okazały się przydatne dla celów określenia topograficznego rozmieszczenia sekwencji polinukleotydowych tych rRNA w prekursorowym rRNA. Stwierdzono na przykład, że u żaby (*Rana pipiens*) jądrowy 18S rRNA ulega maksymalnemu znakowaniu *in vitro* już po 5 minutach, natomiast 28S rRNA — po 7 minutach od rozpoczęcia inkubacji (36). Wyliczono jednocześnie, że w ciągu 1 minuty (w temperaturze 27°) syntetyzuje się fragment polinukleotydowy o masie około 260 000 daltonów. W oparciu o te dane — i przy założeniu, że synteza rRNA odbywa się w kierunku od 5'-końca jego cząsteczki (zawierającego wolną grupę -OH przy węglu nr 5 rybozy) do 3'-końca — można przypuszczać, że 18S rRNA nie leży na skraju 3'-końca cząsteczki prekursorowego rRNA. Przy podanej wyżej szybkości wydłużania łańcuchów rRNA, 18S rRNA — jeśli byłby ulokowany na skraju 3'-końca prekursorowego rRNA — pojawiałby się już po około 3 minutach. Maksymalnie znakowane fragmenty o masie od 0,7 do $1,2 \times 10^6$ daltonów pojawiały się jednak dopiero po 5 minutach. Sugeruje to, że na skraju 3'-końca prekursorowego rRNA leży niestabilny (ulegający rozpadowi po uwolnieniu) fragment o masie około 500 000 daltonów, z którym sąsiaduje 18S rRNA (36).

Badania nad szybkością transkrypcji rDNA platanny (*X. laevis*) wykazały, że po 15 minutach od rozpoczęcia syntezy rRNA powstaje 5-cio

krotnie więcej 18S rRNA niż 28S rRNA (124). Przyjmując, że wydłużanie łańcucha rRNA przebiega od 5'-końca jego cząsteczki (jak wyżej), sugerowano (110, 124), iż segment 18S rRNA leży w pobliżu 5'-końca prekursorowego rRNA u tego organizmu.



Schemat 3. Udział enzymów rybonukleolitycznych w procesie „obróbki potranskrypcyjnej” prekursorowego rRNA w komórkach L myszy

Model zaproponowany przez grupę Perry'ego (55). Do badań użyto specyficzną (działającą od 3'-końca cząsteczki, por. wykaz skrótów) egzorybonukleazę wydzieloną z jąderka i nukleoplazmy komórek L. Stwierdzono, że 45S rRNA i 32S rRNA zawierają na 3'-końcach cząsteczek segmenty polinukleotydowe (zawierające ponad 600 nukleotydów) słabo zmetylowane, hydrolizowane przez 3'-OH specyficzną egzorybonukleazę. Znacznie słabsze działanie enzymu zaobserwowano w stosunku do dojrzałych 28S rRNA i 18S rRNA. Model ten zakłada, że po oddzieleniu — pod wpływem endorybonukleazy — fragmentu 20S rRNA, położonego na 3'-końcu 45S rRNA, egzorybonukleaza stopniowo hydrolizuje segmenty słabo umetylowane, w wyniku czego uwalniają się kolejno 36S rRNA, 32S rRNA, oraz — niezależnie — 18S rRNA z prekursorowego 20S rRNA. Model ten pozostaje w zgodzie z badaniami grupy Buscha (67—69, 71, 72) nad „obróbką” rRNA komórek guza Novikoffa oraz — grupy Castona (36) (rRNA żaby), a zarazem jest niezgodny z sugestiami grupy Browna (110, 124) oraz grupy Penmana (140, por. Schemat 2b). Ci ostatni autorzy (110, 124, 140) uważają, że 18S rRNA znajduje się w pobliżu 5'-końca cząsteczki prekursorowego rRNA w komórkach — odpowiednio — ropuchy platanna (*X. laevis*) i HeLa.

Na schemacie krzyżykami zaznaczono słabo umetylowany segment polinukleotydowy odznaczony podczas „obróbki”.

Z drugiej strony, badania nad kinetyką hydrolizy 45S rRNA, 32S rRNA i jądkowego 28S rRNA komórek L przy udziale jądkowej i nukleoplaz-

matycznej egzonukleazy z tych komórek, działającej począwszy od 3'-końca cząsteczek rRNA wykazały, że 18S rRNA leży w pobliżu 3'-końca cząsteczki prekursorowego kwasu rybonukleinowego (55). Sugestię na temat rozmieszczenia sekwencji 18S rRNA i 28S rRNA w prekursorowym rRNA komórek L przedstawiono graficznie na schemacie 3. Warto tu dodać, że w wyniku działania egzonukleazy, od poszczególnych rRNA oddzielały się fragmenty nisko zmetylowane, jakimi są również fragmenty polinukleotydowe odrzucane podczas „obróbki” (patrz niżej).

Na podstawie badań nad rozmieszczeniem metylowanych nukleotydów w rejonie 5'-końca cząsteczki 45S rRNA, 35S rRNA i jąderkowego 28S rRNA komórek guza Novikoffa, sugerowano (67), że i tu 18S rRNA leży w pobliżu 3'-końca prekursorowego rRNA.

Sledzenie piętna znakowanych grup metylowych w rRNA okazało się pomocne dla wyjaśnienia jego losów metabolicznych. Metylacji ulega głównie prekursorowy rRNA, najprawdopodobniej jeszcze podczas transkrypcji rDNA (125, 126), a także już po ukończeniu syntezy (127). Liczba grup metylowych zawartych w 45S rRNA odpowiada sumarycznej zawartości grup metylowych w 18S rRNA i 28S rRNA (79). 32S rRNA zawiera podobną liczbę grup metylowych jak 28S rRNA (73). 28S rRNA jest jednak zmetylowany w mniejszym stopniu niż 18S rRNA (73, 82). Dane te sugerują, że 32S rRNA jest prekursorem dla 28S rRNA, lecz nie jest prekursorem 18S rRNA (73).

W miarę skracania łańcuchów rRNA w trakcie „obróbki” wzrasta aktywność właściwa piętna grup metylowych (73, 112, 128). Aktywność tę wyraża się stosunkiem piętna grup metylowych do piętna ^{32}P (73), lub do piętna izotopów zawartych w zasadach azotowych (112, 128). Dla przykładu można podać, że o ile dla 45S rRNA komórek HeLa metylacja właściwa (stosunek ^3H -grup metylowych/ ^{32}P) wynosi 0,36, dla 41S rRNA — 0,45, dla 32S rRNA — 0,48, to dla dojrzałych 28S rRNA — wynosi ona 0,60, a dla 18S rRNA — 0,89 (73). Dane te wskazują, że w miarę skracania łańcucha rRNA ulegają odszczepianiu słabo zmetylowane fragmenty polinukleotydowe (55, 73, 114, 129), bogate zarazem w G+C (por. 130).

Prócz metylacji 45S rRNA niewykluczona jest dodatkowa metylacja podczas uwalniania 32S rRNA (37). Znane jest pojęcie „późnej metylacji”, w wyniku której w cząsteczce 18S rRNA pojawia się dwumetyloaminopuryna — pochodna nie występująca w cząsteczkach rRNA uwalnianych we wczesnych etapach depolimeryzacji pierwotnego transkryptu (127).

Podobnie jak 18S rRNA w komórce eukariotycznej jest bardziej metylowany niż 28S rRNA (73, 82), tak też u bakterii 16S rRNA ulega metylacji preferencyjnie w porównaniu do 23S rRNA (80). Wskazują na to stosunki ilości piętna grup metylowych do piętna adeniny (80).

W porównaniu do metylacji rRNA u eukariontów, metylacja rRNA u bakterii przebiega w sposób bardziej stopniowy. Tak na przykład, jeśli komórki HeLa inkubować w obecności aktynomycyny D, hamującej synte-

zę prekursorowego rRNA, lecz nie zakłócającej procesu „obróbki potranskrypcyjnej” polimeru uprzednio zsyntetyzowanego, to tracą one szybko zdolność do włączania piętna grup metylowych. Świadczy to, że metylacji ulega głównie — jeśli nie jedynie — prekursorowy rRNA (126). U bakterii natomiast reakcje późnej metylacji rRNA umożliwiają prawidłowy przebieg zespalań się łańcuchów polinukleotydowych z białkami (44, patrz roz. II). Cząstki RNP powstające u bakterii w warunkach sztucznie zakłóconej syntezy białek, uważane za prekursorowe formy rybosomów (por. 131), bądź też wykryte w komórkach hodowanych w normalnych warunkach (11, 132), zawierają słabo umetylowany rRNA. Przekształcenie cząstek RNP w dojrzałe podjednostki rybosomowe zachodzi w warunkach umożliwiających metylację rRNA (44, 132).

W warunkach tzw. głodu metioninowego (por. 131) zarówno u bakterii (46, 131), jak i w komórkach HeLa (patrz niżej) nie powstają dojrzałe podjednostki rybosomowe. U eukariontów metylacja rRNA zachodzi w jąderku, w tej organelli wykryto zespoły metylaz (78, 81, 133). W jąderku powstają też cząstki RNP (patrz roz. II) nawet podczas głodu metioninowego (134). Zawierają one 45S rRNA, względnie 32S rRNA (134—136). A zatem, dla właściwego przebiegu początkowych etapów „obróbki potranskrypcyjnej” rRNA u eukariontów — depolimeryzacji 45S rRNA, uwolnienia 32S rRNA i interakcji rRNA z białkami, metylacja łańcuchów polinukleotydowych nie wydaje się niezbędna (134). Konieczna jest ona natomiast dla przebiegu dalszych etapów dojrzewania rRNA, bowiem słabo zmetylowany 32S rRNA obecny w cząstkach RNP wykrywanych w jąderku (135, 136) ulega niespecyficznemu działaniu rybonukleaz i rozpada się w sposób niekontrolowany (134). Bakteryjne cząstki RNP zawierające słabo umetylowany rRNA również są bardziej wrażliwe na działanie rybonukleazy (11), jednakże są one wykorzystywane w procesie biogenezy podjednostek rybosomowych (11, 132).

I-4. Uwagi ogólne na temat „obróbki potranskrypcyjnej” rRNA

Proces „obróbki” odbywa się głównie w jąderku (por. 3). Być może, jedynie przekształcenie bezpośredniego prekursora 18S rRNA w dojrzałą formę wykrywaną w cytoplazmie odbywa się w pobliżu wewnętrznej otoczki jądrowej, lub w tzw. siateczce nukleoproteidowej jądra (3), w skład której — prócz jąderka — wchodzi pewne rybonukleoproteidy nukleoplazmatyczne (137, patrz roz. II).

W badaniach nad losami metabolicznymi rRNA stosowano różne substancje wpływające bądź na syntezę, bądź też na procesy związane z „obróbką potranskrypcyjną” polimeru. I tak, leworfanol (syntetyczna morfina) hamuje specyficznie syntezę rRNA w jąderku, a inhibicję tę znosi spermidyna: można stąd wnosić, że poliaminy są wprzęgnięte w regulację procesu transkrypcji rDNA (138). Alkaloid kamptotecyna hamuje odwracalnie syn-

tezę prekursorowego rRNA nie wpływając na uwalnianie 32S rRNA; ten ostatni nie może jednak przekształcać się w 28S rRNA (139).

Kordycepina (3'-dezoksyadenozyna) hamuje proces wydłużania łańcucha prekursorowego rRNA — powstają jedynie krótkie fragmenty polinukleotydowe, a także 18S rRNA (140). Przyjmując, że synteza rRNA odbywa się począwszy od 5'-końca cząsteczki, doświadczenia z użyciem kordycepiny mogą sugerować, iż 18S rRNA jest ulokowany w pobliżu 5'-końca prekursorowego rRNA (140).

Tojokamicyna (analog adenozyne zawierający grupę nitrylową $-C\equiv N$ w pozycji 7 pierścienia purynowego) hamuje syntezę obu dojrzałych rRNA, nie zaburzając przy tym syntezy 45S rRNA. Wskutek zmiany struktury I-rzędowej tego ostatniego niemożliwa staje się prawidłowa depolimeryzacja cząsteczki (141).

Aktynomycyna D — użyta w niskim stężeniu — hamuje syntezę 45S rRNA, nie zakłóca natomiast jego „obróbki” (126). Prawdopodobnie antybiotyk ten uszkodza strukturę jąderka (26). Syntezę prekursorowego rRNA zakłóca również puromycyna, hamująca zarazem syntezę białek (99). Cykloheksoimid spowalnia jedynie syntezę 45S rRNA, 32S rRNA i 28S rRNA, blokuje natomiast syntezę 18S rRNA (118). Ryfampicyna działa różnicowo na syntezę dwu puli rRNA w komórce roślinnej: hamuje syntezę rRNA w chloroplastach liści tytoniu, nie wpływa natomiast na transkrypcję rDNA jądrowego (12).

W badaniach nad „obróbką” rRNA pozostaje wiele problemów niezupełnie wyjaśnionych. Nie wiadomo na przykład, jaki jest udział egzorybonukleaz i endorybonukleaz w procesie „obróbki” łańcuchów polinukleotydowych. Możliwe jest, że endonukleaza musi działać raz lub dwa razy w czasie całego procesu dojrzewania rRNA (por. 55).

Nie wiadomo, jakie znaczenie ma proces przekształcania reszt urydyny w pseudourydynę występującą w rRNA u niektórych organizmów (67, 142, 143). Sugerowano, że u eukariontów przekształcenie to ma miejsce w cząsteczce 45S rRNA (2, 143).

Mało poznany jest proces „obróbki” plastydialnych i mitochondrialnych rRNA (por. roz. I-2.). Powstają one w chloroplastach i mitochondriach (por. 144, 145). Cistrony dla plastydialnych rRNA ulegają najprawdopodobniej aktywacji na świetle (145, 146). Po oświetleniu rośliny etiolowanej następuje preferencyjna synteza plastydialnego rRNA (146). Przypuszcza się, że część cistronów dla plastydialnych i mitochondrialnych rRNA występuje w jądrze komórkowym (147). W liściach tytoniu (*Nicotiana tabacum*) jądrowe cistrony dla rRNA chloroplastów są ulokowane w innych segmentach rDNA niż cistrony kodujące rRNA cytoplazmy. rRNA związane z plastydami i mitochondriami stanowią około 30% rRNA komórki (149).

Niewielki odsetek RNA komórki stanowią prekursorowy rRNA i formy pośrednie polimeru. O ile dojrzałe rRNA stanowią około 80% RNA komórkowego (w tym 28S rRNA — 50%, 18S rRNA — 25% oraz 5S rRNA i 7S

rRNA — po około 1⁰/₀), to 45S rRNA stanowi 1⁰/₀, a 32S rRNA — 3⁰/₀ całkowitego RNA komórki (70). Wykrycie prekursorowych i pośrednich form rRNA okazało się możliwe dzięki subtelnym metodom rozdziału poszczególnych frakcji rRNA. Poza analizą sedymentacyjną szczególnie przydatną okazała się technika elektroforezy rRNA na żelu poliakrylamidowym (2, 3, 27, 45, 56, 66, 101, 102, 128, 129, 142, 150—154).

II. Powstawanie cząstek rybonukleoproteidowych (RNP) — prekursorów podjednostek strukturalnych rybosomu

Zespolenie łańcuchów poliribonukleotydowych rRNA z białkami rybosomowymi ma miejsce już we wczesnych stadiach „obróbki potranskrypcyjnej” — jeszcze podczas transkrypcji rDNA. Tym samym, proces dojrzewania strukturalnego łańcuchów rRNA jest ściśle zespolony z procesem biogenezy rybosomów.

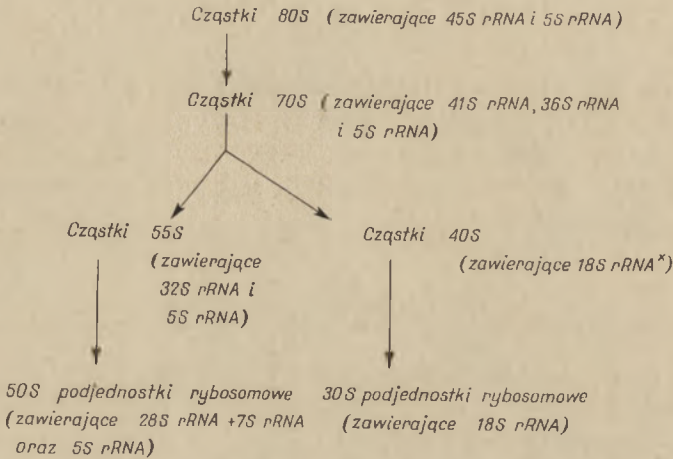
II-1. Cząstki RNA u eukariontów

Już pod koniec lat pięćdziesiątych B o n n e r (cyt. wg 155) wysunął hipotezę postulującą, że rybosomy cytoplazmatyczne powstają w jądrze komórkowym. Cząstki RNP wykryto w jądrach wielu typów komórek (137, 155—159), jednocześnie bonnerowska hipoteza znajdowała wielu zwolenników. Badania prowadzone z użyciem mikroskopu elektronowego wykazały, że w jądrze komórek wątroby szczura występuje zespół cząstek RNP w postaci charakterystycznych wiązek promieniście rozchodzących się z jąderka — poprzez nukleoplazmę — do wewnętrznej błony jądrowej (137). Zespół taki, określony nazwą „jądrowa siateczka nukleoproteidowa”, uznano za morfologiczne odzwierciedlenie drogi przenikania rybosomów z jąderka do cytoplazmy (137).

Obecnie wiadomo (160), że w jądrze komórkowym występują też rybosomy wprzęgnięte, być może, w procesy wewnątrzjądrowej syntezy białek. Możliwość syntezy białek w jądrze jest jednak problemem dyskusyjnym (por. 161), chociaż wielokrotnie stwierdzano, że jąderko i nukleoplazma włączają znakowane aminokwasy (162, 163).

Szczegółowe badania wykazały, że cząstki RNP wykrywane w jądrach komórek HeLa charakteryzują się stałymi sedymentacji 45S i 60S, przypominając tym samym podjednostki strukturalne rybosomów cytoplazmatycznych (164, 165). Stwierdzono następnie, że łączenie się białek z rRNA jest procesem kilkietapowym: około 60% białek wykrywanych w rybosomach cytoplazmatycznych przyłącza się do rRNA w sposób trwały już na terenie jądra, 20% białek obecnych w rybosomach może ulegać wymianie z białkami cytosolu komórki (166).

W pracowni D a r n e l l a (167) stwierdzono, że cząstki RNP przedostają się z jądra do cytoplazmy, gdzie łączą się z informacyjnym RNA tworząc agregaty polisomalne (75). Po krótkiej inkubacji komórek ze znakowanymi prekursorami RNA, cząstki RNP wykrywane w jądrze zawierały piętno, które następnie stwierdzano w cytoplazmatycznych rybosomach: znakowany 18S rRNA pojawiał się znacznie wcześniej niż 28S rRNA. Przypominało to obserwacje dotyczące kolejnego pojawiania się w cytoplazmie 18S rRNA i 28S rRNA jako produktów „obróbki potranskrypcyjnej” prekursorowego rRNA (por. roz. I-3 oraz Schemat 4).



Schemat 4. a. Kolejne przekształcenia prekursorowych cząstek RNP w jąderku

Schemat opracowany przez Scherrera opublikowany przez Buscha i Smetanę (3). Na schemacie zaznaczono dodatkowo rozmieszczenie 5S rRNA według danych grupy Warnera (135, 136, 171), grupy Nomury (209) i grupy Penmana (26) oraz 7S rRNA występującego jako wewnątrzcząsteczkowe zagięcie łańcucha 28S rRNA (33, 34, 36, 59).

* w publikacji oryginalnej (3) podano tu wartość stałej sedymentacji 28S; jest to — zdaniem autora tego artykułu — błąd drukarski.

W innych badaniach stwierdzono (168), że w jądrze komórek L występuje populacja cząstek RNP o stałych sedymentacji od 60S do 100S. Cząstki te zawierają, między innymi, 45S rRNA. Piętno izotopów promieniotwórczych zawarte w tych cząstkach pojawia się w rybosomach cytoplazmatycznych. Cząstki RNP tego typu określono mianem prosomów (169).

Dalsze badania potwierdziły, że cząstki RNP występują w jąderkach komórek HeLa (135). Analiza sedymentacyjna wykazała, że można wyróżnić cząstki RNP o stałych sedymentacji 55S i 80S zawierające 45S rRNA, 32S rRNA, a także 5S rRNA. Niektóre białka zawarte w jąderkowych cząstkach RNP wykrywane były również w rybosomach cytoplazmatycznych (135). W skład 80S cząstek RNP wchodzi 45S rRNA, w cząstkach RNP typu 55S wykryto 32S rRNA (136). Oba typy cząstek RNP charakteryzują się przewagą ilościową białek. Cząstki cięższe zawierają — w przeliczeniu na masę wynoszącą 10 milionów daltonów — około 60% białek, cząstki lżejsze (o masie 4,5 milionów daltonów) — zawierają 54% białka. Cząstki RNP wy-

krywane w jąderku okazały się więc znacznie cięższe niż dojrzałe podjednostki rybosomowe (o masie cząsteczkowej 3,5 miliona i 1,7 miliona daltonów) (136). Część białek zawartych w jąderkowych cząstkach RNP — to białka „nierybosomowe”, które łączą się z rRNA w sposób wybiórczy (136). Dyskutowano możliwość, że białka te łączą się z tymi odcinkami łańcucha polinukleotydowego, które ulegają odrzuceniu podczas „obróbki” rRNA (por. roz. I).

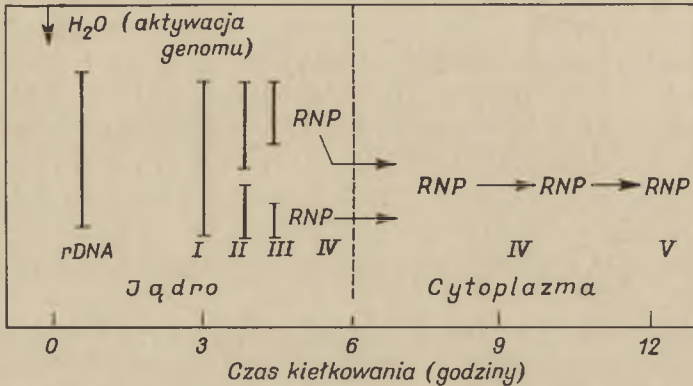
Niedawno stwierdzono (171), że wraz z powolnym zmniejszaniem natężenia syntezy białek w komórkach HeLa — podczas inkubacji tych komórek w środowisku hipertonicznym — zmniejsza się równocześnie pula cząstek RNP w jąderku i pula 45S rRNA. Wynik taki potwierdził dodatkowo, że omawiane cząstki RNP są prekursorami podjednostek rybosomowych.

Doniesiono (52, 53), że cząstki RNP wydzielone z jąderek komórek HeLa, zawierające 45S rRNA, przekształcają się *in vitro* w cząstki RNP bardziej dojrzałe — zawierające niżej spolimeryzowane formy pośrednie rRNA — przy udziale jąderkowej endonukleazy. Podobnie, 47S cząstki RNP (zawierające niedojrzały 28S rRNA), powstające z cząstek RNP o stałych sedymentacji 55S — 100S (zawierających 36S rRNA), wydzielone z jąder śluzowca *Dyctyostelium discoideum*, przekształcają się *in vitro* — w obecności supernatantu pozostającego po 100 000xg — w dojrzałe podjednostki rybosomowe (172).

Mniej poznane są prekursory podjednostek rybosomowych u roślin wyższych. Wynika to zapewne z faktu, że badania nad syntezą prekursorowych rRNA u tych organizmów rozpoczęły się stosunkowo późno; jeszcze w 1967 roku dyskutowano (por. 120), czy w komórkach roślin wyższych dojrzałe rRNA powstają z cząsteczek rRNA znacznie odbiegających masą cząsteczkową. Obecnie (por. roz. I) już wiadomo, że cząsteczki prekursorowego rRNA u roślin różnią się nieznacznie od prekursorowych rRNA występujących u organizmów zwierzęcych (56, 59, 102, 122).

Prekursorowe formy cząstek RNP powstają w czasie kiełkowania nasion. Po derepresji genomu nasienia spoczynkowego wskutek napęcznienia (por. 173), synteza rRNA rozpoczyna się wcześniej niż synteza innych klas RNA (173—177). U zarodków pszenicy synteza rRNA rozpoczyna się po około dwóch godzinach kiełkowania (177). Powstały wówczas prekursorowy rRNA łączy się z białkami i ulega specyficznym rozpadom w procesie „obróbki potranskrypcyjnej”. Po 6 godzinach kiełkowania zarodków, w cytoplazmie pojawiają się cząstki RNP o znacznej przewadze (80%) białek w porównaniu do zawartości rRNA. Po 12 godzinach — wykształcają się dojrzałe podjednostki rybosomowe. Podczas dojrzewania cząstek RNP u kiełkujących zarodków pszenicy — podobnie jak w komórkach HeLa (53, 135, 136) i komórkach L (168, 178) — następuje częściowe usunięcie nadmiaru pewnych białek. Sugerowano, że proces dojrzewania cząstek RNP u pszenicy może odbywać się nie tylko w jąderku, lecz również — w cytoplazmie (177). (Por. też schemat 4.b.).

W kiełkujących nasionach bawełny (*Gossypium hirsutum*) i w osiach zarodkowych rośliny motylkowej *Vigna unguiculata* wykryto cząstki RNP o stałych sedymentacji 40S—50S charakteryzujące się znaczną przewagą ilościową rRNA — prawdopodobnie prekursorowego — nad białkami (179, 180). Choć stwierdzono (179, 180), że cząstki te przekształcają się w dojrzałe rybosomy, nie wiadomo, jaka część puli rybosomów w komórce wy-



Schemat 4. b. Powstawanie cząstek RNP podczas kiełkowania u roślin

Schemat opracowany przez grupę Katchalskiego (177) dla kiełkujących zarodków pszenicy. Pierwotny produkt transkrypcji rDNA (I) o masie cząsteczkowej $2,3 \times 10^6$ daltonów rozpada się selektywnie na dwie cząsteczki rRNA o masie $1,40 \times 10^6$ daltonów i $0,85 \times 10^6$ daltonów (II), które z kolei przekształcają się w dojrzałe rRNA: 24S rRNA ($1,30 \times 10^6$ daltonów) i 17S rRNA ($0,70 \times 10^6$ daltonów) (III). 17S rRNA jest transportowany do cytoplazmy wcześniej niż 24S rRNA. Obydwa rRNA przekazywane są tam w postaci cząstek RNP o gęstości pozornej niższej ($\rho = 1,42-1,57 \text{ g/cm}^3$) niż analogiczna wartość stwierdzona dla dojrzałych rybosomów ($\rho = 1,565$). Prekursorowe cząstki RNP (IV) pojawiają się w cytoplazmie po 6 godzinach kiełkowania, a proces dojrzewania cząstek RNP — polegający na utracie białek — trwa około 6 dalszych godzin. Po 12 godzinach kiełkowania pojawiają się nowopowstałe rybosomy dojrzałe (V).

kształca się z tego typu prekursorowych cząstek RNP. Ten typ prorybosomów jest charakterystyczny dla komórek bakteryjnych (patrz niżej); w czasie przekształcania się ich w dojrzałe podjednostki rybosomowe następuje kilkietapowy proces przyłączania białek (11, 131, 132). Dodajmy tu, że również u eukariontów — obok utraty pewnych białek — w trakcie dojrzewania cząstek RNP może zachodzić przyłączanie niewielkiej ilości białek do rRNA już w cytoplazmie (70, 136, 166, 170, 181). Główną rolę w procesie dojrzewania cząstek RNP odgrywa jednak jąderko, choć niewykluczony jest i udział nukleoplazmy (135, 136, 182). Przekazywanie cząstek RNP do cytoplazmy odbywa się bądź *via* nukleoplazma, a następnie przez pory w otoczce jądrowej (doskonale widoczne na elektronomikrogramach — patrz 183), bądź też podczas kariokinezy (w okresie między późną profazą i wczesną telofazą), gdy otoczka jądrowa ulega dyspersji, podobnie jak jąderko (por. 25).

II-2. Pochodzenie białek rybosomowych u eukariontów

Mimo że powszechnie przyjmuje się pogląd o decydującym znaczeniu jąderka w procesie formowania podjednostek rybosomowych, niewiele wiadomo na temat miejsca syntezy białek wykorzystywanych w procesie biogenezy rybosomów.

O ile rRNA stanowi około 80% całkowitej zawartości RNA w komórce, białka rybosomowe obejmują 5—25% białek komórkowych (166). Nieznane jest rozmieszczenie genów kierujących syntezą białek rybosomowych (184), chociaż badania nad genami kierującymi syntezą rRNA są daleko zaawansowane — cistrony rRNA wydzielono zarówno z komórek eukariotycznych (111, 185), jak i bakteryjnych (186). Można przyjąć, że istnieje około 80 indywidualnych białek rybosomowych o masach cząsteczkowych od 10 000 do 46 000 daltonów (187).

Mimo że większość białek łączy się (za pomocą wiązań niekowalencyjnych) z rRNA już na terenie jądra komórkowego, tylko niewiele z nich jest pochodzenia jądrowego (por. 161). U drożdży białka powstają nieprzerwanie w ciągu całego cyklu komórkowego, nawet w okresie mitozy (188), kiedy synteza rRNA wysokopolimeryzowanych u różnych organizmów ustaje (por. 25), a odbywa się jedynie synteza 5S rRNA (18, 189).

Można sądzić, że warunkiem powstawania cząstek RNP w jąderku jest dopływ białek z cytoplazmy (190). U roślin część białek rybosomowych, być może, pochodzi z chloroplastów — rybosomy plastydialne i cytoplazmatyczne zawierają kilka białek o podobnej charakterystyce fizyko-chemicznej (191).

Stwierdzono (192), że w komórkach pełzaka (*Amoeba proteus*) niewielka ilościowo pula białek jądrowych wykorzystywanych do budowy rybosomów jest pochodzenia cytoplazmatycznego. W komórkach żywych istnieje pewien zestaw (pula) białek przekazywanych z cytoplazmy do jądra — białka takie można określić mianem białek nukleotropowych (193); nie wiadomo jednak, czy są wśród nich białka rybosomowe.

W komórkach pałeczki okrężnicy (*E. coli*) białka pochodzące z rozpadu rybosomów mogą być powtórnie wykorzystywane do budowy nowej populacji tej organelli (194, tam też odnośniki na ten temat). Nie wiadomo, czy podobne zjawisko jest możliwe w komórce eukariotycznej. Wydaje się prawdopodobne, że białka odłączane od cząstek RNP w czasie dojrzewania podjednostek rybosomowych w jąderku mogą być kilkakrotnie zużytkowane w procesie „obróbki potranskrypcyjnej” rRNA (por. roz. II/1).

Łączenie się białek z rRNA w jąderku jest prawdopodobnie regulowane przez pewien czynnik cytoplazmatyczny o charakterze proteidowym (195). Wskazywałaby na to następująca obserwacja — jądro wyizolowane z pozostających w stadium moruli zarodków płatanny (*X. laevis*), a więc aktywne w procesie syntezy i „obróbki” rRNA (patrz niżej), traci swą aktyw-

ność po implantacji do odjądrzonych komórek jajowych niezdolnych jeszcze do syntezy rRNA.

Synteza białek rybosomowych podczas embriogenezy zwierząt rozpoczyna się — podobnie jak synteza rRNA (28—31, 184, 195) — w okresie gastrulacji. W okresie bruzdkowania i w stadium blastuli powstają białka nietypowe dla zarodka (por. 31). Można podejrzewać, że oba procesy — syntezy białek rybosomowych i syntezy rRNA — są ze sobą ściśle zespolone, a nawet współzależne. Warto też dodać, iż podczas gastrulacji zarodków jeżowca *Paracentrotus lividus* synteza 18S rRNA wyprzedza nieco w czasie inicjację syntezy 28S rRNA (30). Mutanty bezjąderkowe platanny (*X. laevis*), pozbawione zarazem cistronów dla wysokopolimeryzowanych rRNA, syntetyzują białka rybosomowe jedynie z 4% intensywnością w porównaniu do zawierających jąderko zarodków pozostających w tym samym stadium embriogenezy (184). Fakt ten również wskazuje, że synteza białek rybosomowych i rRNA jest w pewien sposób skoordynowana.

II-3. Prorybosomy u bakterii

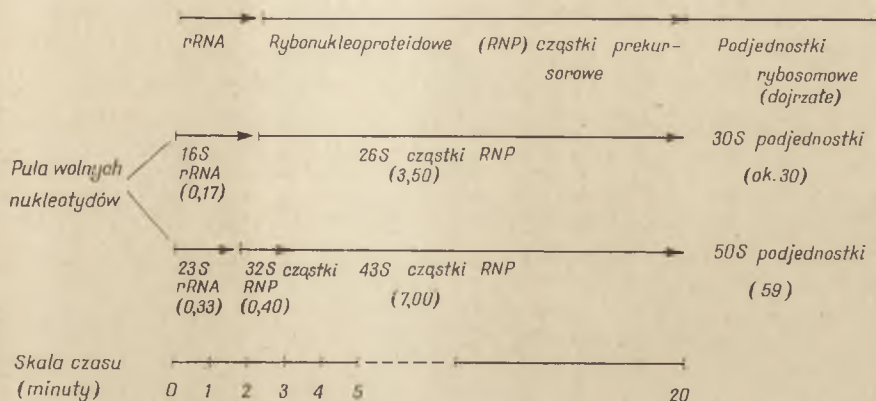
Badania nad powstawaniem rybosomów u bakterii rozpoczęte zostały przez grupę *Roberts*a (196) — twórcy terminu „rybosom”. Autorzy ci, stosując technikę „znakowania — przemieszczania” piętna i dokonując analizy matematycznej wyników, wysunęli hipotezę o kilkietapowym przyłączaniu białek do rRNA w procesie biogenezy rybosomów. Wolny rRNA (stadium eosomu) przyłączałyby pewną ilość białek tworząc cząstki RNP (neosomy), włączane ostatecznie do dojrzałych rybosomów (196, 197).

Późniejsze badania (42) wykazały, że wolny rRNA w zasadzie nie występuje u bakterii; białka przyłączają się do wydłużającego się łańcucha rRNA. Synteza 16S rRNA i 23S rRNA trwa zaledwie około dwóch minut, następnie pojawiają się dwa typy cząstek RNP; cząstki RNP o stałej sedymentacji 26S, zawierające 16S rRNA, przekształcają się po 18 minutach w dojrzałe podjednostki typu 30S. Cząstki typu 32S, zawierające 23S rRNA, przekształcają się po 2 minutach w cząstki RNP typu 43S i później — po dalszych 17 minutach — w dojrzałe 50S podjednostki rybosomowe. Dane te przedstawiono graficznie na schemacie 5.

Cząstki RNP typu 43S były postulowane już uprzednio (196, 197). Prekursorowe cząstki RNP typu „30S” (zawierające 23S rRNA) przekształcają się w cząstki typu 40S po przyłączeniu 9 białek (198); rRNA zawarty w 40S cząstkach RNP ulega „późnej metylacji” i przyłącza kilka dalszych białek a cząstki te — po wbudowaniu 5S rRNA — przekształcają się w dojrzałe podjednostki typu 50S (132, 198). Cząstki prekursorowe zawierają więc słabo umetylowany rRNA (11, 132, 198); warunkiem przekształcenia się ich w dojrzałe podjednostki jest więc metylacja rRNA, umożliwiającą zapewne przyłączanie kolejnych białek (132, 198). Ostatnio sugerowano

(132), że w prekursorowych cząstkach RNP występują prekursorowe formy 16S rRNA i 23S rRNA (por. roz. I-2).

U bakterii hodowanych w warunkach zahamowanej syntezy białek — przy zachowanej syntezie RNA — tzn. w obecności chloranfenikolu, puromycyny lub streptomycyny (mutanty „ścisle”), bądź w nieobecności okreś-



Schemat 5. Powstawanie prekursorowych cząstek RNP i ich przekształcanie się w podjednostki rybosomowe

Schemat opracowany przez grupę Mangiarotti'ego (42) dla komórek pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli* E-203, charakteryzujących się czasem podwajania masy kolonii — 120 min.).

W nawiasach półkwadratowych podano, jaki odsetek komórkowego rRNA stanowi kwas rybonukleinowy wykrywany w cząstkach RNP, w dojrzałych podjednostkach rybosomowych, lub występujący w puli wolnego polimeru.

lonego aminokwasu w pożywce (mutanty „rozluźnione”) obserwowano cząstki RNP charakteryzujące się niedoborem białka i zawartością nisko zmetylowanego RNA (wyczerpujące dane na ten temat — patrz 131). Wiele danych sugeruje jednak, że cząstki te można uważać za artefakty (131, 199—201), choć wskazywano (202), iż w okresie „uzdrowienia” komórki — po przywróceniu warunków fizjologicznych — proces wbudowywania białek do cząstek RNP zachodzi w sposób wysoce specyficzny. Podkreślano (46) kluczowe znaczenie metylacji rRNA dla właściwego przebiegu dojrzewania cząstek RNP nagromadzonych w komórce w warunkach „głodu aminokwasowego” u mutantów „rozluźnionych”. Dodajmy tu, że u mutantów „ścisle” gromadzący się wtedy guanozynoczworofosforan hamuje syntezę RNA i nie powstają cząstki RNP (203).

Natężenie procesów formowania prekursorowych cząstek RNP — zarówno u bakterii, jak i w komórkach eukariotycznych — zależy od intensywności syntezy białek rybosomowych i rRNA. W badaniach nad biogenezą rybosomów stosowano sekwencyjne zmiany warunków hodowli komórek, dzięki czemu sztucznie zmieniano natężenie syntezy różnych klas RNA, w tym również rRNA (por. 131). Zagadnienie to omówiono w oddzielnym artykule (204).

III. Uwagi końcowe

U bakterii i u eukariontów występuje pula wolnych białek rybosomowych (166, 194, 205). U pałeczki okrężnicy (*E. coli*) obejmuje ona 8—14% białek rozpuszczalnych komórki (194, 205). Białka tej puli odgrywają, być może, rolę regulacyjną w syntezie rRNA i w procesie formowania podjednostek rybosomowych (205), szczególnie w warunkach zakłóconej syntezy białek komórkowych, na przykład w obecności cykloheksimidu (166).

Stwierdzono (206), że możliwa jest (*in vitro*) spontaniczna rekonstrukcja aktywnych podjednostek rybosomowych z wolnego rRNA i białek odszczepionych uprzednio od rybosomów. Niedawno wykazano (207), że określone białka rybosomowe wiążą się z określonymi sekwencjami nukleotydowymi w rRNA. Zaproponowano model rybosomu, w którym rozmieszczenie łańcuchów polipeptydowych jest uzależnione od sekwencji nukleotydów w rRNA (208).

Wiadomo (209), że 5S rRNA jest niezbędnym składnikiem podjednostki cięższej rybosomu — usunięcie tego rRNA obniża aktywność organelli. Spełnia więc on rolę w uorganizowaniu struktury rybosomów (por. 11, 132, 198). 7S rRNA odgrywa podobną rolę — obok 5S rRNA — w rybosomach u eukariontów (por. 33, 34, 36).

Można więc sądzić, że cząsteczki rRNA zawierają pewien zasób informacji genetycznej niezbędnej dla prawidłowego przebiegu procesu formowania rybosomu. Zdaniem Monoda (210), w samej strukturze makrocząsteczek rybosomu zawarty jest — niejako w stanie utajenia — „plan” organizacyjny organelli. Koncepcja taka pozostaje w zgodzie z dawniejszymi hipotezami o roli nowosyntetyzowanego rRNA (211, por. też 131) jako nośnika informacji w procesie biogenezy rybosomów (211, odnośniki literaturowe — por. 131).

Podstawowe reakcje procesu „obróbki potranskrypcyjnej” rRNA (skracanie łańcuchów polirybonukleotydowych, ich metylacja i zespalandie się z białkami) są — jak pamiętamy — współzależne i wzajemnie skoordynowane. Ich istotą jest modyfikacja struktury rRNA (czyli strukturalne dojrzewanie) i zapewnienie funkcjonalności metabolicznej rybosomów.

„Obróbce” podlega również tRNA (por. 8,37), a także mRNA. mRNA powstaje w jądrze komórkowym jako polimer wysokocząsteczkowy (ang. Hn RNA), połączony z sekwencjami poliadenylowymi (por. 70, 212). Ulega on później stopniowemu skracaniu (213), depolimeryzacji ulegają też sekwencje poliadenylowe (212), a dojrzałe podjednostki rybosomowe łączą się z mRNA o znacznie skróconym łańcuchu. U bakterii mRNA łączy się z 30S podjednostką rybosomu, a asocjacja z 50S podjednostką następuje dopiero później — po przyłączeniu formylometiomylo-tRNA do kompleksu mRNA z podjednostką lżejszą (por. 214). Po około stu „obrotach” cyklu syntezy wiązań peptydowych (tzn. po paru godzinach), podjednostki rybosomowe i mRNA są uwalniane z agregatów polisomalnych (212). Podjednostki te

mogą być powtórnie wbudowane do polisomów, bądź też ulegają rozpadowi (215). Jest mało prawdopodobne, by rRNA uwolniony z tych podjednostek mógł być powtórnie wykorzystany do budowy nowej populacji rybosomów w jąderku. W komórkach pełzaka (*Amoeba proteus*) wykryto wprawdzie RNA migrujący z cytoplazmy do jądra, lecz stwierdzono, że nie jest to rRNA (216). Najprawdopodobniej jedynie niskocząsteczkowe produkty hydrolizy rRNA mogą przenikać do jądra, aby tam służyć jako substraty w syntezie nowej populacji cząsteczek rRNA.

PIŚMIENICTWO

1. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* **18**, 553 (1972).
2. Attardi G., Amaldi F., *Ann. Rev. Biochem.* **39**, 183 (1970).
3. Busch H., Smetana K., *The Nucleolus*, Academic Press, New York, London, 1970.
4. Hidvega J., Prestayko A. W., Busch H., dane niepublikowane, cyt. wg 3.
5. Perry R. P., Cheng T., Freed J. J., Greenberg J. R., Kelley D. E., Tartof K. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **65**, 609 (1970).
6. Perry R. P., Greenberg J. R., Tartof K. D., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **35**, 577 (1970).
7. Adesnik M., Levinthal C., *J. Mol. Biol.* **46**, 281 (1969).
8. Bautz E. K. F., *Progr. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol.* **12**, 129 (1972).
9. Gutter B., Becker Y., *J. Mol. Biol.* **66**, 239 (1972).
10. Hecht N. B., Bleyman M., Woese C. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 1278 (1968);
Hecht N. B., Woese C. R., *J. Bacteriol.* **95**, 986 (1968).
11. Hayes F., Hayes D. H., *Biochimie* **53**, 369 (1971).
12. Wollgiehn R., Munsche D., *Biochim. Biophys. Acta* **294**, 106 (1973).
13. Kuriyama Y., Luck D. J. L., *J. Mol. Biol.* **73**, 425 (1973).
14. Rosset R., Monier R., Julian J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **46**, 87 (1964).
15. Colli W., Smith I., Oishi M., *J. Mol. Biol.* **56**, 117 (1971).
16. Quincey R. V., *Biochem. J.*, **123**, 227 (1971).
17. Wimber D. E., Steffensen D. M., *Science* **170**, 639 (1970).
18. Zyblier E. A., Penman S., *Science* **172**, 947 (1971).
19. Wallace H., Birnstiel M. L., *Biochim. Biophys. Acta* **114**, 296 (1966).
20. Barr H. J., Esper H., *Exp. Cell Res.* **31**, 211 (1963).
21. Brown D. D., Gurdon J. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 139 (1964).
22. Perry R. P., *Progr. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol.* **6**, 219 (1967).
23. McClintock B., *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **21**, 294 (1934).
24. McConkey E. H., Hopkins J. W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **51**, 1197 (1964).
25. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* **17**, 163 (1971).
26. Leibowitz R. D., Weinberg R. A., Penman S., *J. Mol. Biol.* **73**, 139 (1973).
27. Maden B. E. H., *Nature* **219**, 685 (1968).
28. Hill R. N., McConkey E. M., *J. Cell. Physiol.* **79**, 15 (1972).
29. Brown D. D., Littna E., *J. Mol. Biol.* **8**, 669 (1964).

30. Giudice G., Mutolo V., *Biochim. Biophys. Acta* **138**, 276 (1967).
31. Zagórska L., *Post. Biochem.* **14**, 537 (1968).
32. Brown D. D., Weber C. S., *J. Mol. Biol.* **34**, 661, 681 (1968).
33. Pene J. J., Knight E., Darnell J. E., jr., *J. Mol. Biol.* **33**, 609 (1968).
34. Payne P. J., Dyer T. A., *Nature, New Biology* **235**, 145 (1972).
35. Stevens A. R., Pachler P. F., *J. Mol. Biol.* **66**, 225 (1972).
36. Caston J. D., Jones P. H., *J. Mol. Biol.* **69**, 19 (1972).
37. Starr J. L., Sells B. H., *Physiol. Rev.* **49**, 623 (1969).
38. Doolittle W. F., Pace N. R., *Nature* **228**, 125 (1970).
39. Smith I., Dubnau D., Morell P., Marmur J., *J. Mol. Biol.* **33**, 123 (1968).
40. Doolittle W. F., Pace N. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 1786 (1971).
41. Pootijohn D. E., Stonington G. O., Kosman C. R., *Nature* **228**, 235 (1970).
42. Mangiarotti G., Aprion D., Schlessinger D., Silengo L., *Biochemistry*, **7**, 456 (1968).
43. Aronson A. I., *J. Mol. Biol.* **5**, 453 (1962).
44. Osawa S., Otake E., Itoh T., Fukui T., *J. Mol. Biol.* **40**, 321 (1969).
45. Nomura M., *Bacteriol. Rev.* **34**, 228 (1970).
46. Nofal S., Srinivasan P. R., *J. Mol. Biol.* **17**, 548 (1970).
47. Szalay A., Munsche D., Wollgiehn R., Parthier B., *Biochem. J.* **129**, 135 (1972).
48. Egawa K., Choi Y. C., Busch H., *J. Mol. Biol.* **56**, 565 (1971).
49. Liau M. C., Craig N. C., Perry R. P., *Biochim. Biophys. Acta* **169**, 196 (1968).
50. Baltus E., *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 82 (1962).
51. Carlsson K., Frick G., *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 301 (1964).
52. Mirault M.-E., Scherrer K., *FEBS Letters* **20**, 233 (1972).
53. Mirault M.-E., Scherrer K., Abstracts of the 8th FEBS Meeting Comm. Nr 466, 1972.
54. Lazarus H. M., Sporn M. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. US* **57**, 1386 (1967).
55. Perry R. P., Kelly D. E., *J. Mol. Biol.* **70**, 265 (1972).
56. Leaver C. J., Key I. L., *J. Mol. Biol.* **49**, 671 (1970).
57. Tiollais P., Galibert F., Boiron M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 1117 (1971); *Eur. J. Biochem.* **18**, 35 (1971).
58. Udem S. A., Warner J. R., *J. Mol. Biol.* **65**, 227 (1972).
59. Grierson D., Rogers M. E., Sartirana M. L., Loening U. E., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **35**, 589 (1970).
60. Birnstiel M., Speirs J., Purdom I., Jones K., Loening U. E., *Nature* **219**, 454 (1968).
61. Greenberg J. R., *J. Mol. Biol.* **46**, 85 (1969).
62. Leick V., *Eur. J. Biochem.* **8**, 221 (1969).
63. Craig N. C., Goldstein L., *J. Cell Biol.* **40**, 628 (1969).
64. Taber R. L., Vincent W. S., *Biochim. Biophys. Acta* **186**, 317 (1969).
65. Grierson D., Loening U. E., *Nature, New Biology*, **235**, 80 (1972).
66. Burdon R. H., *Progr. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol.* **11**, 33 (1971).
67. Choi Y. C., Busch H., *J. Biol. Chem.* **245**, 1954 (1970).
68. Seeber S., Busch H., *J. Biol. Chem.* **246**, 7151 (1971).
69. Quagliarotti G., Havegi E., Wikman J., Busch H., *J. Biol. Chem.* **245**, 1962 (1970).
70. Darnell J. E., *Bacteriol. Rev.* **32**, 262 (1968).
71. Seeber S., Busch H., *J. Biol. Chem.* **246**, 7144 (1971).
72. Inagaki A., Busch H., *J. Biol. Chem.* **247**, 3327 (1972).
73. Weinberg R. A., Penman S., *J. Mol. Biol.* **47**, 169 (1970).

74. Kyner D., Levin D. H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **49**, 1056 (1972).
75. Warner J. R., Rich A., Hall C. E., *Science* **138**, 1399 (1962).
76. Spirin A. S., Bielicina N. W., Ajtchozina M. A., *Žur. Obszcz. Biol.* **25**, 321 (1964).
77. Krichevskaja A. A., Georgiev G. P., *Biochim. Biophys. Acta* **164**, 619 (1969).
78. Borek E., Srinivasan P. R., w *Transmethylation and Methionine Biosynthesis*, red. S. K. Shapiro i F. Flenk, The University of Chicago Press, Chicago, Londyn, 1965.
79. Wagner E. K., Penman S., Ingram V. M., *J. Mol. Biol.* **29**, 371 (1967).
80. Hayashi Y., Osawa S., Miura K., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 519 (1966).
81. Culp L. A., Brown G. M., *Arch. Biochem. Biophys.* **137**, 222 (1970).
82. Brown G. M., Attardi G., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **20**, 298 (1965).
83. Gołaszewski T., *Post. Biochem.* **10**, 369 (1964).
84. Scherrer K., Darnell J. E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 486 (1962).
85. Scherrer K., Latham H., Darnell J. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **49**, 240 (1963).
86. Perry R. P., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**, 2179 (1962).
87. Perry R. P., *Exp. Cell Res.* **20**, 216 (1960).
88. Perry R. P., Hell A., Errera M., *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 47 (1961).
89. Edstrøm J.-S., Beermann W., *J. Biochem. Biophys. Cytol.* **14**, 371 (1962),
Edstrøm J.-E., Gall J. G., *J. Cell Biol.* **19**, 279 (1963).
90. Muramatsu M., Busch H., *Cancer Res.* **24**, 1028 (1964).
91. Ro T. S., Muramatsu M., Busch H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 149 (1964).
92. Steele W. J., Okamura N., Busch H., *J. Biol. Chem.* **240**, 1742 (1965).
93. Liao M. C., Hnilica L. S., Hurlbert R. B., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **53**, 626 (1965).
94. Roeder R. G., Rutter W. J., *Biochemistry* **9**, 2543 (1970).
95. Hurlbert R. B., Miller E., Vaughan C. L., *Adv. Enz. Reg.* **7**, 219 (1969).
96. Jacob S. T., Sajdel E. M., Munro H. N., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **38**, 765 (1970).
97. Tocchini-Valentini G. P., Crippa M., *Nature* **228**, 393 (1970).
98. Tamaoki T., Mueller G. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 451 (1962).
99. Tamaoki T., Mueller G. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **11**, 404 (1963).
100. Penman S., *J. Mol. Biol.* **17**, 117 (1966).
101. Penman S., Smith I., Holtzman E., *Science* **154**, 786 (1966).
102. Seitz U., Seitz U., *Planta* **106**, 141 (1972).
103. Muramatsu M., Hodnett J. L., Steele W. J., Busch H., *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 116 (1966).
104. Steele W. J., Busch H., *Biochim. Biophys. Acta* **119**, 501 (1966).
105. Steele W. J., Busch H., *Biochim. Biophys. Acta* **129**, 54 (1966).
106. Chipchase M. I. H., Birnstiel M. L., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **50**, 1101 (1963).
107. Ringborg U., Daneholt B., Edstrøm J.-E., Egyhazi E., Rydlander L., *J. Mol. Biol.* **51**, 679 (1970).
108. Prescott D. M., *Progr. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol.* **3**, 33 (1964).
109. Miller O. L., Beatty B. R., *Science* **164**, 955 (1969).
110. David I. B., Brown D. D., Reeder R. H., *J. Mol. Biol.* **51**, 341 (1970).
111. Wensink P. C., Brown D. D., *J. Mol. Biol.* **60**, 235 (1971).
112. Weinberg R. A., Loening U. E., Willems M., Penman S., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1088 (1967).

113. Loening U. E., Jones K., Birnstiel M. L., *J. Mol. Biol.* **45**, 353 (1969).
114. Maden B. E. H., Salim M., Summers D. F., *Nature, New Biology.* **237**, 5 (1972).
115. Bos R. C., Planta R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **294**, 464 (1973).
116. Rétél J., Planta R. J., *Biochim. Biophys. Acta* **224**, 458 (1970).
117. Buchowicz J., *Post. Biochem.* **8**, 193 (1962).
118. Willems M., Penman K., Penman S., *J. Cell Biol.* **41**, 177 (1969).
119. Wikman J., Howard E., Busch H., *J. Biol. Chem.* **244**, 5471 (1969).
120. Birnstiel M., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **18**, 25 (1967).
121. Rogers M. E., Loening U. E., Fraser R. S. S., *J. Mol. Biol.* **49**, 681 (1970).
122. Cecchini J. P., Miassod R., Ricard J., *FEBS Letters.* **28**, 183 (1972).
123. Daneholt B., Hosick H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **70**, 442 (1973).
124. Reeder R. H., Brown D. D., *J. Mol. Biol.* **51**, 361 (1970).
125. Zimmerman E. F., Holler B. W., *J. Mol. Biol.* **23**, 149 (1967).
126. Greenberg H., Penman S., *J. Mol. Biol.* **21**, 527 (1966).
127. Zimmerman E. F., *Biochemistry* **7**, 3156 (1968).
128. Vesco C., Penman S., *Biochim. Biophys. Acta* **169**, 188 (1969).
129. Rogers M. E., Loening U. E., Fraser R. S. S., *J. Mol. Biol.* **49**, 681 (1970).
130. Willems M., Wagner E. K., Laing R., Penman S., *J. Mol. Biol.* **32**, 211 (1968).
131. Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* **12**, 413 (1966); Gołaszewski T., Szarkowski J. W., *Post. Mikrobiol.* **9**, 327 (1970).
132. Nierhaus K. H., Bordasch K., Homann H. E., *J. Mol. Biol.* **74**, 587 (1973)
133. Birnstiel M. L., Fleissner E., Borek E., *Science* **142**, 1577 (1963).
134. Maden B. E. H., Vaughan M. H., *J. Mol. Biol.* **38**, 43 (1968).
135. Warner J. R., Soeiro R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 1984 (1967).
136. Kumar A., Warner J. R., *J. Mol. Biol.* **63**, 233 (1972).
137. Smetana K., Steele W. J., Busch H., *Exp. Cell Res.* **31**, 198 (1963).
138. Sakiyama S., Usui S., Miura Y., *Adv. Enz. Reg.* **7**, 207 (1969).
139. Wu R. S., Kumar A., Warner J. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 3009 (1971)
140. Siev M., Weinberg R., Penman S., *J. Cell Biol.* **41**, 510 (1969).
141. Tavitian A., Uretsky S. C., Acs G., *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 33 (1968).
142. Maden B. E. H., *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **22**, 127 (1972).
143. Jeanteur P., Amaldi F., Attardi G., *J. Mol. Biol.* **33**, 757 (1968).
144. Gołaszewski T., Rytel M., Szarkowski J. W., Współzależności metaboliczne jądra i cytoplazmy w komórce glonu *Acetabularia* sp., Monografie Biochemiczne PTBioch. Nr 18, Warszawa, PWN, 1968.
145. Brown R. D., Haselkorn R., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 2536 (1971).
146. Ingle J., *Plant Physiol.* **43**, 185 (1968).
147. Matsuda A., Siegel A., Lighfoot D., *Plant Physiol.*, **46**, 2 (1970).
148. Tewari K. K., Wildman S. G., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 569 (1968).
149. Brady T., Clutter M. E., *J. Cell Biol.* **53**, 827 (1972).
150. Cheng T., Hagen G. L., *Biochim. Biophys. Acta* **228**, 503 (1971).
151. Attardi G., Parnas H., Hwang M.-J., Attardi B., *J. Mol. Biol.* **20**, 145 (1966).
152. Dalgrano L., Hosking D. M., Shen H., *Eur. J. Biochem.* **24**, 497 (1972).
153. Brown R. D., Haselkorn R., *J. Mol. Biol.* **59**, 491 (1971).
154. Smith I., Holtzman E., Penman S., *Fed. Proc.* **25**, 645 (1966).

155. Szafranski P., *Post. Biochem.* 5, 67 (1959).
156. Allfrey V. G., *Exp. Cell Res. Supp.* 9, 183 (1963).
157. Birnstiel M. L., Chippchase M. I. H., Hyde B. B., *Biochim. Biophys. Acta* 76, 454 (1963).
158. Szafranski P., Wehr H., Gołaszewski T., *Acta Biochim. Polon.* 8, 279 (1961).
159. Birnstiel M. L., Rho J. H., *Biochim. Biophys. Acta* 55, 734 (1962).
160. Georgiev G. P., w *Enzyme Cytology*, red. D. P. Roodyn, Academic Press, Londyn, New York, 1967, str. 27.
161. Anderson K. M., *Internat. J. Biochem.* 3, 449 (1963).
162. Birnstiel M. L., Chippchase M. I. H., Bonner J., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 6, 161 (1961).
163. Birnstiel M. L., Hyde B. B., *J. Cell Biol.* 18, 41 (1963).
164. Girard M., Penman S., Darnell J. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 51, 205 (1964).
165. Girard M., Latham H., Penman S., Darnell J. E., *J. Mol. Biol.* 11, 187 (1965).
166. Warner J. R., *Mol. Biol.* 19, 383 (1966).
167. Vaughan M. H., Warner J. R., Darnell J. E., *J. Mol. Biol.* 25, 235 (1967).
168. Tamaoki T., *J. Mol. Biol.* 15, 624 (1966).
169. Yoshikawa-Fukada M., *Biochim. Biophys. Acta* 145, 651 (1967).
170. Shepherd J., Maden B. E. H., *Nature* 236, 211 (1972).
171. Pederson T., Kumar A., *J. Mol. Biol.* 61, 655 (1971).
172. Mizukami Y., Iwabuchi M., *Biochim. Biophys. Acta* 272, 81 (1972).
173. Gołaszewski T., Siwecka M. A., Szarkowski J. W., *Post. Biochem.* 18, 125 (1972).
174. Marré E., Cocucci S., Sturani E., *Plant. Physiol.* 40, 1162 (1965).
175. Sasaki S., Brown G. N., *Plant Physiol.* 44, 1729 (1969).
176. Walbot V., *Planta* 108, 161 (1972).
177. Chen D., Schultz G., Katchalski E., *Nature New Biology* 231, 69 (1971).
178. Liao M. C., Perry R. P., *J. Cell Biol.* 41, 272 (1969).
179. Waters L. C., Dure L. S., *J. Mol. Biol.* 19, 1 (1966); Dure L. S., Waters L. C., *Science* 147, 410 (1965).
180. Chakravorty A. K., *Biochim. Biophys. Acta* 179, 67, 83 (1969).
181. Warner J. R., Uedem S. A., *J. Mol. Biol.* 65, 243 (1972).
182. Warner J. R., Girard M., Latham H., Darnell J. E., *J. Mol. Biol.* 19, 373 (1966).
183. Thair B. W., Wardrop A. B., *Planta* 100, 1 (1971).
184. Hallberg R. L., Brown D. D., *J. Mol. Biol.* 46, 393 (1969).
185. Birnstiel M. L., Wallace H., Sirlin J., Fishberg M., *Nat. Cancer Inst. Monograph* 23, 431 (1966) — cyt. wg 60.
186. Colli W., Oishi M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 64, 642 (1969).
187. Warner J. R., *J. Biol. Chem.* 246, 447 (1971).
188. Schulman R. W., Hartwell L. H., Warner J. R., *J. Mol. Biol.* 73, 513 (1973).
189. Penman S., Fan H., Perlman S., Rosbach M., Weinberg R., Zybler E., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 35, 561 (1970).
190. Heady J. E., McConkey E. H., *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 40, 30 (1970).
191. Hooper J. K., Blobel G., *J. Mol. Biol.* 41, 121 (1969); Vasconcelos A. C. L., Bogorad L., *Biochim. Biophys. Acta* 228, 492 (1971).

192. Byers T. J., Platt D. B., Goldstein L., *J. Cell Biol.* **19**, 467 (1963); Craig N., Goldstein L., *J. Cell Biol.* **40**, 622 (1969).
193. Kroeger H., Jacob J., Sirlin J. E., *Exp. Cell Res.* **31**, 416 (1963).
194. Young R. M., Nakada D., *Biochim. Biophys. Acta* **213**, 451 (1970).
195. Crippa M., *Nature* **227**, 1138 (1970).
196. Britten R. J., McCarthy B. J., Roberts R. B., *Biophys. J.* **2**, 83 (1962); McCarthy B. J., Britten R. J., Roberts R. B., *Biophys. J.* **2**, 57 (1962).
197. Kono M., Osawa S., *Biochim. Biophys. Acta* **87**, 326 (1964).
198. Osawa S., Otaka E., Itoh T., Fukui T., *J. Mol. Biol.* **40**, 321 (1969).
199. Schleif R. F., *J. Mol. Biol.* **27**, 41 (1967).
199. Schleif R. F., *J. Mol. Biol.* **27**, 41 (1967); Schleif R. F., *J. Mol.* **37**, 119 (1968).
200. Yoshida K., Osawa S., *J. Mol. Biol.* **33**, 559 (1968).
201. Goodman D., Manor H., Rombauts W., *J. Mol. Biol.* **40**, 247 (1969).
202. Davis F. C., Sells B. H., *J. Mol. Biol.* **39**, 503 (1969).
203. Cashel M., *J. Biol. Chem.* **244**, 3133 (1969); Cashel M., Kalbacher B., *J. Biol. Chem.* **245**, 2309 (1970).
204. Gołaszewski T., Rytel M., (w przygotowaniu).
205. Gupta R. S., Singh U. N., *J. Mol. Biol.* **69**, 279 (1972).
206. Traub P., Nomura M., Tu L., *J. Mol. Biol.* **19**, 215 (1966); Traub P., Nomura M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **59**, 777 (1968).
207. Fellner P., Ehresmann C., Stiegler P., Etel J.-P., *Nature New Biology* **239**, 1 (1972).
208. Cox R. A., Bonanou S. A., *Biochem. J.*, **114**, 769 (1969).
209. Erdman V. A., Fahnestock S., Higo K., Nomura M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 2932 (1971).
210. Monod J., *Le Hasard et la Necessité*, wyd. du Seuil, Paryż, 1970.
211. Nakada D., *J. Mol. Biol.* **12**, 695 (1965).
212. Sheines D., Darnell J. E., *Nature New Biology* **241**, 265 (1973).
213. Lambert B., *Nature* **242**, 51 (1973).
214. Boulter D., Ellis R. J., Yarwood A., *Biol. Rev.* **47**, 113 (1972).
215. Vesco C., Colombo B., *J. Mol. Biol.* **47**, 335 (1970).
216. Goldstein L., Trescott O. H., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **67**, 1367 (1970).

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT *

Adenozyno 3', 5'-monofosforan jako regulator wzrostu komórek *in vitro*

Role of Adenosine 3',5'-monophosphate in the Regulation of Cell Growth *in vitro*

Własności cyklicznego AMP, jego funkcja biologiczna jako uniwersalnego pośrednika w działaniu hormonów oraz wpływ tego związku na szereg procesów biochemicznych zachodzących w komórce stanowiły już przedmiot artykułów przeglądowych publikowanych w „Postęпах Biochemii” w ubiegłym roku (1, 2). Obecny artykuł natomiast dotyczy roli cAMP w regulacji wzrostu i różnicowania komórek. A rola ta nie jest błaha, coraz więcej danych doświadczalnych sugeruje bowiem, że zaburzenia w poziomie cAMP w komórce mogą być odpowiedzialne za nienormalnie szybki i wymykający się spod kontroli organizmu wzrost komórek nowotworowych.

Omówienie tego zagadnienia ograniczono do przedstawienia badań przeprowadzonych na hodowlach komórkowych. Populacje komórek stanowią bowiem dogodny układ modelowy, w którym we właściwych warunkach hodowlanych mogą być zachowane charakterystyczne cechy wzrostu i rozmnażania się komórek normalnych i nowotworowych.

„When in doubt measure the cyclic AMP level”, żartobliwa wskazówka dla biologów korespondenta z *Nature, New Biology*, omawiającego problemy biologii molekularnej (3) znajduje coraz więcej zwolenników, ponieważ okresowym wahaniom w zawartości cAMP w komórce coraz częściej daje się przypisać określony efekt biologiczny.

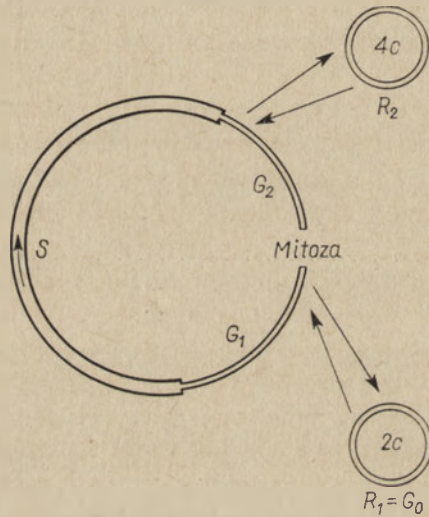
I. Komórki prawidłowe i nowotworowe w hodowli *in vitro*

Komórki rosnące *in vitro* w odpowiednio dobranej pożywce przechodzą kolejno, podobnie jak dzielące się komórki *in vivo*, cztery fazy cyklu ko-

* Dr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP — adenozyno 3',5'-monofosforan; dbcAMP-N⁶O² — dwubutyrylo adenozyno 3',5'-monofosforan.

mórkowego: fazę G_1 poprzedzającą okres syntezy DNA, fazę S — syntezy DNA, fazę G_2 następującą po syntezie DNA a poprzedzającą podział mitotyczny oraz mitozę — M. (rys. 1). Czas trwania jednego cyklu waha się przeciętnie od kilkunastu do kilkudziesięciu godzin a długość jego jest charakterystyczna dla określonego typu komórek. W wyniku podziałów liczba komórek w hodowli początkowo zwiększa się w sposób wykładniczy (logarytmiczny okres wzrostu). Po kilku dniach hodowli namnażanie się komórek staje się coraz wolniejsze, a o hodowli mówimy, że znajduje się wówczas w stacjonarnej fazie wzrostu (5, 6). Dla licznych typów komórek zarówno prawidłowych jak i nowotworowych wykazano, że przejściu ich w stacjonarną fazę wzrostu towarzyszy znaczne obniżenie syntezy DNA, jak również syntezy RNA i białek (7—13), zmiany intensywności przemian fosfolipidów (14) a także zmiany w składzie błony powierzchniowej komórek (15, 16).



Rys. 1. Schemat cyklu komórkowego (wg. 4),
2c i 4c — diplo- i tetraploidalna ilość chromosomów.

Szereg danych wskazuje, że komórki ze stacjonarnych hodowli znajdują się w przejściowym okresie spoczynkowym ulegając wyłączeniu z cyklu komórkowego najczęściej bezpośrednio po zakończeniu mitozy (okres $G_0 = R_1$), rzadziej zaś po zakończeniu syntezy DNA lecz przed podzieleniem się komórki (okres $G_2 = R_2$), (rys. 1). Niezależnie od tego, czy komórki znajdują się w okresie R_1 czy R_2 i charakteryzują się diploidalnym czy tetraploidalnym garniturem chromosomalnym są one nadal potencjalnie zdolne do ponownego włączenia się do cyklu komórkowego po zaistnieniu sprzyjających warunków w hodowli.

Do niedawna panował pogląd, że zasadnicza różnica pomiędzy komórkami prawidłowymi a nowotworowymi przejawia się najwyraźniej w odmiennym charakterze wzrostu obu typów komórek. Stwierdzane jedynie w hodowlach komórek prawidłowych zniesienie ruchu komórek i zahamowanie ich podziałów, gdy liczba ich w hodowli wzrośnie tak znacznie, iż sąsiadujące komórki zaczęły się stykać z sobą stanowiło nawet poniekąd kryterium prawidłowości linii komórkowej. Sugerowano, że gwałtowna na ogół i szybka proliferacja komórek nowotworowych, w wyniku której komórki nie tylko nie zaprzestają ruchu i podziałów przy zetknięciu, lecz często nawet rosną „w górę”, tworząc wielowarstwowe guzki, związana jest z upośledzeniem w nich mechanizmów kontrolujących szybkość i ilość podziałów komórkowych (5, 10). W licznych hipotezach dotyczących przyczyn zahamowania podziałów komórkowych w gęstych hodowlach wskazywano na możliwy udział i znaczenie w tym procesie mechanicznego i metabolicznego kontaktu między komórkami, jak też modyfikacji stężeń substancji wzrostowych czy inhibitorów w pewnych obszarach hodowli (5, 10, 17). Coraz liczniejsze dane eksperymentalne wydają się jednakże wskazywać, że różnica w zachowaniu się komórek prawidłowych i nowotworowych w gęstych hodowlach jest jedynie różnicą pozorną wynikającą z niejednakowego ich zapotrzebowania na substancje odżywcze i czynniki wzrostowe zawarte w surowicy (18—23). Zmiana zapotrzebowania na substancje wzrostowe wydaje się być związana z modyfikacją, w wyniku transformacji nowotworowej, nie tylko ogólnego metabolizmu komórek, lecz także struktury i własności ich błon plazmatycznych (24, 25). Wzbogacenie bowiem pożywki, w której znajdują się niedzielące się komórki prawidłowe w odpowiednią ilość surowicy lub innych składników odżywczych wywołuje w hodowli podziały komórkowe.

Wiele różnych czynników mechanicznych i fizjologicznych może spowodować przerwanie przejściowego okresu spoczynkowego, wywołać migrację komórek i rozpoczęcie w nich syntezy DNA, a w dalszej kolejności podziały (26—32). Najdokładniej zbadane są, jak dotąd, zjawiska następujące w komórkach po dodaniu do pożywki surowicy. I tak pierwszym stwierdzonym efektem dodania surowicy do pożywki jest zmiana potencjału błony powierzchniowej komórek (33), następnie zaś kilkakrotne przyspieszenie ruchu komórek prawdopodobnie w wyniku osłabienia wzajemnych powiązań pomiędzy komórkami (34). Następne „wydarzenia biochemiczne” obserwowane w komórkach po dodaniu surowicy, to stwierdzona już po 30 minutach stymulacja syntezy kwaśnych, niehistonowych białek jądrowych (35—37), wykrywalna po dwóch godzinach synteza rybosomalnego RNA (9, 38); po 8—12 godzinach rozpoczęcie syntezy DNA a następnie po 20—30 godzinach pojawienie się fali podziałów komórkowych (9, 23, 38) i osiągnięcie przez hodowlę innej, wyższej gęstości nasycenia charakterystycznej dla danego stężenia surowicy. Równoległe z powyższym procesem obserwuje się stymulację przez surowicę transportu do komórki urydyny

(39), włączania znakowanych prekursorów do fosfolipidów (40) i białek (41, 42) jak również zwiększenie intensywności glikolizy (32).

Fakt, że nawet tylko kilkugodzinny kontakt komórek z surowicą wywołuje w nich rozpoczęcie syntezy DNA nie oznacza jednak by jakiś jeden składnik surowicy zapoczątkował ten proces. Niemniej jednak znaczenie surowicy jako źródła specyficznych kofaktorów, których dostępność może kontrolować ruch i podziały komórkowe przyjmuje się powszechnie (23).

Próby wyizolowania z surowicy czynników odznaczających się zdolnością pobudzania wzrostu komórek datują się od szeregu lat (artykuł przeglądowy — 23). Wyizolowane dotychczas z różnych surowic czynniki wzrostowe, pobudzające wzrost określonych linii komórkowych, występują na ogół we frakcji α -globulin lub albumin surowicy i to jest ich, jak dotąd jedyną znaną wspólną cechą. Czy czynniki te pełnią swoją funkcję biologiczną jako polipeptydy, czy też stanowią one inertny nośnik aktywnego polipeptydu, pozostaje jeszcze sprawą niewyjaśnioną (23).

Ostatnio częściowo oczyszczono z frakcji β -globulin surowicy szczura czynnik pobudzający jedynie migrację komórek a nie stymulujący w nich syntezy DNA (43). Wyniki doświadczeń uzyskane przy zastosowaniu tego czynnika, zwanego czynnikiem migracyjnym, wykazały, że samo zniesienie kontaktu pomiędzy stykającymi się fibroblastami linii 3T3 nie wystarcza do rozpoczęcia w nich syntezy DNA. Natomiast zachodzi ona w 20—24 godzin po dodaniu do środowiska surowicy.

W regulacji wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych czynne są także substancje produkowane przez same komórki, zarówno niskocząsteczkowe typu poliamin (44—46), i jak i związki wielkocząsteczkowe (47, 48). Niektóre z nich stymulują syntezę DNA i podziały mitotyczne, inne zaś wydają się wpływać hamująco na syntezę białek (49).

Wielka wrażliwość komórek, zarówno prawidłowych jak i nowotworowych *in vitro* na zmienne własności środowiska, w którym żyją oraz omówione powyżej różnice w sposobie wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych spowodowały poszukiwania wspólnych mechanizmów regulacyjnych proliferacji komórkowej.

II. Regulacja wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP

Różnorodność metabolicznych funkcji cAMP w licznych systemach a także jego szerokie rozpowszechnienie zwróciło uwagę na potencjalną możliwość udziału tego nukleotydu w regulacji wzrostu komórek. Eksperymentalne udowodnienie występowania w komórkach *in vitro* co najmniej trzech etapów działania cAMP przemawiałoby za powyższą możliwością. Są to:

- etap regulacji poziomu cAMP w komórce;
- etap aktywacji, poprzez zwiążanie z cAMP, białek komórkowych ty-

pu kinaz białkowych (51, 52), czy też białek analogicznych do białkowych receptorów cyklicznego AMP w bakteriach (53, 54);

— etap serii reakcji zainicjowanych przez „zaktywowane białko” i prowadzących do dającej się wykryć odpowiedzi biologicznej.

Można zatem sądzić, że zaburzenia któregośkolwiek z powyższych etapów mogą prowadzić do widocznych konsekwencji biologicznych, przejawiających się chociażby w tempie wzrostu komórek czy też szybkości syntezy DNA.

Wewnątrzkomórkowy poziom cAMP regulują enzymy uczestniczące w jego syntezie (cyklaza adenylova) i degradacji (fosfodwuesteraza cyklicznych nukleotydów). Szczegółowe omówienie własności tych enzymów znajdzie czytelnik w artykułach publikowanych w roku 1972 w „Postęпах Biochemii” (1, 2).

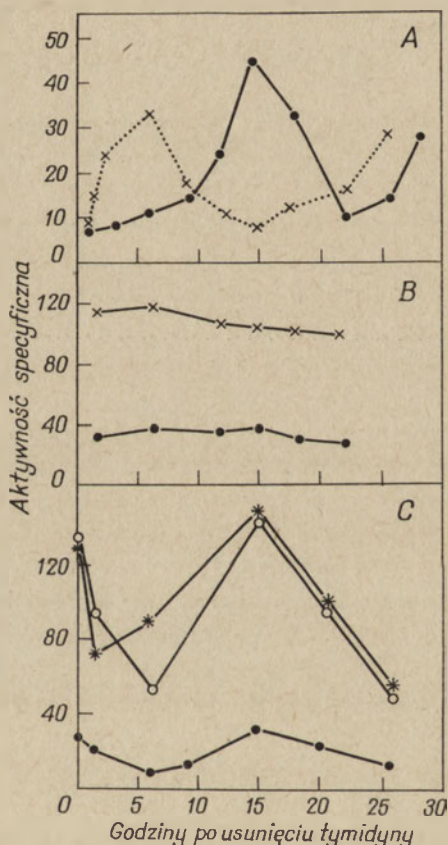
II-1. Synteza cAMP w komórkach

Syntezę cAMP prowadzi w komórkach zwierzęcych cyklaza adenylova, enzym allosteryczny związany z zewnętrznymi błonami komórkowymi lub siateczką endoplazmatyczną (55). Obecność cyklazy adenylowej wykazano w komórkach z szeregu linii komórkowych: w prawidłowych mysich fibroblastach 3T3 (55—60), w ich spontanicznie (58, 61) lub też w wyniku działania różnych wirusów transformowanych odpowiednikach (56, 59, 60, 62), a ponadto w komórkach L (56), HeLa (61, 63), w komórkach wątrobowych (63, 64), w ludzkich fibroblastach (65) i leukocytach (66) oraz glejowych komórkach mózgu szczura (67).

Ze względu na bardzo niską tak zwaną podstawową aktywność cyklazy adenylowej, a także na możliwość naruszenia wzajemnych powiązań podjednostek cyklazy między sobą w wyniku procedury zastosowanej do rozbitcia komórek, oznaczenia aktywności prowadzi się często w obecności aktywatorów typu fluorków lub niektórych hormonów, co pozwala na wyraźniejsze zobrazowanie wahań poziomu aktywności tego enzymu, obserwowanych np. w różnych fazach cyklu komórkowego linii komórek wątrobowych Changa (rys. 2). Maksymalną aktywność wykazywał enzym pochodzący z komórek znajdujących się w mitozie, najsilniej też odpowiadał on na działanie aktywatorów. Szczyt aktywności cyklazy w mitozie poprzedzony był znacznie niższym poziomem aktywności enzymu w komórkach znajdujących się w fazie syntezy DNA (S). Ze względu na umiejscowienie podjednostki receptorowej enzymu w błonie komórkowej, która ulega znacznym zmianom w czasie mitozy (68), można dyskutować znaczenie w regulacji jego aktywności zamaskowania lub odsłonięcia miejsc receptorowych w różnych fazach cyklu komórkowego. Różny poziom aktywności cyklazy stwierdza się także w komórkach znajdujących się w logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu (63, 65). Tak np. fibroblasty ludzkie, które po kilku dniach hodowli przeszły w stacjonarną fazę wzro-

stu, odznaczały się kilkakrotnie wyższym poziomem cyklazy adenyłowej niż komórki z hodowli 24 czy 48 godzinnej. Co więcej, w komórkach innej linii komórkowej, a mianowicie HeLa 3, wykrywano wyższą aktywność tego enzymu wtedy gdy komórki rosły na szklanym podłożu niż wówczas, gdy hodowano je w zawieszynie (64). Podobnie nie udało się wykryć aktywności cyklazy w komórkach hepatoma hodowanych w zawieszynie (69), a można było wykazać aktywność tego enzymu przy przystosowaniu komórek hepatoma do wzrostu na stałym podłożu (64). W tym ostatnim przypadku albo miała miejsce indukcja nowego enzymu albo wzrost, do dającego się wykryć poziomu, aktywności obecnego już enzymu.

Powyższe wyniki sugerują, że kontakt pomiędzy komórkami lub kon-



Rys. 2. Aktywność cyklazy adenyłowej i kinazy białkowej w synchronicznie dzielących się komórkach wątrobowych Changa (wg 64, rys. zmodyf.);

A) ●-●-● procent dzielących się komórek, x—x—x cpm ^3H -tymidyny wyłączonej do frakcji nierozpuszczalnej w kwasach w przeliczeniu na 100 komórek. B) Aktywność kinazy białkowej, badana w nieobecności (●-●-●) lub obecności $1\mu\text{M}$ cAMP (x-x-x), wyrażona jako pmole ^{32}P przeniesionego przez $100\mu\text{g}$ białka enzymatycznego w ciągu 5 minut. C) Aktywność cyklazy adenyłowej badana w nieobecności (●-●-●) i w obecności $0,2\text{ mM}$ adrenaliny (o-o-o) oraz w obecności 8 mM NAF (*-*) i wyrażona w nanomolach ^{32}P cAMP/100mg białka/20 minut.

takt komórki-podłoże mogą w pewnym stopniu mieć wpływ na aktywność cyklazy adenylowej (63).

Dotychczas nie uzyskano jednoznacznych wyników co do aktywności cyklazy adenylowej w transformowanych komórkach. Niższą aktywność tego enzymu, w porównaniu z wyjściowymi fibroblastami prawidłowymi, stwierdzono w komórkach L₉₂₉ (56), w mysich i chomiczych fibroblastach transformowanych wirusem polioma (56, 62), oraz chomiczych fibroblastach zainfekowanych wirusem Ad-12 (70). W tym ostatnim przypadku obniżenie aktywności cyklazy następowało równolegle z ujawnieniem się w komórce wirusowego mRNA i można je było stwierdzić już po 7—8 godzinach od momentu infekcji. Wyższą natomiast aktywność cyklazy adenylowej znaleziono w mysich fibroblastach transformowanych wirusem SV40 (56) (Tabela 1).

Tabela 1

Zmiany aktywności cyklazy adenylowej w wyniku transformacji wirusem polioma mysich i chomiczych fibroblastów (wg 56)

| Linia komórkowa | Aktywność cyklazy adenylowej (pmole cAMP/mg białka/10') | | |
|-----------------------------------|--|-----------|---|
| | -- fluorek | + fluorek | + prostaglandyna (5 µg PGE ₁ /ml) |
| Mysie, prawidłowe fibroblasty 3T3 | 70 | 330 | 270 |
| Py-11 (3T3) | 50 | 240 | 50 |
| SV-Py 11 (3T3) | 160 | 1720 | 950 |
| Embrionalne fibroblasty chomika | 90 | 1080 | 640 |
| BHK | 170 | 1300 | 1550* |
| BHK-Py | 70 | 1160 | 1140* |

* 25µg PGE₁/ml.

Aktywność cyklazy adenylowej, badanej zarówno w komórkach prawidłowych jak i transformowanych, stymulowana jest działaniem hormonów a także wielu innych czynników, z których prostaglandyny, kwasy tłuszczowe uwalniane w komórkach pod wpływem najróżniejszych bodźców i kandydujące do roli „hormonów przyranych”, wzbudzają coraz szersze zainteresowanie. Prostaglandyny aktywowały na ogół cyklazę adenylową z komórek prawidłowych, przy czym stopień aktywacji zależał od warunków hodowli komórek, będąc znacznie wyższy dla enzymu z komórek pochodzących z hodowli stacjonarnych niż szybko dzielących się (63). Natomiast w przypadku cyklazy adenylowej z komórek transformowanych — aktywację przez prostaglandyny znaleziono tylko dla niektórych linii komórkowych (56). Wyniki te sugerują, że transformacja wirusowa może niekiedy powodować bądź to zmiany we własnościach cyklazy adenylowej,

bądź też zmieniać strukturę receptora prostaglandyny w błonie komórkowej.

II-2. Rozkład cAMP

Obecność fosfodwuesterazy cAMP, enzymu kontrolującego wewnątrzkomórkowy poziom cAMP poprzez katalizowanie jego rozkładu do 5'AMP, stwierdzono w wielu różnych liniach komórkowych hodowanych *in vitro*, zarówno prawidłowych jak i stransformowanych (71—75).

Wyniki analizy kinetycznej działania tego enzymu izolowanego z różnych komórek sugerują, że wykrywalna aktywność fosfodwuesterazy cAMP jest sumą aktywności dwóch form enzymu, podobnie jak wykazano to dla fosfodwuesterazy cAMP z tkanek ssaków (76, 77). Te dwie formy enzymu różnią się znacznie między sobą powinowactwem do cAMP — oznaczone bowiem wartości K_m różnią się nawet kilkudziesięciokrotnie (71, 74). O heterogenności fosfodwuesterazy cAMP świadczą także wyniki uzyskane przy frakcjonowaniu komórek L na żelu poliakrylamidowym (78). Wykazano bowiem obecność aż siedmiu szczytów aktywności fosfodwuesterazy, przy oznaczaniu aktywności tego enzymu przy niskim stężeniu substratu.

Podobnie jak w przypadku cyklazy adenylowej, kilkukrotnie wyższy poziom aktywności fosfodwuesterazy cAMP charakteryzuje komórki badane w stacjonarnej fazie wzrostu niż komórki aktywnie dzielące się (71, 72).

Tabela 2

Wpływ aktynomycyny D i cykloheksimidu na syntezę fosfodwuesterazy cAMP w mysich fibroblastach 3T3 transformowanych wirusem SV40 (z danych 71, zmodyf.)

| Dodatki do pożywki | Aktywność fosfodwuesterazy cAMP (pmole/mg białka/minutę) |
|--|---|
| — | 1 |
| Teofilina (1 mM) | 3 |
| dbcAMP (1,2 mM) | 9 |
| dbcAMP+teofilina | 16 |
| dbcAMP+teofilina+cykloheksomid (10 mg/ml) | 2 |
| dbcAMP+teofilina+aktynomycyna D (0.5 µg/ml) | 1 |

Wpływ teofiliny, dbcAMP, cykloheksimidu i aktynomycyny D badany po 10 godzinach od dodania tych związków do 48 godzinnej hodowli. Aktywność enzymu oznaczana przy 0,625 µM cAMP.

Nie udało się natomiast wykazać zależności aktywności fosfodwuesterazy cAMP od szybkości wzrostu komórek, przejawiającej się różnym czasem podwajania hodowli (72). Porównanie aktywności fosfodwuesterazy cAMP w fibroblastach prawidłowych (3T3) i stransformowanych wirusem SV40 wskazuje na niższy poziom tego enzymu w komórkach stransformowanych (71).

Badania regulacji aktywności fosfodwuesterazy cAMP prowadzono w hodowlach komórek, w których eksperymentalnie podwyższono zawartość cAMP bądź to przez stymulowanie aktywności cyklazy adenyłowej działaniem prostaglandyn (74), bądź też dodając do pożywki jednocześnie dwubutyrylową pochodną cAMP (dbcAMP) i teofilinę (inhibitor fosfodwuesterazy cAMP obecnej w surowicy dodanej do pożywki), (71). Stwierdzono, że wynikiem dwudziestoczerogodzinnej inkubacji komórek L_{929} w środowisku zawierającym prostaglandynę (PGE_1) jest podwyższenie, w stosunku do poziomu wyjściowego, nie tylko wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP lecz także aktywności fosfodwuesterazy cAMP (71, 74). Podwyższenie aktywności fosfodwuesterazy cAMP w komórkach wykazano także w doświadczeniach z dostarczaniem egzogenego cAMP do środowiska hodowli. (71).

Cykloheksomid i aktynomycyna D, obecne w środowisku hodowli, uniemożliwiają ujawnienie się efektu dbcAMP i teofiliny (Tabela 2).

Wyniki te wydają się wskazywać na indukcję syntezy enzymu przez dbcAMP a nie na aktywację już obecnej w komórkach fosfodwuesterazy cAMP (71). Referowane powyżej wyniki, wskazują na równoległość podwyższonego poziomu cAMP w komórkach i wyższej aktywności fosfodwuesterazy cAMP, co pozwala na dyskusowanie roli cAMP w indukcji syntezy metabolizującego go enzymu.

Inny jednak mechanizm regulacji aktywności fosfodwuesterazy cAMP w komórkach przez egzogeny cAMP postulują Heersche i wsp. na podstawie wyników uzyskanych przy badaniu efektu butyrylowej pochodnej cAMP na hodowle tkankowe zawiązków kości szczura (79). Zdaniem tych autorów egzogeny cAMP działa hamująco na aktywność wewnątrzkomórkowej fosfodwuesterazy cAMP, podwyższając tym samym poziom cAMP w komórce.

Niezależnie od rodzaju postulowanego mechanizmu związanego z regulacją aktywności fosfodwuesterazy cAMP, wydaje się niewątpliwie, że enzym ten jest układem bardzo czułym, szybko odpowiadającym zmianami poziomu swej aktywności na wahania wewnątrzkomórkowego stężenia substratu.

II-3. Wewnątrzkomórkowy poziom cAMP

Oznaczanie aktywności cyklazy adenyłowej i fosfodwuesterazy cAMP przeprowadzone w warunkach odmiennych od spotykanych w komórkach, nie może jednak dostarczyć danych o rzeczywistym poziomie cAMP w komórce, a jedynie wskazać na możliwość jego regulacji na poziomie syntezy i rozkładu. Z wielu względów niezbędne jest jednak zdanie sobie sprawy z rzeczywistego poziomu tego nukleotydu w komórkach.

Poziom cAMP, podobnie jak aktywność syntetyzującej go cyklazy adenyłowej, ulega okresowym wahanom w czasie cyklu komórkowego. Ozna-

czenia poziomu cAMP w synchronicznie dzielących się komórkach pochodzących z jajnika chomika chińskiego (CHO) wykazały najniższy poziom cAMP w komórkach w okresie mitozy, najwyższy zaś w komórkach w fazie G₁ (Tabela 3).

Tabela 3

Poziom cAMP w różnych fazach cyklu komórkowego synchronicznie dzielących się komórek z jajnika chińskiego chomika (CHO), (wg 80)

| Faza cyklu komórkowego | μM cAMP | pmole cAMP | |
|------------------------|-----------|------------|---|
| | | mg białka | |
| | | | % zawartość cAMP przy umownym przyjęciu za 100% ilości cAMP w fazie S |
| Mitoza | 2,9 ± 0,4 | 16 ± 2 | 57 |
| Wczesna G ₁ | 8,4 ± 0,9 | 44 ± 8 | 157 |
| Późna G ₁ | 4,0 ± 0,5 | 24 ± 4 | 86 |
| S | 5,2 ± 0,4 | 28 ± 4 | 100 |

Niższą zawartość cAMP w komórkach mitotycznych w porównaniu z interfazalnymi stwierdzono także w mysich fibroblastach, jak również w licznych innych komórkach prawidłowych i transformowanych (80—83). Wydaje się zatem mieć miejsce pozorna niezgodność pomiędzy niskim poziomem cAMP stwierdzonym w mitozie a wysoką aktywnością cykazy adenylowej w tej fazie cyklu komórkowego. Przyczyny tej rozbieżności nie są dotychczas wyjaśnione, wydaje się jednak, że mogą one być w ścisłym związku z szeregiem zmian pojawiających się w komórce podczas podziału mitotycznego, takich jak: uformowanie aparatu mitotycznego (84, 85), zmiany w składzie chemicznym komórki (86, 87), zahamowanie syntezy białek i RNA (88—91), zmiany w aktywności niektórych enzymów (64, 92—94), zmiany struktury powierzchni komórki (68, 95, 96), zmiany ruchliwości komórek (97), oraz w ich antygenowości (98, 99).

Należy się także liczyć z faktem, że w czasie mitozy może także następować wybiórcze zużytkowanie cAMP w szeregu procesach metabolicznych. Niezbędna byłaby zatem wysoka aktywność cykazy adenylowej nawet do zapewnienia niskiego poziomu cAMP w komórce.

Podwyższony w stosunku do komórek znajdujących się w mitozie poziom cAMP w komórkach będących w fazie G₁ można przypuszczalnie wiązać z procesami zachodzącymi w komórkach przed ważnym, niezbadanym dotąd momentem „decyzji” komórek — zostać w spoczynku czy też włączyć się ponownie do cyklu komórkowego (80).

Porównanie zawartości cAMP w komórkach charakteryzujących się różnym tempem wzrostu jest zarazem uchwyceniem różnic w zawartości tego nukleotydu w komórkach prawidłowych i nowotworowych. Skutkiem transformacji nowotworowej komórek jest bowiem między innymi przy-

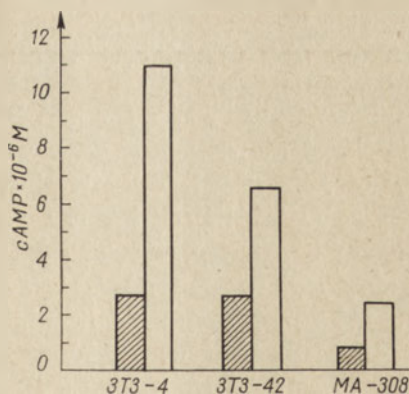
spieszenie ich tempa wzrostu. Dane zestawione w tabeli 4, jak również szereg innych obserwacji (60, 72, 80, 100) wskazują, że szybko rosnące komórki transformowane odznaczają się niskim poziomem cAMP, natomiast komórki z wolniej rosnących linii prawidłowych — poziomem kilkakrotnie wyższym. Ponadto cykliczne wahania zawartości cAMP w cyklu komórkowym zaznaczają się w komórkach transformowanych słabiej niż ma to miejsce w komórkach prawidłowych (83).

Tabela 4

Poziom cAMP w niektórych prawidłowych i transformowanych liniach mysich fibroblastów badanych w logarytmicznej fazie wzrostu (z danych 100).

| Linia komórkowa | Czas podwożenia hodowli (w godzinach) | μmole cAMP | nmole cAMP / mg kwasów nukleinowych | |
|---|---------------------------------------|------------|-------------------------------------|---------|
| | | | (średnia) | > SE |
| Fibroblasty transformowane wirusem SV40 | 13 | 0,6 | 0,13 | 15 |
| Spontanicznie transformowane fibroblasty, 3T6 | 23 | 3,1 ± 0,8 | | 79 ± 2 |
| L ₉₂₉ | 24 | 3,2 ± 0,19 | | 41 ± 2 |
| Embrionalne fibroblasty, MEF | 25 | 3,2 ± 0,01 | | 89 ± 2 |
| Fibroblasty 3T3-4 | 26 | 3,3 ± 0,30 | | 75 ± 6 |
| Fibroblasty 3T3 ^b , nie ulegające zahamowaniu kontaktowemu | 37 | 5,0 ± 0,01 | | 114 ± 3 |

Różnice w poziomie cAMP w komórkach tej samej linii, lecz znajdujących się w logarytmicznej lub stacjonarnej fazie wzrostu przedstawione są na kolejnym rysunku (rys. 3). Jak widać, w komórkach, w których nastąpiło zatrzymanie wzrostu wykrywa się kilkakrotnie wyższy poziom



Rys. 3. Poziom cAMP w różnych liniach fibroblastów z hodowli znajdujących się w logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu (z danych 57).

▨ logarytmiczna faza wzrostu, □ — stacjonarna faza wzrostu.

cAMP niż w komórkach dzielących się. Obserwacje te zgodne są z danymi o wyższym poziomie cyklazy adenylowej w hodowlach stacjonarnych jak również o jej większej w tym okresie podatności na stymulujący wpływ szeregu hormonów (rozdział II.1.). Wyższy poziom cAMP w komórkach hodowli wolno dzielącej oraz podwyższenie poziomu cAMP w komórkach w stacjonarnej fazie wzrostu wydawały się w pełni upoważniać do wysunięcia hipotezy, że zetknięcie się komórek prowadzi do podwyższenia wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP, co w następstwie mogłoby być sygnałem do zatrzymania wzrostu (72). Wspomniany już uprzednio wyższy poziom cyklazy adenylowej w komórkach z hodowli stacjonarnych wydawał się popierać taką hipotezę. Jednakże ostatnio doniesiono, że w stacjonarnych hodowlach, w których eksperymentalnie zapobieżono stykaniu się komórek, poziom cAMP był również podwyższony w porównaniu z komórkami także nie stykającymi się, lecz będącymi w logarytmicznej fazie wzrostu (101). Wyniki te przeczą zatem pogładowi aby kontakt pomiędzy komórkami był związany z regulacją wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP.

Na powiązanie poziomu cAMP w komórce z regulacją cyklu komórkowego wskazują badania (80), w których poprzez zubożenie pożywki w izoleucynę upośledza się syntezę białka w komórkach i w efekcie powoduje selektywne zatrzymanie komórek w fazie G_1 cyklu komórkowego (102). Poziom cAMP oznaczony w fazie G_1 takich komórek był niemal trzykrotnie niższy niż w komórkach z hodowli kontrolnej, co więcej ponowne dodanie izoleucyny do środowiska powodowało po mniej więcej dwóch godzinach przywrócenie wyjściowego poziomu cAMP.

III. Wpływ cAMP na enzymatyczne i strukturalne układy komórkowe

Jak już wspomniano w rozdziale II, aby udowodnić udział cAMP w regulacji wzrostu komórek należałoby dowieść obecności białek enzymatycznych lub też komórkowych układów receptorowych, wykazujących pod wpływem cAMP zmiany bądź to w aktywności, bądź też w mikrostrukturze.

W ciągu kilku ostatnich lat ukazało się szereg doniesień o występowaniu w wielu typach komórek hodowanych *in vitro* kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP (67, 103—105). Tak np. kinazy białkowe, badane w wyciągach enzymatycznych z komórek HeLa, mysich fibroblastów czy też komórek wątrobowych Changa, i przeprowadzające fosforylację histonów były 2—3-krotnie aktywowane przez cAMP lecz nie przez cGTP (103). Jak wynika z eksperymentów przy zastosowaniu inhibitorów syntezy białka, zarówno synteza jak i poziom aktywności kinaz białkowych nie ulega wahaniom w czasie cyklu komórkowego (rys. 2; (64)). Aktywność tych enzymów nie zmienia się też w wyraźny sposób w zależności od warunków hodowli (104).

Rezultaty szczegółowych badań Hauschki i wsp. (106, 107) nad

wpływem cAMP na aktywność kinazy tymidynowej w komórkach chomika chińskiego (CHO) stanowią kolejne poparcie przypuszczenia o obecności w komórkach układów enzymatycznych, których aktywność może być regulowana przez cAMP. Wynikiem 20-godzinnej inkubacji tych komórek z dbcAMP był dwukrotny spadek aktywności kinazy tymidynowej oraz aż 20-krotne obniżenie pobierania przez komórki tymidyny a także deoksytydyny i urydyny. Silniejszy efekt dbcAMP na transport tymidyny niż na poziom aktywności fosforylującej go kinazy można także wiązać, zdaniem Hauschki, z możliwością wystąpienia, pod wpływem dbcAMP, zmian przepuszczalności błon komórkowych w stosunku do tymidyny.

Znaczne wahania w cyklu komórkowym aktywności kinazy tymidynowej (93) jak i wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP (rozdział II.3.) oraz obniżenie poziomu aktywności tego enzymu przez egzogeny cAMP, sugerują występowanie w komórkach, kontrolowanego przez cAMP, mechanizmu pobierania tymidyny, a więc także pośrednio kontroli replikacji DNA. Można także przypuszczać, że cAMP mógłby kontrolować również pobieranie przez komórki tych metabolitów, których wnikanie uzależnione jest od ich fosforylacji przez specyficzne kinazy (106). Zmniejszenie transportu urydyny do niedzielających się, na skutek wzrostu w gęstych hodowlach, kurzych i mysich fibroblastów (8), w których zarazem wykrywa się wyższy poziom cAMP niż w komórkach z logarytmicznej fazy wzrostu (rozdział II.3.), wydają się przemawiać za wpływem cAMP na transport tych metabolitów do komórek.

Strukturalnymi układami komórkowymi reagującymi na obecność dbcAMP w środowisku hodowli wydają się być mikrokanaliki i mikrowłókienna komórka (108). Agregację tych struktur pod wpływem dbcAMP, być może w wyniku działania zaktywowanych kinaz białkowych (55), stwierdzono w niektórych transformowanych liniach mysich i szczurzych fibroblastów (109), oraz komórek z jajnika chomika chińskiego (110). Odmienne natomiast efekt dbcAMP zaobserwowano w przypadku ludzkich astrocytów i neuroblastów *in vitro* (111), w których pod wpływem tego związku stwierdzono zanik powyższych strukturalnych mikroukładów. Wydaje się zatem, że znaczną część zmian pod wpływem cAMP w morfologii komórek stransformowanych można przypisać jego interakcji z układami mikrokanalików i mikrowłókien.

IV. Odpowiedź biologiczna komórek na działanie egzogenego cAMP

Biologiczny efekt będący odpowiedzią komórek na dodanie do środowiska hodowli cAMP lub jego butyrylowej pochodnej, zależy od trwałości i stężenia dodawanych związków oraz łatwości z jaką penetrują one do wnętrza komórek. Jednakże obecność w surowicy, dodawanej na ogół do pożywki, fosfodwuesterazy cAMP (112) oraz enzymów deacylujących te

nukleotydy (113), stwarza niebezpieczeństwo, że obserwowane efekty biologiczne mogą być zjawiskami wtórnymi, wywołanymi przez metabolity cAMP czy też dbcAMP.

IV-1. Metabolizm cAMP i jego pochodnych w środowisku hodowli

Badania przy zastosowaniu piętnowanego izotopami cAMP wykazały, że związek ten dodany do środowiska hodowli w stężeniu 10^{-5} — 10^{-7} M zostaje szybko metabolizowany. Już po 30 minutach inkubacji tymocytów szczura z radioaktywnym cAMP, radioaktywność w komórkach odnajdowano jedynie w ATP i ADP, zaś bardzo mało lub wcale w ADP, adenozylinie i adeninie (114). Ponadto po tym okresie inkubacji, w środowisku hodowli znajdowano już tylko 65% dodanego cAMP oraz radioaktywne AMP i P_1 , co wskazywałoby na defosforylację AMP.

Nienagromadzanie się w środowisku hodowli ani radioaktywnej adenozyliny ani też adeniny wydaje się sugerować ich szybkie przenikanie do komórek, w których szybko ulegają one wbudowaniu do komórkowej puli ADP i ATP (112, 114).

Rozkład cAMP obecnego w środowisku do różnych metabolitów stwierdzono także po inkubacji z tym związkiem komórek HeLa (115), L_{929} (116), czy zawiązków kości szczura (79). Sądzi się zatem (115), że jedynie przy wysokich stężeniach egzogenego AMP (rzędu 10^{-3} — 10^{-4} M) może dojść do przejściowego podwyższenia wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP. Badania nad pobieraniem, przez komórki L_{929} i WI-38, cAMP i dbcAMP obecnych w środowisku w stężeniu $1,5 \times 10^{-4}$ M, wydają się potwierdzać powyższą sugestię (116).

W przeciwieństwie do cAMP, jego dwubutyrylowa pochodna oporna jest na działanie obecnej w środowisku fosfodwusterazy cAMP (115). Wykazano ponadto, że w wyniku inkubacji komórek HeLa z radioaktywną dwubutyrylową pochodną cAMP (w stężeniu 10^{-6} M) jedynym radioaktywnym związkiem nagromadzającym się w komórkach był N^6 -butyrylo-cAMP (117, 115). Związek ten powstawał również z dbcAMP pod wpływem działania homogenatów komórek HeLa (117). W analogicznych warunkach cAMP jak również O^3 -butyrylo-cAMP degradowane były do AMP i puryn. Stwierdzono ponadto, że spośród dwu i jednobutyrylowych pochodnych cAMP jedynie N^6 -butyrylo-cAMP wykazywał zbliżone do cAMP powinowactwo do kinazy białkowej izolowanej z mięśni wołu (118). Wyniki te sugerują zatem, że jedynie N^6 -monobutyrylo-cAMP wydaje się być wewnątrzkomórkowym imitatorem cAMP.

Wydaje się zatem, że odmienne biologiczne skutki działania cAMP i dbcAMP (119, 120) można przypisać różnej łatwości wnikania do komórek i różnej oporności tych związków na działanie rozkładających je enzymów a w konsekwencji na pojawieniu się i działaniu różnych ich metabolitów.

IV-2. Zmiany morfologii i charakterystyk wzrostowych komórek pod wpływem egzogenego cAMP

Pod wpływem dwubutyrylowej pochodnej cAMP obserwowano zmiany morfologiczne oraz zmiany charakterystyk wzrostowych szeregu linii komórek prawidłowych i transformowanych (50, 109, 110, 111, 121—128). Komórki rosnące w obecności cyklicznego nukleotydu charakteryzowały się większym „spłaszczeniem”, większą ilością wypustek, zwiększoną przyczepnością do podłoża (129), a w przypadku niektórych komórek transformowanych (CHO) stwierdzono sporadycznie pojawianie się równoległego ułożenia komórek i częściowego zahamowania wzrostu przy zetknięciu się (110, 130).

Ruch komórek, pośrednio uzależniony również od stopnia przyczepności ich do podłoża, stawał się wolniejszy przy podwyższeniu wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP w komórkach 3T3-SV w obecności dbcAMP i teofiliny (131).

Dalsze efekty dbcAMP, to znaczne, nieraz nawet dwukrotne, wydłużenie czasu podwajania hodowli (50, 127) i obniżenie gęstości nasycenia populacji dla komórek przestających się dzielić przy zetknięciu (50, 111). Tak np. stwierdzono, że gęstość nasycenia hodowli komórek 3T3 (Balb) wynosi 55 000 komórek/cm² podczas gdy gęstość komórek rosnących w obecności dbcAMP jest pięciokrotnie niższa (50). Efekty wywoływane działaniem egzogenego cAMP cofały się po usunięciu go ze środowiska a komórki po kilkudziesięciu godzinach odzyskiwały swoje pierwotne cechy morfologiczne, nie wykazując zmian żywotności (109).

Omówione powyżej, wywołane przez dbcAMP, zmiany nie tylko morfologii, lecz także niektórych charakterystyk wzrostowych komórek uzasadniają w pełni, zdaniem Shepparda, pogląd, że dbcAMP przywraca transformowanym fibroblastom mysim zdolność do zaprzestania podziałów przy dostatecznie dużej gęstości hodowli (130). Wysłunięto nawet sugestię, że działanie dbcAMP może polegać na stymulacji przez ten związek syntezy określonych białek, niezbędnych do przywrócenia struktury błon charakterystycznej dla komórek prawidłowych (132). Ostatnio jednakże wydaje się, że poglądu tego nie można uogólniać na wszystkie układy komórkowe. Zwolnienie bowiem tempa wzrostu komórek w wyniku działania dbcAMP obserwowane dla szeregu transformowanych linii komórkowych nie tylko pochodzenia fibroblastycznego (111, 122, 128) nie musi jeszcze świadczyć o tym, że niedzielać się komórki znajdują się wówczas w fazie G₀, co możnaby postulować, gdyby rzeczywiście upodobniły się one do komórek prawidłowych. Utrzymanie pewnej inkorporacji radioaktywnych prekursorów do DNA w komórkach 3T3-SV rosnących w obecności dbcAMP oraz analiza zawartości DNA w komórkach (133, 134) wydają się raczej wskazywać na zatrzymanie komórek w późniejszych niż G₀ fazach cyklu, poprzedzających jednakże podział mitotyczny komórki. Wyniki

eksperymentalnego podwyższenia stężenia cAMP w różnych fazach cyklu komórek HeLa (82) oraz dane dotyczące wpływu dbcAMP na procesy biosyntetyczne zachodzące w synchronicznie dzielących się komórkach CHO (135) sugerują, że komórki hodowane w obecności dbcAMP mogą znajdować się w fazie G_2 .

IV-3. Wpływ egzogenego dbcAMP na syntezę DNA i podziały mitotyczne

Dwubutyrylowa pochodna cyklicznego AMP, obecna w środowisku, obniża włączanie tymidyny do DNA embrionalnych komórek szczura (136), komórek HeLa (115), chomiczych (137) i mysich fibroblastów 3T3 (138), przy czym wielkość efektu wywoływanego przez ten związek wydaje się zależeć od tego w jakiej fazie cyklu komórkowego znajdowały się komórki w momencie dodania dbcAMP. Wyniki szczegółowych badań nad wpływem dbcAMP na syntezę DNA w synchronicznie dzielących się fibroblastach 3T3 wykazały bowiem, że związek ten hamuje syntezę DNA tylko wówczas, gdy dodany jest do pożywki jednocześnie z wysiewanymi komórkami. Usunięcie dbcAMP z hodowli na godzinę przed rozpoczęciem fazy S nie wywiera już wpływu na rozpoczęcie syntezy DNA, jednakże ilość syntetyzowanego DNA jest mniejsza niż w komórkach kontrolnych. Jeżeli dbcAMP dodany jest do pożywki 3 lub 6 godzin po wysianiu komórek następuje wówczas jedynie przyspieszenie rozpoczęcia w nich syntezy DNA, bez wpływu na syntetyzowaną ilość. Dodanie dbcAMP na początku fazy S nie ma wpływu na syntezę DNA, uniemożliwia natomiast wstąpienie komórek w mitozę. Można więc przyjąć, że dbcAMP oddziałuje na komórki znajdujące się w fazie G_1 oraz blokuje procesy metaboliczne zachodzące w fazie G_2 , nie dopuszczające do podziału mitotycznego komórki.

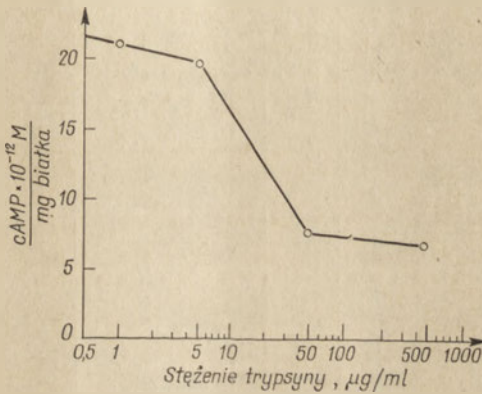
Podobną zależność efektu dbcAMP na syntezę DNA od momentu wprowadzenia tej pochodnej do układu stwierdzono dla komórek BHK-21, w których infekcja onkogennym wirusem AD-12 pobudzała syntezę komórkowego DNA (139), która — jak wykazano następnie w dalszych badaniach tego zjawiska — była poprzedzona spadkiem wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP (70). W tym układzie doświadczalnym hamowanie syntezy DNA przez dbcAMP miało miejsce tylko wówczas, gdy związek ten dodano do hodowli przed wystąpieniem w komórkach maksimum syntezy wirusowego RNA i rozpoczęciem syntezy komórkowego DNA. Zbieżność w czasie braku efektu dbcAMP na syntezę komórkowego DNA z pojawieniem się syntezy wirusowego RNA pozwala spekulować, że pierwotnym efektem dbcAMP może być wpływ na transkrypcję RNA swoistego dla wirusa AD-12.

IV-4. Porównanie działania cAMP i surowicy

Surowica jest jednym z licznych czynników stymulujących syntezę DNA i podziały komórkowe w stacjonarnych hodowlach komórkowych

(rozdział I). Dodanie dbcAMP do środowiska hodowlanego zapobiegało pobudzeniu syntezy DNA przez surowicę, a poziom włączania tymidyny do DNA komórkowego, znajdowany w obecności dbcAMP był tego samego rzędu co w komórkach kontrolnych, rosnących w nieobecności surowicy (136). Powyższe efekty dbcAMP zaznaczały się tym wyraźniej, im niższa była zawartość surowicy w pożywce.

Wykazano ponadto, że włączenie do cyklu komórkowego komórek hodowanych w obecności dbcAMP wymagało dodania zwiększonych ilości surowicy (137). Pobudzenie przez surowicę syntezy DNA w komórkach poprzedza spadek wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP (57, 75, 140), przy czym efekt ten występuje już po kilku minutach od momentu dodania surowicy (Tabela 5).



Rys. 4. Wpływ trypsyny na wewnątrzkomórkowy poziom cAMP w mysich fibroblastach 3T3 z hodowli stacjonarnej (z danych 83).

Podobny spadek zawartości cAMP, jak pod wpływem surowicy, stwierdzono także w komórkach poddanych działaniu trypsyny (rys. 4) oraz szeregu innych proteaz (83). Enzymy te, podobnie jak surowica, stymulowały wzrost komórek w hodowlach stacjonarnych (25, 83). Można więc przypuścić, że wywoływana zarówno przez składniki surowicy jak i przez proteazy modyfikacja powierzchni błony komórkowej mogłaby znaleźć swoje odbicie w modyfikacji miejsc receptorowych cykazy adenylowej, powodując zahamowanie jej aktywności, a w rezultacie obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP.

Te wyniki, jak również zbieżność wysokiego poziomu cAMP w komórkach z hodowli stacjonarnych z wyczerpywaniem się składników wzrostowych surowicy w tychże hodowlach wskazują na przeciwstawność efektów biologicznych cAMP i składników surowicy.

Tabela 5

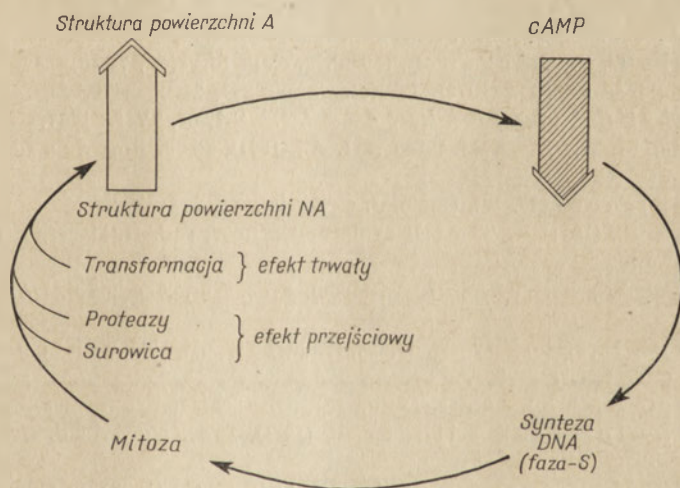
Wpływ surowicy na obniżenie poziomu cAMP w mysich fibroblastach 3T3 z kultur stacjonarnych (wg 101).

| Zawartość surowicy | Liczba komórek w hodowli | Komórki | Okres czasu od dodania surowicy | pmole cAMP/10 ⁶ komórek |
|--------------------|--------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 1% | 5 × 10 ⁵ | rosną nie stykając się | — | 11,7 ± 1,0 |
| 1% | 5 × 10 ⁵ | „ | 10' | 6,0 ± 1,0 |
| 1% | 5 × 10 ⁵ | „ | 60' | 5,0 ± 1,0 |
| 10% | 3 × 10 ⁶ | rosną gęsto, stykają się ze sobą | — | 7,5 ± 0,5 |
| 10% | 3 × 10 ⁶ | „ | 10' | 4,2 ± 0,5 |
| 10% | 3 × 10 ⁶ | „ | 60' | 5,0 ± 0,5 |

V. Uwagi końcowe

Omawiane w poprzednich rozdziałach dane wskazują wyraźnie, że w komórkach hodowanych *in vitro* działają mechanizmy regulujące poziom cyklicznego AMP w różnych fazach cyklu komórkowego i w zależności od warunków hodowli. W komórkach stwierdzono także obecność układów enzymatycznych aktywowanych przez cAMP, jak również scharakteryzowano niektóre rodzaje odpowiedzi biologicznej komórek na podwyższenie stężenia cAMP w środowisku.

Ostatnio Burger i wsp. wysunęli hipotezę, uwzględniającą w regulacji cyklu komórkowego znany fakt obniżenia poziomu cAMP w komórkach na etapie poprzedzającym rozpoczęcie w nich syntezy DNA (83). Spadek zawartości cAMP — będący wynikiem, lub tylko zjawiskiem towarzyszącym zmianom powierzchniowym błon komórkowych, pojawiających się bądź w czasie mitozy, bądź na skutek transformacji czy też działania proteaz lub surowicy — zdaniem tych autorów mógłby być sygnałem „włączającym” w komórkach procesy niezbędne do prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego (rys. 5).



Rys. 5. Kontrola przebiegu cyklu komórkowego przez cAMP (zmodyfikowany, hipotetyczny model wg Burgera i wsp. (83).

NA — Błona powierzchniowa komórek nie ulegających aglutynacji typowa dla komórek prawidłowych. A — Błona powierzchniowa komórek ulegających aglutynacji typowa dla komórek transformowanych oraz komórek prawidłowych poddanych działaniu proteaz lub surowicy.

Powyższy model powiązania zmian poziomu cAMP z przebiegiem cyklu komórkowego jest na razie hipotetyczny. Uzyskane dotychczas wyniki badań biochemicznych nie pozwalają także na rozstrzygnięcie, jaki mechanizm, i czy wyłącznie jeden, odpowiedzialny jest za wahania poziomu cyklicznego AMP. Niemniej wydaje się niezwykle istotne zwrócenie uwagi

na potencjalną rolę cAMP jako czynnika przekazującego do jądra komórkowego sygnały o przemianach zachodzących na powierzchni błony komórkowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Szumiel I., Zajdel M. E., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 175—198.
2. Kahl A., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 199—224.
3. Molecular Corespondent, (1972), w *Nature, New Biology*, **236**, 161.
4. Epifanova O. I., Terskich V. V., (1969), *Cell Tissue Kinet.*, **2**, 75—93.
5. Martz E., Steinberg M. S., (1972), *J. Cell. Physiol.*, **79**, 189—210.
6. Becker H., Stanners C. P., Kudlow J. E., (1971), *J. Cell. Physiol.*, **77**, 43—50.
7. Levine E. M., Becker Y., Boone C. W., Eagle H., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 350—356.
8. Weber J. M., Rubin H., (1971), *J. Cell. Physiol.*, **77**, 157—167.
9. Todaro G. J., Lazar G. K., Green H., (1965), *J. Cell. Comp. Physiol.*, **66**, 325—334.
10. Stoker M. G. P., (1972), *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **181**, 1—17.
11. Rein A., Penman S., (1972), *J. Cell. Physiol.*, **79**, 453—456.
12. Griffiths J. B., (1972), *J. Cell. Sci.*, **10**, 515—524.
13. Stanners C. P., Becker H., (1972), *J. Cell. Physiol.*, **77**, 31—42.
14. Cunningham D. D., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2464—2470.
15. Hakomori S., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 1741—1747.
16. Robbins M. W., MacPherson I. A., (1971), *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **177**, 49—58.
17. Yeh J., Fischer H. W., (1969), *J. Cell Biol.*, **40**, 382—388.
18. Baserga R., (1971), w *The cell cycle and cancer*, red. R. Baserga, str. 55—57, M. Dekker Inc., New York.
19. Holley R. W., Kiernan I. A., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 300—304.
20. Clarke G. D., Stoker M. G. P., Ludlow A., Thornton M., (1970), *Nature, Lond.*, **227**, 798—801.
21. Dulbecco R., (1970), *Nature, Lond.*, **227**, 802—806.
22. Paul D., Lipton A., Klinger I., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 645—648.
23. Temin H. M., Pierson R. W. jr., Dulak N. C., (1972), w *Growth, Nutrition and Metabolism in Cells in Culture* **1**, 49—81, Academic Press, Inc. New York, London.
24. Burger M. M., (1971), w *Current Topics in Cellular Regulation* **3**, 135—193, red. Horecker B. L., Stadtman E. R., Academic Press, New York, London.
25. Burger M. M., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 994—1001.
26. Kolodny G. M., Gross P. R., (1969), *Exp. Cell Res.*, **57**, 423—432.
27. Vasiliev J. M., Gelfand I. M., Domnina L. Y., Rappoport R. I., (1969), *Exp. Cell Res.*, **54**, 83—93.
28. Gurney T., jr., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **62**, 906—911.
29. Dulbecco R., Stoker M. G. P., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 204—210.
30. Burger M., (1970), *Nature, Lond.*, **227**, 170—171.

31. Sivak A., Mossman B. T., Van Duuren B. L., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 605—609.
32. Temin H. M., (1971), *J. Cell. Physiol.*, **78**, 161—170.
33. Hülser D., Frank W., (1971), *Z. Naturforschung*, **26 b**, 1045—1048.
34. Baker J. B., Humphreys T., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 2161—2164.
35. Rovera G., Baserga R., (1971), *J. Cell. Physiol.*, **77**, 201—212.
36. Tsuboi A., Baserga R., (1972), *J. Cell. Physiol.*, **80**, 107—118.
37. Stein G., Chandhuri S., Baserga R., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3918—3922.
38. Emerson C. P., (1971), *Nature, New Biology*, **232**, 101—106.
39. Cunningham D. D., Pardee A. B., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**, 1049—1056.
40. Pasternak C. A., (1972), *J. Cell Biol.*, **53**, 231—234.
41. Wiebel F., Baserga R., (1969), *J. Cell Physiol.*, **74**, 191—202.
42. Griffiths J. B., (1972), *Exp. Cell Res.*, **75**, 47—56.
43. Lipton A., Klinger I., Paul D., Holley R. W., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 2799—2801.
44. Ham R. G., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **14**, 34—38.
45. Kay J. E., Cooke A., (1971), *FEBS Letters*, **16**, 9—12.
46. Pohjanpelto P., Raina A., (1972), *Nature, New Biology*, **235**, 247—249.
47. Shodell M., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 1455—1456.
48. Austin P. E., McCulloch E. A., Till J. E., (1972), *J. Cell. Physiol.*, **79**, 181—188.
49. Engelhardt D. L., (1971), *J. Cell. Physiol.*, **78**, 333—344.
50. Johnson G. S., Pastan I., (1972), *J. Nat. Cancer Inst.*, **48**, 1377—1387.
51. Tao M., Salas M. L., Lipmann F., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 408—414.
52. Gill G. V., Garren L. D., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 335—343.
53. Emmer M., deCrombrughe B., Pastan I., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 480—487.
54. Zubay G., Schwartz D., Beckwith J., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 104—110.
55. Bitensky M. W., Gorman R. E., (1973), *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **26**, 409—461.
56. Perry Ch. V., Johnson G. S., Pastan I., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5785—5790.
57. Otten J., Johnson G. S., Pastan I., (1970), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7082—7087.
58. Sheppard J. R., (1972), *Nature, New Biology*, **236**, 14—16.
59. Pastan I., Johnson G. S., Otten J., (1971), *Fed. Proc.*, **30**, Abstr. 1047.
60. Yoshikawa-Fukada M., Nojima T., (1972), *J. Cell Physiol.*, **80**, 421—430.
61. Makman M. H., (1970), *Science*, **170**, 1421—1423.
62. Bürk R. R., (1968), *Nature, Lond.*, **219**, 1272—1275.
63. Makman M. H., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 2127—2130.
64. Makman M. H., Klein M. I., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 456—458.
65. Zacchello F., Benson P. F., Gianneli F., McGuire M., (1971), *Biochem. J.*, **126**, 27 P.
66. Woodin A. M., (1972), *Biochim Biophys. Acta*, **286**, 406—415.
67. Jard S., Premont J., Benda P., (1972), *FEBS Letters*, **26**, 334—348.

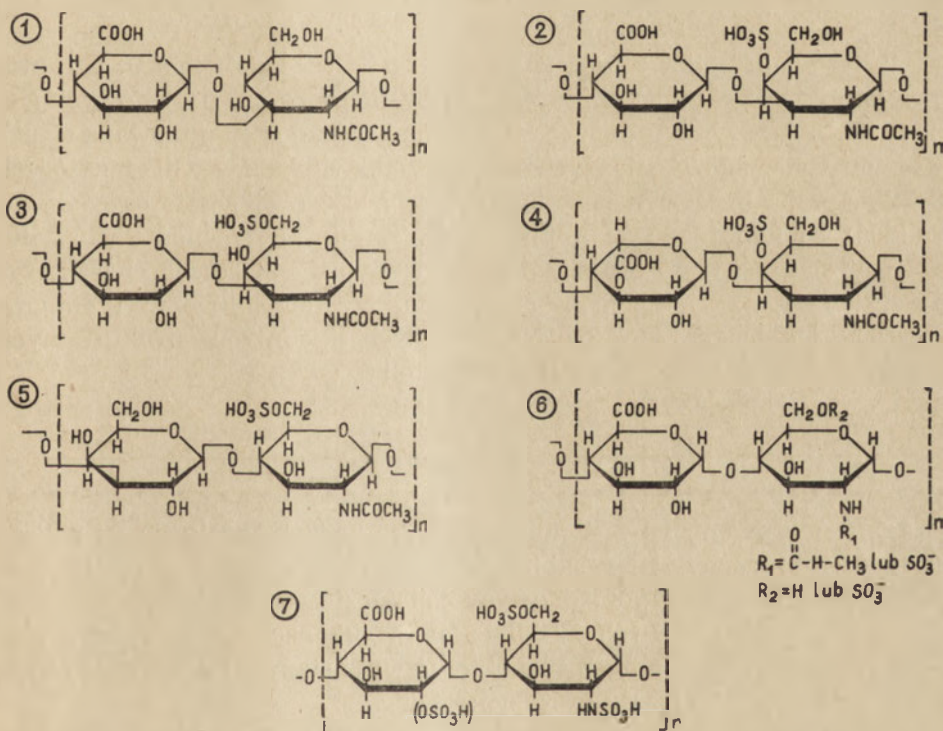
68. Fox T. O., Sheppard J. R., Burger M. M., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 244—247.
69. Granner D. K., Chase L. R., Aurbach G. D., Tomkins G. M., (1968), *Science*, **162**, 1018—1020.
70. Raska K., jr., (1973), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 35—41.
71. D'Armiento M., Johnson G. S., Pastan I., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 459—462.
72. Heidrick M. L., Ryan W. L., (1971), *Cancer Res.*, **31**, 1313—1315.
73. Perkins J. P., McIntyre E. H., (1971), *Fed. Proc.*, **30**, Abstr. 2548.
74. Manganiello V., Vaughn M., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 269—273.
75. Grimm J., Frank W., (1972), *Z. Naturforschung.*, **27b**, 562—566.
76. Monn E., Christiansen R. Q., (1971), *Science*, **173**, 540—542.
77. Cheung W. Y., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2859—2869.
78. Bacalao J., Rieber M., (1972), *Exp. Cell Res.*, **75**, 518—521.
79. Heersche J. N. M., Fedak S. A., Aurbach G. D., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6770—6775.
80. Sheppard J. R., Prescott D. M., (1972), *Exp. Cell Res.*, **75**, 293—296.
81. Millis A. J. T., Forrest G., Piovos D. A., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1645—1649.
82. Zeilig C. E., Johnson R. A., Friedman D. L., Sutherland E. W., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, 296 a.
83. Burger M. M., Bombik B. M., Breckenridge B. M., Sheppard J. R., (1972), *Nature, New Biology*, **239**, 161—163.
84. Murray A. W., Froscio M., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1089—1095.
85. Rasmussen H., (1970), *Science*, **170**, 404—412.
86. Glick M. C., Gerner E. W., Warren L., (1971), *J. Cell. Physiol.*, **77**, 1—6
87. Onodera K., Sheinin R., (1970), *J. Cell Sci.*, **7**, 337—355.
88. Stein G., Baserga R., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 715—722.
89. Prescott D. M., Bender M. A., (1962), *Exp. Cell Res.*, **26**, 260—268.
90. Zylber E. A., Penman S., (1971), *Science*, **172**, 947—949.
91. Simmons T., Heywood P., Hodge L. D., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, 240 a.
92. Mittermayer C., Bremerskov V., (1967), *Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem.*, **348**, 1239.
93. Mittermayer C., Bosselmann R., Bremerskov V., (1968), *Europ. J. Biochem.*, **4**, 487—489.
94. Bray G., Brent T. P., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **269**, 184—191.
95. Scott R. E., Carter L. R., Kichwell W. R., (1971), *Nature, New Biology*, **233**, 219—220.
96. Rubin R. W., Everhart L. P., Porter K. R., Prescott D. M., Frye J., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, 222 a.
97. Mayhew E., (1966), *J. Gen. Physiol.*, **49**, 717—726.
98. Cikes M., Friberg S., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 566—569.
99. Kuhns W. J., Bramson S., (1968), *Nature, Lond.*, **219**, 938—939.
100. Otten J., Johnson G. S., Pastan I., (1971), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1192—1198.
101. Seifert W., Paul D., (1972), *Nature, New Biology*, **240**, 281—283.
102. Tobey R. A., Crissman H. A., (1972), *Exp. Cell Res.*, **75**, 460—464.
103. Klein M. I., Makman M. H., (1971), *Science*, **172**, 863—864.
104. Klein M. I., Makman M. H., (1972), *Fed. Proc.*, **31**, Abstr. 1689.

105. Perkins J. P., MacIntyre E. H., Riley W. E., (1971), *Fed. Proc.*, **30**, Abstr. 330.
106. Hauschka P. V., Rubin R., Everhart L. P., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, 108 a.
107. Hauschka P. V., Everhart L. P., Rubin R. W., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3542—3546.
108. Buckley I. K., Porter K. R., (1967), *Protoplasma* **64**, 349—380.
109. Johnson G. S., Friedman R. M., Pastan I., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 425—429.
110. Hsie A. W., Puck T. T., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 358—361.
111. MacIntyre E. H., Wintersgill C. J., Perkins J., Vatter A. E., (1972), *J. Cell Biol.*, **11**, 639—667.
112. Schröder J., Plagemann P. G., (1971), *J. Nat. Cancer Inst.*, **46**, 423—429.
113. Bletcher M., Hunt N. H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7479—7484.
114. MacManus J. P., Whitfield J. F., Braceland B., (1971), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 503—509.
115. Kaukel E., Hilz H., (1972), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1011—1018.
116. Ryan W. L., Durick M. A., (1972), *Science*, **177**, 1002—1003.
117. Kaukel E., Mundhenk K., Hilz H., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **27**, 197—200.
118. Gilman A. G., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 305—312.
119. Hilz H., Tarnowski W., (1970), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 973—981.
120. Kaukel E., Fuhrman U., Hilz H., (1972), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1516—1524.
121. Ryan W. L., Heidrick M. L., (1968), *Science*, **162**, 1484—1485.
122. Heidrick M. L., Ryan W. L., (1970), *Cancer Res.*, **30**, 376—378.
123. Shapiro D. L., (1973), *Nature, Lond.*, **241**, 203—204.
124. Prasad K. N., Mandal B., Waymire J. C., Less G. J., Vernadakis A., Weiner N., (1973), *Nature, New Biology*, **241**, 117—119.
125. Keller R., Keist R., (1973), *Life Sci.*, **12**, 97—105.
126. Amato R. S., Leuschen M. P., Spencer J., Skultety M., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, 2 a.
127. Johnson G. S., Pastan I., (1971), *J. Nat. Cancer Inst.*, **47**, 1357—1364.
128. Smith E. C., (1972), *Fed. Proc.*, **31**, Abstr. 907.
129. Johnson G. S., Pastan I., (1972), *Nature, New Biology*, **236**, 247—249.
130. Sheppard J. R., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 1316—1320.
131. Johnson G. S., Morgan W. D., Pastan I. (1972), *Nature, Lond.*, **235**, 54—56.
132. Teel R. W., Hall R. G., (1973), *Exp. Cell Res.*, **76**, 390—394.
133. Paul D., (1972), *Nature New Biology*, **240**, 179—181.
134. Smets L. A., (1972), *Nature, New Biology*, **239**, 123—124.
135. Remington J. A., Klevecz R. R., (1973), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 140—146.
136. Frank W., (1972), *Exp. Cell Res.*, **71**, 238—241.
137. Rozengurt F., Pardee A. B., (1972), *J. Cell. Physiol.*, **80**, 273—280.
138. Willingham M. C., Johnson G. S., Pastan I., (1972), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 743—748.
139. Zimmerman J. E., Raska K., jr., (1972), *Nature, New Biology*, **239**, 145—147.
140. Trudel M., Brailovsky C., Lallier R., Nigam V. N., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, 263 a.

Glikoaminoglikany tkanki łącznej

Glycosoaminoglycans of the Connective Tissue

The actual views of the chemical composition, structure and metabolic pathways of the connective tissue glycosoaminoglycans are described. Some recent data concerning the distribution and biological functions of the glycosoaminoglycans in various tissues are also presented.



Ryc. 1. Struktura dwusacharydowych podjednostek glikoaminoglikanów;

1. Kwas hialuronowy, 2. chondroityno-4-siarczan, 3. chondroityno-6-siarczan, 4. siarczan dermatanu, 5. siarczan keratanu, 6. siarczan heparanu, 7. heparyna.

* Dr, Ośrodek Naukowo-Badawczy Akademii Medycznej w Lublinie, Lublin.

Wykaz stosowanych skrótów: PAPS — 3-fosfoadenozyno-5'-fosfosiaraczan, GAG — glikoaminoglikany.

Pojęcie glikozaaminoglikany obejmuje heterogenną grupę polisacharydów wchodzących w skład substancji podstawowej tkanki łącznej, określanych dawniej mianem mukopolisacharydów. Są one polimerami zbudowanymi z powtarzających się podjednostek acetylowanej heksozoaminy związanej wiązaniem glikozydowym z inną komponentą sacharydową, przeważnie kwasem uronowym.

Od roku 1960 coraz częściej stosowane jest nowe, jak się wydaje bardziej adekwatne słownictwo, zaproponowane przez Jeanloza, a przedstawione w tabeli 1.

I. Budowa chemiczna

I.1. Struktura podjednostek dwusacharydowych

Podstawową podjednostką glikozaaminoglikanów są dwusacharydy, których wzory przedstawiono na rycinie 1.

Wyjaśnieniu budowy tych podjednostek poświęcono wiele badań, których wyniki są przedmiotem wyczerpujących opracowań poglądowych (16, 129, 133, 155). Nowsze badania wskazują na bardziej skomplikowaną strukturę polisacharydowych łańcuchów glikozaaminoglikanów, a dla niektórych z nich, np. dla heparyny, postulowana jest podjednostka czterosacharydowa (106). Niemniej jednak, przyjmuje się, że rodzaj komponent sacharydowych, liczba podstawników i typ wiązania w podjednostkach charakterystyczny jest dla określonego rodzaju glikozaaminoglikanów i stanowi podstawę ich klasyfikacji. Opis zasadniczych składników strukturalnych glikozaaminoglikanów zamieszczono w tabeli 2.

I.2. Budowa łańcuchów polisacharydowych

Jak już wspomniano, w wyniku nowszych badań okazało się, że polisacharydowe łańcuchy różnych glikozaaminoglikanów tylko w nielicznych przypadkach stanowią uporządkowany polimer przemiennie ułożonych jednostek monosacharydowych. W glikozaaminoglikanach izolowanych z różnych, lub nawet tych samych tkanek obserwuje się różnice budowy wynikające z co najmniej trzech przyczyn:

- 1) różnego stopnia polimeryzacji podjednostek i wynikających stąd różnic w ciężarze cząsteczkowym łańcuchów polisacharydowych
- 2) zmiennej sekwencji podjednostek i występowania w łańcuchu komponent nietypowych dla danego rodzaju glikozaaminoglikanów
- 3) różnic w miejscu podstawienia i liczby reszt siarczanowych

Ciężary cząsteczkowe glikozaaminoglikanów, najczęściej podawane w piśmiennictwie zestawiono w tabeli 3.

Tabela 1

Glikoaminoglikany tkanki łącznej

| Nazwa | Synonim | Nazwa systematyczna podjednostki |
|-------------------------|--------------------------|---|
| Glikoaminoglikany | Mukopolisacharydy | — |
| Glikoaminoglikuroniany | Mukopolisacharydy kwaśne | — |
| Kwas hialuronowy | — | β /1-3/D-glukuronon-N-acetylo-D-glukozoamina |
| Chondroityna | — | β /1-3/D-glukuronon-N-acetylo-D-galaktozoamina |
| Chondroityno-4-siarczan | Siarczan chondroityny A | β /1-3/D-glukuronon-N-acetylo-4-0-sulfo-D-galaktozoamina |
| Chondroityno-6-siarczan | Siarczan chondroityny C | β /1-3/D-glukuronon-N-acetylo-6-0-sulfo-D-galaktozoamina |
| Siarczan dermatanu | Siarczan chondroityny B | β /1-3/L-Iduronon-N-acetylo-4-0-sulfo-D-galaktozoamina |
| Siarczan keratanu | Kerato-siarczan | β /1-4/D-galaktozylo-N-acetylo-6-0-sulfo-D-glukozoamina |
| Siarczan heparanu | Siarczan heparityny | α /1-4/D-glukuronon-N-sulfo-D-glukozoamina |
| Heparyna | — | α /1-4/2-0-sulfo-D-glukuronon-N-sulfo-6-0-sulfo-D-glukozoamina |

Tabela 2

Struktura łańcucha polisacharydowego glikozoaminoglikanów

| N a z w a | Składniki monosacharydowe | | Rodzaje wiązań | | Podstawnik grupy aminowej heksozoaminy | Grupy siarczanowe | |
|-------------------------|---------------------------|------------------|----------------|-----------------------|--|-------------------|----------------------|
| | 1 | 2 | w podjednostce | między podjednostkami | | liczba | miejsce podstawienia |
| Kwas hialuronowy | kwas D-glukuronowy | D-glukozaamina | $\beta/1-3/$ | $\beta/1-4/$ | CH ₃ CO- | — | — |
| Chondroityno-4-siarczan | kwas D-glukuronowy | D-galaktozaamina | $\beta/1-3/$ | $\beta/1-4/$ | CH ₃ CO- | 1 | 2/C-4 |
| Chondroityno-6-siarczan | kwas D-glukuronowy | D-galaktozaamina | $\beta/1-3/$ | $\beta/1-4/$ | CH ₃ CO- | 1 | 2/C-6 |
| Siarczan dermatanu | kwas L-iduronowy | D-galaktozaamina | $\beta/1-3/$ | $\beta/1-4/$ | CH ₃ CO- | 1 | 1/C-4 |
| Siarczan karetanu | D-galaktoza | D-glukozaamina | $\beta/1-4/$ | $\beta/1-3/$ | CH ₃ CO- | 1 | 2/C-6 |
| Siarczan heparanu | kwas glukuronowy | D-glukozaamina | $\alpha/1-4/$ | $\alpha/1-4/$ | CH ₃ CO-lub SO ₃ - | 1-2 | 2/C-2, 2/C-6 |
| Heparyna | kwas D-glukuronowy | D-glukozaamina | $\alpha/1-4/$ | $\alpha/1-4/$ | CH ₃ CO- lub SO ₃ | 1-3 | 1/C-2, 2/C-2, 2/C-6 |

Różnice między ciężarami cząsteczkowymi podawanymi przez różnych autorów dla tego samego rodzaju glikozoaminoglikanów mogą wynikać ze stosowania różnych metod izolowania; niektóre metody mogą powodować częściową degradację. Istnieją jednak przekonywujące dowody występowania glikozoaminoglikanów o różnej wielkości cząstek. Np. obok kwasu hialuronowego o ciężarze cząsteczkowym 200 000—230 000 (61), Aktins i wsp. (5) izolowali ostatnio kwas hialuronowy, którego ciężar cząsteczkowy wynosił około 1 500 000. W ciałku szklistym oka stwierdzono obecność kwasu hialuronowego o ciężarze 150 000. Hopwood i Robinson (67) z przegrody nosowej wołu izolowali siarczan keratanu o ciężarze cząsteczkowym około 23 000, natomiast z jądra miażdżystego o ciężarze cząsteczkowym 9 500.

Tabela 3

Ciężary cząsteczkowe polisacharydowych łańcuchów glikozoaminoglikanów tkanki łącznej

| R o d z a j | Ciężar cząsteczkowy | Piśmiennictwo |
|------------------------------|---------------------|---------------|
| Kwas hialuronowy | 200 000—230 000 | 61 |
| Chondroityno-4 i 6-siarczany | 10 000—45 000 | 110, 189 |
| Siarczan dermatanu | 16 000—46 000 | 61, 191 |
| Siarczan keratanu | 11 000—20 000 | 9, 61 |
| Siarczan heparanu | 24 000—29 000 | 90 |
| Heparyna | 10 000—20 000 | 16 |

Hovner (69) izolował i oczyścił heparynę stanowiącą rozgałęziony łańcuch zbudowany z mniejszych podjednostek powiązanych wiązaniami wrażliwymi na działanie askorbinianu, której ciężar cząsteczkowy wynosił około 1 miliona.

Istnieją liczne prace wskazujące na skomplikowaną budowę łańcuchów glikozoaminoglikanów. Okazało się np., że oczyszczone preparaty kwasu hialuronowego zawierają pewne ilości galaktozoaminy (6). Fransson i Roden (45, 46) działając hialuronidazą jądrową na oczyszczony siarczan dermatanu otrzymali oligosacharydy o różnej wielkości i w mniejszych stwierdzili obecność kwasu glukuronowego. W glikozoaminoglikanach izolowanych z pępowiny (42) oraz śluzówki jelita i ze skóry (41) stwierdzono występowanie w jednym łańcuchu podjednostek charakterystycznych dla siarczanu dermatanu obok chondroityno-4 i-6-siarczanów. O podobnej strukturze niektórych glikozoaminoglikanów aorty donoszą Kresse, Heidele i Buddecke (94) a wg Franssona i wsp. (43, 44) siarczan dermatanu izolowany z aorty i skóry zawiera odcinki zbudowane z 5 do 8 podjednostek idurono(1-3)4-sulfogalaktozoaminy, poprzedzielane dwusacharydowymi podjednostkami chondroitynosiarczanów. Obecność reszt

galaktozoaminy zestryfikowanej w pozycji 4 oraz w pozycji 6, wykazana została również w jednołańcuchowych polimerach chondroitynosiarczanów (152, 186). Wiele prac wskazuje na niejednorodną budowę polisacharydowego łańcucha heparyny (25, 100, 103, 194) i występowanie w nim reszt kwasu iduronowego. Kwas iduronowy wykryto również w siarczanie heparanu (24).

Dodatkowym źródłem heterogenności glikozoaminoglikanów wydaje się być zmienna liczba reszt siarczanowych. *Mathews* (122) oraz *Suzuki* i wsp. (174) badając chondroityno-4 i chondroityno-6-siarczany stwierdzili w niektórych preparatach obecność grup siarczanowych przy węglu 2 lub 3 reszty glukuronianowej. Podobnie, drugą grupę SO_4 , estryfikującą resztę kwasu iduronowego, wykazano w siarczanie dermatanu (19, 111, 125). Zmiennym stopniem zestryfikowania charakteryzują się siarczany keratanu (123). Przy pomocy metylacji i działania specyficznymi hydrolazami wykazano, że siarczan keratanu posiada rozgałęzione łańcuchy polisacharydowe, zawierające ponadto nietypowe dla glikozoaminoglikanów reszty cukrowcowe, np. fukozy, mannozy i kwasu siałowego (9, 10). Zmienną liczbę reszt siarczanowych posiada siarczan heparanu i heparyna. W siarczanie heparanu może występować różna liczba podjednostek N-acetylo i N-sulfoglukoaminy (23, 105), co umożliwia rozdzielenie frakcji w polu elektrycznym (75). Niektóre podjednostki N-sulfoglukoaminowe heparyny posiadają drugą grupę siarczanową w pozycji 6 (30, 194) a *Linda* i *Axelsson* (101) wykazali obecność grupy siarczanowej w pozycji 2 niektórych reszt kwasu glukuronowego.

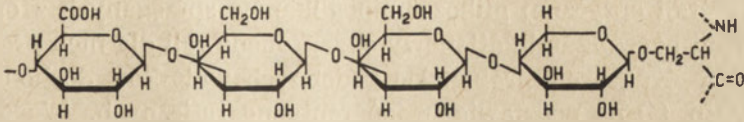
I.3. Budowa połączeń polisacharydowo-białkowych

Jak wiadomo natywne glikozoaminoglikany w przeważającej mierze występują w formie wysokocząsteczkowych połączeń białkowo-polisacharydowych. Okazało się, że końcowy odcinek łańcucha polisacharydowego, łączący komponentę węglowodanową z łańcuchem polipeptydowym, charakteryzuje się odmienną i specyficzną sekwencją reszt cukrowcowych. Jak wynika z licznych badań (29, 58, 135, 147, 148, 157) końcowy fragment polisacharydowego łańcucha chondroitynosiarczanów, siarczanu dermatanu, siarczanu heparanu i heparyny stanowi tetrasacharyd zawierający ksylozę, dwie reszty galaktozy i kwas uronowy, o budowie przedstawionej na rycinie 2.

Stosując reakcję β -eliminacji i redukcji produktów rozpadu borowodorkiem sodu wykazano, że reszta ksylozowa łańcucha polisacharydowego łączy się wiązaniem O-glikozydowym z seryną lub treoniną wbudowaną w polipeptydowy łańcuch cząsteczki białkowej (134).

Nieco inny sposób wiązania komponenty sacharydowej z białkiem postulowany jest dla niektórych połączeń siarczanu keratanu. Okazało się, że

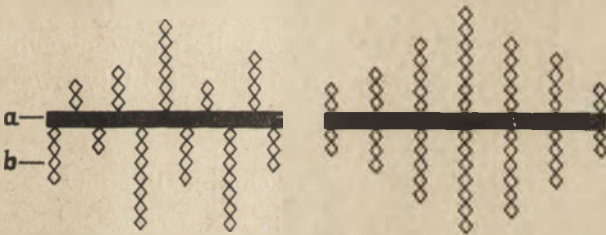
działanie alkaliarni na proteoglikany izolowane z rogówki nie rozbiła połączeń siarczanu keratanu — białko (50, 159). Mathews i Cifonelli (123) oraz Meyer i wsp. (2) wykazali, że ten rodzaj glikozoaminoglikanów łączy się z łańcuchem polipeptydowym wiązaniem N-glikozydowym między resztą końcowej heksozoaminy a grupą aminową asparaginy lub glutaminy.



Ryc. 2. Struktura końcowego odcinka łańcucha polisacharydowego glikozoaminoglikanów, związanego z łańcuchem polipeptydowym (wg 148).

W proteoglikanach izolowanych z chrząstki występuje prawdopodobnie jeszcze inny typ wiązania łańcuchów siarczanu keratanu z białkiem. Jest to wiązanie O-glikozydowe łączące grupę hydroksylową seryny lub treoniny z łańcuchem polisacharydowym, jednak nie za pośrednictwem ksylazy, a poprzez końcową resztę podstawionej galaktozoaminy (1, 183, 185).

Budowa proteoglikanów nie została dotychczas w pełni wyjaśniona i wydaje się, że stanowią one grupę bardzo zróżnicowanych połączeń. Mo-



Ryc. 3. Schemat budowy makrocząsteczek proteoglikanów (wg 133);

a) polipeptydowy łańcuch rdzenia białkowego, b) boczne łańcuchy polisacharydowe.

del cząsteczki proteoglikanów zawierających chondroitynosiarczany zaproponował w roku 1958 Mathews i Lozaityte (126), a następnie Partridge i wsp. (141). Ciężar cząsteczkowy proteoglikanów tego typu określany jest na około 2 000 000 (94). Obecnie wiadomo, że do jednego rdzenia białkowego mogą być przyłączone łańcuchy polisacharydowe różnej długości (151, 184), a także glikozoaminoglikany różnego rodzaju (55, 159). Proponowane modele proteoglikanów przedstawia rycina 3.

Ostatnio te hipotetyczne modele uzyskały potwierdzenie badaniami w mikroskopie elektronowym (150). Buddecke i wsp. (193) badając proteoglikany izolowane z chrząstki nosowej wołu uzyskali dwie frakcje, z których jedna charakteryzowała się łańcuchem polipeptydowym długości 1 700—1 900 Å i obecnością 20—22 bocznych łańcuchów polisacharydowych

o długości 520—540Å. Druga frakcja zawierała proteoglikany o większej cząsteczce, zawierającej około 34 łańcuchy glikozoaminoglikanowe połączone z rdzeniem polipeptydowym długości 3 200—3 400Å.

Trudności metodyczne związane z izolowaniem natywnych makrocząstek glikozoaminoglikanów uniemożliwiają bliższą charakterystykę konformacji przestrzennej łańcuchów polisacharydowych. Niemniej jednak, Stone (172) oraz Hirano i Ondora (63) na podstawie badania kolowej dyspersji optycznej glikozoaminoglikanów sprzęganych z optycznie nieczynnymi barwnikami kationowymi zaproponowali dla nich prawo- lub lewoskrętną strukturę spiralną. Do podobnych wniosków dochodzą Atkins i wsp. (5) na podstawie badań rentgenograficznych. Wasteson (189) biorąc pod uwagę niektóre własności roztworów chondroitynosiarczanów, jak np. lepkość, szybkość dyfuzji i sedymentacji, postuluje występowanie luźnych zwojów lub usztywnionych struktur prostoliniowych. Ta ostatnia konformacja tłumaczyłaby dobrze rolę glikozoaminoglikanów w „sprzęganiu” elementów włókienkowych pozakomórkowej tkanki łącznej.

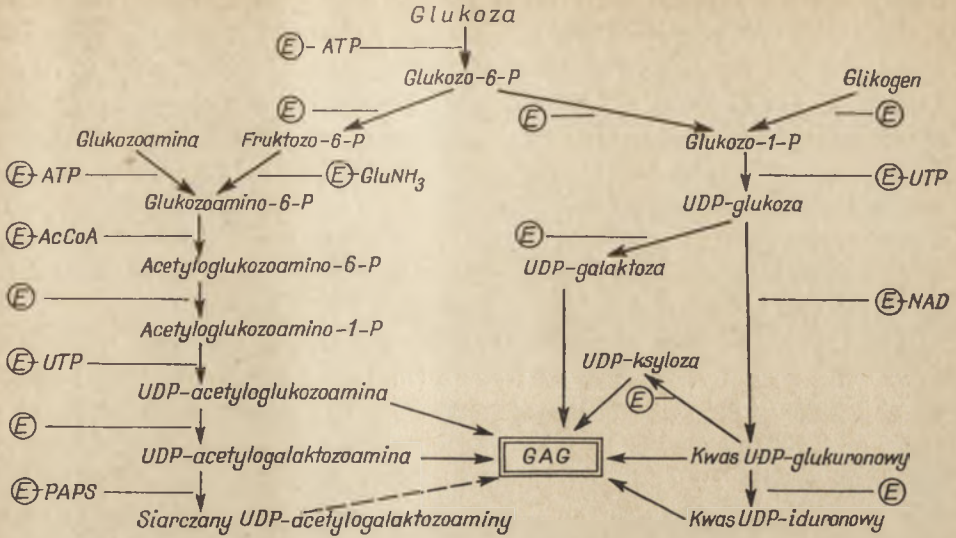
Z przedstawionego przeglądu wynika, że glikozoaminoglikany tkanki łącznej stanowią wysoce zróżnicowaną grupę polisacharydów. Za wyjątkiem kwasu hialuronowego i częściowo heparyny stanowią one składnik połączeń polisacharydobiałkowych, przy czym struktura tych ostatnich, stanowi dodatkowe źródło heterogenności tej grupy związków. Wydaje się, że wielkość makrocząstek, struktura łańcuchów polipeptydowych, budowa i rodzaj przyłączonych łańcuchów polisacharydowych determinowane są rodzajem i funkcją tkanek, w których są syntetyzowane.

II. Metabolizm glikozoaminoglikanów

II.1. Synteza podjednostek monosacharydowych

Stosując znakowane prekursorzy — kwasy uronowe i heksozoaminy wykazano, że nie są one wykorzystywane w organizmach zwierzęcych do syntezy glikozoaminoglikanów. W syntezie tych związków wykorzystywana jest głównie glukoza, a drogi przemian prowadzące do prekursorów wbudowywanych w łańcuch polisacharydowy zostały stosunkowo dobrze poznane i przedstawione w wielu wyczerpujących opracowaniach (36, 161, 173), w tym również w „Postęпах Biochemii” (83). Dla przypomnienia, schemat przemian monosacharydowych podjednostek glikozoaminoglikanów przedstawiono na rycinie 4.

Obejmuje on szereg dobrze poznanych i wspólnych dla metabolizmu węglowodanów reakcji enzymatycznych, przy czym wiadomo, że niektóre z tych procesów jak np. epimeryzacja kwasu glukuronowego zachodzi już po wbudowaniu podjednostki w łańcuch polisacharydowy (102).



Ryc. 4. Główne etapy przemian monosacharydowych prekursorów glikoaminoglikanów.

II.2. Synteza łańcucha polisacharydowego

Jak wynika z badań inkorporacji ¹⁴C-glukozy i ³⁵S-siarczanu w hodowlach tkankowych oraz *in vitro*, zahamowanie syntezy białek np. puromycyną lub cykloheksomidem, hamuje również syntezę łańcucha polisacharydowego (26, 77, 120, 138). Tak więc, obecność komponenty białkowej proteoglikanów jest warunkiem polimeryzacji podjednostek monosacharydowych.

Pierwszym etapem syntezy łańcucha chondroitynosiarczanów, siarczanu dermatanu, siarczanu heparanu, a prawdopodobnie i heparyny jest przeniesienie ksylozy z urydynodwufosforanu na grupę hydroksylową seryny lub treoniny (49, 146). Reakcję tę katalizuje transferaza UDP-ksylozy, specyficzna prawdopodobnie wobec sekwencji aminokwasów w otoczeniu wchodzącej w reakcję reszty seryny lub treoniny (85, 181). Następnym etapem syntezy łańcucha polisacharydowego jest enzymatyczne wbudowywanie reszt galaktozy, katalizowane przez odpowiednie transferazy. Transferaza przenosząca resztę galaktozylową na ksylozę charakteryzuje się niską specyficnością substratową (58, 59). Transferaza wprowadzająca drugą resztę galaktozy ma inne optimum działania i jest specyficzna wobec ugrupowania β-galaktozyl-(1-4)ksylozowego (59). Obydwa enzymy są aktywne w obecności jonów Mn⁺⁺ (59, 98).

Przemienne przedłużenie łańcucha uwarunkowane jest wysoką specyficnością substratową działających w następującej kolejności UDP-glukuronilo- i UDP-N-acetylogalaktozoinotransferazy. Wykazano obecność

dwóch różnych aktywności transferazowych dla UDP-glukuronianu, z których jedna przenosi resztę glukuronianową na fragment galaktozylogalaktozowy, druga natomiast na końcową N-acetylogalaktozaminę (60). Specyficznym akceptorem dla UDP-N-acetylogalaktozaminotransferazy jest kwas glukuronowy, stanowiący zakończenie łańcucha cukrowego (99).

Istnieje prawdopodobnie przestrzenna sekwencja kolejnych etapów syntezy glikozoaminoglikanów. Przemawiają za tym wyniki badań wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia enzymów. Transferazy reszt ksylozylowych i galaktozylowych wykryto w ziarnistościach, natomiast enzymy dalszych etapów biosyntezy w błonach gładkich (56, 139, 163).

Mechanizm zakończenia syntezy łańcucha polisacharydowego nie został dotychczas poznany. Według T e l s e r a (177) po osiągnięciu pewnej optymalnej długości łańcucha następuje enzymatyczne sulfonowanie odpowiednich reszt cukrowych, a wprowadzenie grup siarczanowych hamować ma dalsze wydłużanie polisacharydu. Stosunkowo niewiele wiadomo na temat specyficzności sulfotransferaz przenoszących grupy siarczanowe z PAPS na odpowiednie podjednostki węglowodanowe. Wydaje się, że miejsce wprowadzenia grupy siarczanowej determinuje takie czynniki jak konformacja łańcucha polisacharydowego, jego długość, sekwencja monosacharydów, a nawet rodzaj związanej komponenty polipeptydowej (145). Za tym, że wbudowywanie reszt siarczanowych następuje wyłącznie na poziomie łańcucha polisacharydowego przemawiają próby syntezy glikozoaminoglikanów w hodowlach tkankowych w nieobecności PAPS (162, 164) oraz w obecności znakowanych siarczanów monosacharydów (142, 175).

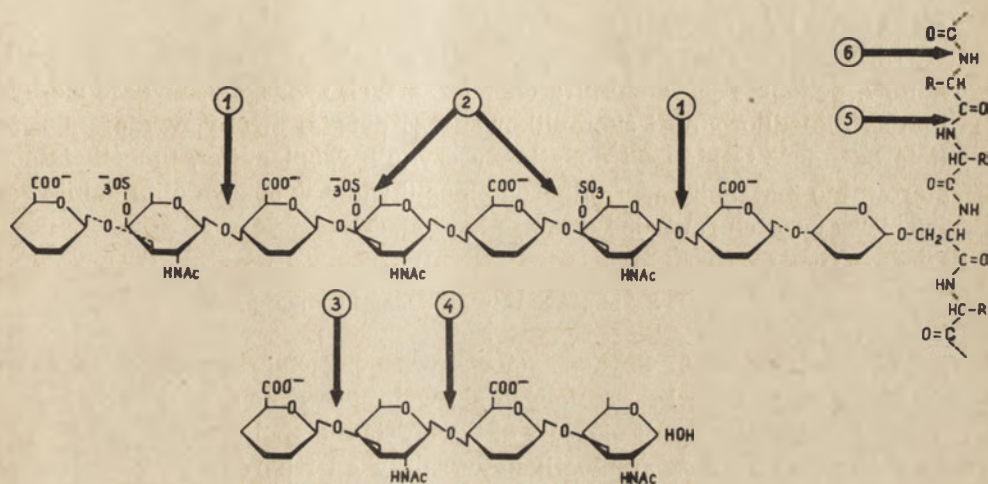
Sulfonowanie reszt aminowych glukozaminy heparyny i siarczanu heparanu zachodzi na drodze enzymatycznej wymiany grupy acetylowej na siarczanową (163). Wykazano to w trakcie syntezy polisacharydu z UDP-glukuronianu i znakowanej w grupie acetylowej N-acetyloglukozaminy. W nieobecności PAPS powstawał polimer N-acetylowany, w obecności, następowała wymiana grup acetylowych na siarczanowe. Liczba wprowadzonych reszt SO_4 , która jak już wspomniano może być różna, zależy prawdopodobnie od stężenia aktywnego siarczanu.

Biosynteza glikozoaminoglikanów jest ściśle związana z syntezą komponenty białkowej. Struktura łańcuchów polipeptydowych determinuje niewątpliwie zarówno rodzaj, długość, jak i liczbę powstających jednostek polisacharydowych wchodzących w skład cząsteczki proteoglikanu. Procesy te nie zostały jednak dotychczas wyjaśnione i są przedmiotem dalszych intensywnych badań.

II.3. Drogi rozpadu glikozoaminoglikanów

Katabolizm glikozoaminoglikanów rozpoczyna się prawdopodobnie proteolitycznym rozpadem polipeptydowego łańcucha proteoglikanów, w wyniku czego uwalniają się polisacharydy zawierające jeszcze niewielką resztę

aminokwasową. Są one wydalane w formie niezmienionej, bądź rozkładane dalej do odpowiednich oligosacharydów. Obecność enzymów katalizujących rozpad glikoaminoglikanów wykazano w wielu bakteriach i jądach (104) oraz w wielu tkankach zwierzęcych. W tych ostatnich są one zlokalizowane głównie w lizosomach komórek tkanki łącznej (77, 192) i różnią się aktywnością, specyficznością substratową i zakresem optimum pH. Miejsce działania hydroliz biorących udział w katabolizmie glikoaminoglikanów przedstawia rycina 5.



Ryc. 5. Miejsce działania enzymów katabolizmu proteoglikanów tkankowych na przykładzie chondroityno-4-siarczanu (wg 17);

1. Hialuronidaza, 2. chondroitynosulfohydrolaza, 3. β -glukuronidaza, 4. N-acetylo- β -hekszoaminidazy, 5. katepsyna, 6. kwaśne karboksypeptydazy.

Hialuronidazy (EC 3.2.1.35) działają najsilniej na kwas hialuronowy, chociaż katalizują także rozpad wiązania β (1—4) glikozydowego chondroitynosiarczanów (70, 165, 167); nie działają natomiast lub tylko w bardzo małym stopniu na łańcuchy siarczanu dermatanu, siarczanu keratanu, siarczanu heparanu heparyny (79, 130). Enzymy katalizujące specyficzną degradację chondroitynosiarczanów wykryto u bakterii *Proteus vulgaris* i *Flavobacterium heparanicum* (35, 64, 119). W indukowanych hodowlach tych ostatnich udało się wykazać aktywność heparanidazy specyficznej wobec heparyny i siarczanu heparanu (31, 68).

Degradacja powstałych oligosacharydów przebiega przy udziale enzymów katalizujących rozpad wiązań β (1-3) i β (1-4) glikozydowych: β -N-acetylo-D-glukozaminidazy (EC 3.2.1.30), β -D-glukuronidazy (EC 3.2.1.31) i β -D-galaktozydazy (EC 3.2.1.23). Wydaje się, że enzymy te są specyficzne wyłącznie wobec rozbijanego wiązania i mogą być wspólne dla oligosacharydów pochodzących z różnych przemian ustrojowych.

Stosunkowo mało wiadomo na temat aktywności i sekwencji działania

sulfataz. Najlepiej poznana chondroitynosulfataza (EC 3.1.6.4) wydaje się wykazywać pewną specyficzność wobec miejsca podstawienia grupy siarczanowej (57, 195). Nie wiadomo czy fakt wydalania z moczem w większości sulfonowanych poli- i oligosacharydów wynika z niskiej aktywności sulfataz tkankowych czy też z wtórnej estryfikacji reszt kwasu glukuronowego. Tę ostatnią możliwość sugeruje fakt, że niektóre etapy degradacji łańcucha polisacharydowego wymagają wcześniejszego uwolnienia reszt siarczanowych. Wykazano np., że rozpad siarczanu keratanu do galaktozy i N-acetyloglukozoaminy pod wpływem wyciągu z wątroby *Charonia lampas* przebiega przez etap desulfatacji łańcucha polisacharydowego.

Układy enzymatyczne biorące udział w katabolizmie glikozoaminoglikanów, podobnie jak struktura chemiczna tych związków, wydaje się być bardzo niejednorodny i skomplikowany. Z drugiej strony, wydaje się, że heterogenność ta stanowi dodatkowy czynnik regulacyjny, umożliwiający sterowanie metabolizmem glikozoaminoglikanów w sposób optymalnie zabezpieczający ich funkcję w tkance łącznej.

II.4. Szybkość obrotu glikozoaminoglikanów

W przeciwieństwie do upostaciowianych pozakomórkowych składników tkanki łącznej, charakteryzujących się wolnym rytmem odnowy, glikozoaminoglikany odznaczają się dużą aktywnością metaboliczną. Szybkość syntezy i rozpadu glikozoaminoglikanów zależy od ich rodzaju, a w jeszcze większym stopniu od wieku i rodzaju badanych tkanek.

Badając *in vivo* szybkość inkorporacji ^{14}C -glukozy i ^{35}S -siarczanu do glikozoaminoglikanów aorty, Kresse i Buddecke (93) określili względną szybkość syntezy różnych komponent. Przyjmując 1,0 dla siarczanu dermatanu, wynosiła ona 1,9 dla kwasu hialuronowego, 0,9 dla siarczanu heparanu i 0,4 dla chondroitynosiarczanów. Podobnie, wyższą szybkość syntezy kwasu hialuronowego wykazano w skórze dojrzałych królików i szczurów (128) oraz w tkance mózgowej (117). Okazało się jednak, że w tkankach embrionalnych, charakteryzujących się szybką syntezą i depozycją kolagenu, również szybkość syntezy siarczanu dermatanu i chondroitynosiarczanów przewyższa szybkość syntezy kwasu hialuronowego (51).

W badaniach inkorporacji znakowanej glukozy i siarczanu do glikozoaminoglikanów chrząstki wykazano różną szybkość obrotu nawet w obrębie jednego typu (87, 137, 149). Stwierdzono np., że w chrząstce żebrowej cielęcina (88) i chrząstce ucha (7) istnieją co najmniej dwie pule chondroitynosiarczanów charakteryzujące się nie tylko różną wielkością cząstek i różnym stopniem sulfonowania, ale i różnym rytmem odnowy. Fakt ten determinuje zapewne również odmienne funkcje biologiczne.

Jak dalece zróżnicowane są procesy syntezy i degradacji świadczą badania izotopowe prowadzone w hodowlach komórkowych (27, 32, 57, 153).

Wykazano, że nawet w różnych klonach tych samych komórek obserwuje się istotne różnice w szybkości inkorporacji znakowanych prekursorów do tych samych rodzajów polisacharydów. Ta wielka „elastyczność” w przemianach glikozoaminoglikanów oraz możliwość wielokierunkowej regulacji przemian, jakkolwiek nie została jeszcze całkowicie poznana, wiąże się niewątpliwie z ich różnorodnymi i ważnymi funkcjami biologicznymi.

III. Rola biologiczna glikozoaminoglikanów

III.1. Rozmieszczenie glikozoaminoglikanów w tkance łącznej

Omawiając zawartość i skład glikozoaminoglikanów w tkankach i płynach ustrojowych należy pamiętać o trudnościach metodycznych związanych z ich oznaczaniem i rozdziałem. Oznaczanie heksozamin lub kwasów uronowych w preparatach nieoczyszczonych jest nieadekwatne z uwagi na obecność sacharydów pochodzących z innych składników tkankowych i interferencję białek. Podobne zastrzeżenia dotyczą metod opartych na zjawisku metachromazji błękitu toluidynowego (84, 109). Niemniej jednak, osiągnięty w ostatnich latach postęp metodyczny w zakresie izolowania, oczyszczania i rozdziału glikozoaminoglikanów (14, 131, 176, 178) umożliwił bardziej precyzyjne badanie tych związków w tkance łącznej.

Zawartość glikozoaminoglikanów w różnych rodzajach tkanek przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4

Zawartość glikozoaminoglikanów w tkankach

| T k a n k a | Glikozoaminoglikany w % suchej odtł. tkanki | Piśmiennictwo |
|------------------|--|---------------|
| Chrzątka | 8,9 — 25,0 | 96, 112, 176 |
| Jądro miazdżyste | 13,2 — 14,8 | 18, 47 |
| Rogówka | 2,2 — 5,4 | 144, 176 |
| Twardówka | 0,3 — 0,9 | 140 |
| Aorta | 0,7 — 1,4 | 38, 176, 179 |
| Prostata | 0,43 — 2,4 | 117 |
| Skóra | 0,22 — 0,70 | 15, 91, 176 |
| Sluzówka | 0,25 — 0,56 | 74 |
| Nerki — rdzeń | 0,88 — 1,55 | 71 |
| kora | 0,11 — 0,13 | |

Niezależnie od różnic narządowych, obserwuje się znaczne różnice gątkowe (38, 62), a przede wszystkim różnice determinowane wiekiem. W niektórych tkankach jak np. skóry, chrząstki, tkanki mózgowej (15, 39, 180, 195) ogólna zawartość glikozoaminoglikanów spada, podczas gdy w

Tabela 5

Skład glikoaminoglikanów w niektórych rodzajach tkanek

| T k a n k a | Skład glikoaminoglikanów w procentach | | | | | | | Piśmiennic- two |
|----------------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------|--------------------|
| | Kwas hialuronowy | Chondroity- no-4-siarczan | Chondroity- no-6-siarczan | Siarczan dermatanu | Siarczan keratanu | Siarczan heparanu | Heparyna | |
| Człowiek | | | | | | | | |
| Chrzęstka | — | 5,7 | 42,5 | — | 51,7 | — | — | 112 |
| Płyn synowialny | 97,3 | 2,7 | — | — | — | — | — | 160 |
| Aorta | 6,2 | 26,1 | 19,5 | 14,9 | 14,0 | 13,5 | 5,5 | 179 |
| Aorta | 5,8 | 16,2 | 28,0 | 27,0 | 10,0 | 13,0 | — | 176 |
| Tętnice mózgowie | 1,5 | 32,5 | — | 23,0 | — | 43,0 | — | 151 |
| Skóra | 60,0 | — | — | 40,0 | — | — | — | 66 |
| Skóra | 46,0 | — | 54,0 | — | — | — | — | 14 |
| Świnia morską | | | | | | | | |
| Chrzęstka tchawicy | 4,3 | 55,7 | 3,8 | 3,1 | 26,0 | 5,5 | — | 176 |
| Aorta | 16,1 | — | 37,0 | 7,4 | — | 14,6 | — | 48 |
| Płuca | 13,0 | 19,6 | 13,1 | 10,8 | 17,4 | 13,1 | 13,0 | 176 |
| Świnia | | | | | | | | |
| Skóra | 36,3 | 3,9 | 4,9 | 49,0 | 3,9 | 2,0 | — | 176 |
| Szczur | | | | | | | | |
| Skóra | 56,0 | — | 28,7 | — | — | — | 15,3 | 127 |
| Tkanka mózgową | 32,0 | 46,0 | 5,0 | 3,0 | — | 14,0 | — | 116 |
| Wół | | | | | | | | |
| Rogówka | 21,0 | 11,5 | — | — | 50,0 | 12,7 | 4,8 | 176 |

innych, np. w rogówce i tkance naczyń krwionośnych wzrasta w procesie starzenia (3, 137, 144, 158, 179). W ścianie naczyniowej stwierdzono istotne różnice w zawartości glikozoaminoglikanów w warstwie środkowej i wewnętrznej, w naczyniach tętniczych i żylnych oraz między tętnicami różnych obszarów ciała (28, 95, 114, 136, 137).

Stosując coraz bardziej precyzyjne metody rozdziłu glikozoaminoglikanów tkankowych, stwierdzono, że różne tkanki zawierają różne typy polisacharydów w zmiennych proporcjach. Skład glikozoaminoglikanów niektórych tkanek przedstawiono w tabeli V.

Okazuje się, że skład ten nie jest stały i ulega dynamicznym zmianom w procesie rozwoju i fizjologicznego starzenia. Wykazano np, że w skórze embrionów 75% glikozoaminoglikanów stanowi kwas hialuronowy, około 15% chondroityno-4- i 6-siarczany a zaledwie 10% siarczan dermatanu. W skórze zwierząt dorosłych zawartość siarczanu dermatanu wzrasta do 60%, podczas gdy zawartość kwasu hialuronowego istotnie spada (107). Przesunięcia w procentowej zawartości chondroityno-4-siarczanu, siarczanu keratanu i chondroityno-6-siarczanu obserwowano w procesie starzenia chrząstki (12, 65, 80, 166). Wzrost zawartości siarczanu keratanu przy spadku glikozoaminoglikanów bezsiarkowych obserwowano w czasie rozwoju rogówki zarodków kurzych (144).

Liczne prace poświęcono badaniom składu glikozoaminoglikanów aorty (81, 89, 113, 156, 179). Jakkolwiek publikowane wyniki nie są zgodne, co może wynikać zarówno z różnic metodycznych jak i niejednorodności materiału, wydaje się, że i w tej tkance w przebiegu fizjologicznego starzenia dochodzi do zmniejszenia zawartości kwasu hialuronowego i siarczanu heparanu, przy wzroście siarczanu dermatanu i chondroityno-siarczanów.

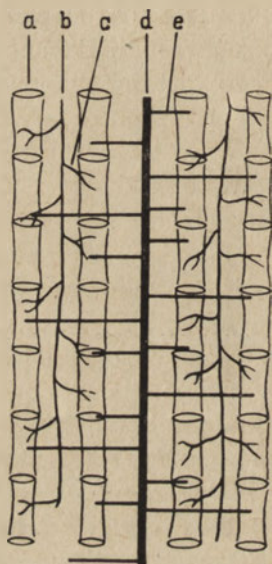
Ogólnie, w procesie fizjologicznego starzenia obserwuje się spadek procentowej zawartości kwasu hialuronowego oraz obniżenie stosunku glikozoaminoglikanów do pozostałych pozakomórkowych składników tkanki łącznej, głównie kolagenu (22). Jest to prawdopodobnie wyrazem zmieniających się z wiekiem własności i funkcji tkanek.

III. 2. Funkcje biologiczne glikozoaminoglikanów

Funkcje biologiczne glikozoaminoglikanów tkanki łącznej rozpatrywane są w aspektach ich udziału w następujących procesach:

- 1) fibrylogenezy i stabilizacji pozakomórkowych włókienkowych składników tkanki
- 2) kalcyfikacji tkanki łącznej kości i chrząstki
- 3) interakcji i depozycji substancji endo- i egzogennych przenikających do tkanki łącznej ze środowiska
- 4) regulacji uwodnienia tkanek
- 5) krzepnięcia i fibrynolizy

Glikoaminoglikany tworzą *in vitro* kompleksy z rozpuszczalnym kolagenem powodując jego precypitację (72, 121, 180). Przebieg tych reakcji zależy od szeregu czynników takich jak rodzaj glikoaminoglikanów, siła jonowa i pH środowiska i uwarunkowany jest prawdopodobnie silnie ujemnym ładunkiem polisacharydu. Jakkolwiek mechanizm tych reakcji w warunkach *in vivo* jest mniej pewny i bywa oceniany krytycznie (82), dotychczasowe badania (124, 136, 190) wydają się wskazywać, że przynajmniej niektóre glikoaminoglikany mogą inicjować agregację cząsteczek tropokolagenu zapoczątkowującą tworzenie fibryli. Zagadnienie czy oddziaływanie glikoaminoglikanów zależy wyłącznie od ich ładunku, czy też wiąże się z tworzeniem jonowych lub kowalencyjnych połączeń pośrednich, nie zostało dotychczas wyjaśnione.



Ryc. 6. Schemat kompleksów kolagenoglikoproteidoproteoglikanowych w tkance łącznej wg Jacksona i Bentleya (73)

a) włókna kolagenowe, b) polipeptydowe łańcuchy glikoproteidów, c) węglowodanowe łańcuchy boczne, d) rdzeń białkowy proteoglikanów, e) polisacharydowe łańcuchy glikoaminoglikanów.

Rola glikoaminoglikanów, a właściwie proteoglikanów, w stabilizacji sieci włókienkowej tkanki, polegać ma na elektrostatycznym „spinaniu” dużych fibryli powstałych w wyniku interakcji kolagenu i glikoproteidów. Hipotetyczny model takiej struktury, przedstawiony na rycinie 6, zaproponowany został przez Jacksona i Bentleya (73), a jego potwierdzeniem wydaje się być między innymi stała obecność węglowodanów w preparatach kolagenu.

Stwierdzona ostatnio zależność własności mechanicznych tkanki od stosunku kolagen:glikoaminoglikany wskazuje również na udział tych

związków w organizacji uporządkowanej struktury przestrzennej tkanki łącznej. Dodatkowym elementem zabezpieczającym mechaniczną wytrzymałość substancji podstawowej może być wzajemna interakcja proteoglikanów, na co wskazuje wykazana ostatnio ich zdolność do agregacji (54, 182).

Poglądy na udział glikoaminoglikanów w procesie mineralizacji tkanki są sprzeczne (20, 78). Fakt, iż odkładanie fosforanu wapnia jest hamowane przez chondroityno-siarczany (21, 33) sugeruje, że są one inhibitorami mineralizacji. Z drugiej strony, obserwuje się wzrost zawartości glikoaminoglikanów w tkankach w okresie kostnienia (22, 188). Wykazano również, że czynniki hamujące mineralizację reagują z chondroityno-siarczanami (132, 169). Na podstawie ostatnich badań (37, 40, 143, 187) można przypuszczać, że udział glikoaminoglikanów w procesie mineralizacji tkanki wiąże się z pewnymi zmianami w obrębie łańcuchów polisacharydowych (np. częściowa degradacja lub desulfatacja), lub nawet z transformacją połączeń polisacharydowo-białkowych.

Własności fizyko-chemiczne i uporządkowane rozmieszczenie glikoaminoglikanów w substancji podstawowej tkanki łącznej sprawiają, że przypisuje się im rolę jonowymienników biorących udział w aktywnym transporcie metabolitów przemiany materii (97). W ten sposób zmiany w składzie glikoaminoglikanów mogą wpływać na przenikanie substancji odżywczych do chondrocytów, lub hamować usuwanie produktów przemian komórkowych (118). Szczególne zainteresowanie budzi interakcja glikoaminoglikanów z lipidami w aspekcie ich depozycji prowadzącej do wytworzenia zmian miażdżycowych. Powstawanie kompleksów glikoaminoglikanów z β -lipoproteidami zachodzi *in vitro* (8, 13, 171); wykazano również obecność takich kompleksów w blaszkach miażdżycowych aorty (11, 170). Ponieważ w procesie arterogenezy obserwuje się istotne zmiany w zawartości i składzie glikoaminoglikanów warstwy środkowej i wewnętrznej ściany naczyniowej (95, 135, 137) można przypuszczać, że na tej drodze dochodzi do patologicznego odkładania β -lipoproteidów w tkance łącznej.

Istnieje ścisły związek między stopniem uwodnienia tkanki łącznej, a składem glikoaminoglikanów. W miarę starzenia zmniejsza się zawartość wody w tkankach (4, 168) co nie zawsze wiąże się z obniżeniem całkowitej ilości glikoaminoglikanów. Zdolność hydratacji determinowana ma być przede wszystkim przez zawartość kwasu hialuronowego (22, 127), a także inne czynniki, np. stopień polimeryzacji glikoaminoglikanów, ich ładunek itp. W tkankach o dużej zawartości glikoaminoglikanów obserwuje się wyższe stężenie kationów, głównie jonu sodowego, niż w otaczającym środowisku (52, 53), co pozwala na zatrzymywanie wody. Zmiany w obrębie glikoaminoglikanów, połączone ze zmianą ładunku mogą być czynnikiem regulującym zdolność wiązania kationów, stopień uwodnienia, przepuszczalność oraz inne funkcje biologiczne tkanki.

Szczególnie interesujący, jakkolwiek mało zbadany jest udział glikozoaminoglikanów w procesach krzepnięcia i fibrynolizy. Wykazano, że nie tylko heparyna, lecz i inne rodzaje glikozoaminoglikanów hamują proces krzepnięcia (34, 86, 115). Według K o p e ć i wsp. (92) glikozoaminoglikany ściany naczyńniowej hamują precypitację fibryny i w ten sposób przeciwdziałają powstawaniu zakrzepów. Na własności fibrynolityczne glikozoaminoglikanów zwraca uwagę praca L o m b a r d i i wsp. (108).

Zawartość i skład glikozoaminoglikanów ulega istotnym zmianom w procesach patologicznych przebiegających w tkance łącznej i, jak się wydaje, może mieć związek z patogenezą niektórych schorzeń. Omawianie tych zagadnień przekracza jednak ramy artykułu.

Zasygnalizowane tutaj możliwe funkcje glikozoaminoglikanów w tkance łącznej są, podobnie jak ich metabolizm przedmiotem dalszych intensywnych badań. Należy mieć nadzieję, że w niedługim czasie pozwolą one pełniej zrozumieć rolę tych interesujących związków i ich znaczenie w organizmach żywych.

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson D., Bray B., Lieberman R., Meyer K., *J. Biol. Chem.* **242**, 3373, (1967).
2. Anderson B., Seno N., Sampson P., Riley J. G., Hoffman P., Meyer K., *J. Biol. Chem.* **239**, 2761, (1964).
3. Anseth A.; *Expt. Eye Res.* **1**, 116, (1961).
4. Asboe-Hansen G., *Physiol. Rev.* **38**, 446, (1958).
5. Atkins E. D. T., Phelps C. F., Sheehan J. K., *Biochem. J.* **128**, 1255, (1972).
6. Atkins E. D. T., Sheehan J. K., *Biochem. J.* **125**, 92, (1971).
7. Bentley J. P., Rokosova B., *Biochem. J.* **116**, 329, (1970).
8. Bernfeld P., Nisselbaum J. S., Berkeley B. J., Hanson R. W., *J. Biol. Chem.* **235**, 2852, (1960).
9. Bhavanandan V. P., Meyer K., *J. Biol. Chem.* **243**, 1052, (1968).
10. Bhavanandan V. P., Meyer K., *J. Biol. Chem.* **243**, 4352, (1968).
11. Bihari-Varga M., Simon J., Göro S., *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **3**, 375, (1968).
12. Bjelle A. O., Antonopoulos A. C., Engfeldt B., Hjertquist S. O., *Calc. Tiss. Res.* **8**, 237, (1972).
13. Böttcher C. J. F., Woodford F. P., Klynstra F. B., *J. Atheroscler. Res.* **4**, 24, (1963).
14. Breen M., Weinstein H. G., Andersen M., Weis A., *Anal. Biochem.* **35**, 146, (1970).
15. Breen M., Weinstein H. G., Johnson R. L., Weis A., Marshall R. T., *Biochim. Biophys. Acta*, **201**, 54, (1970).
16. Brimacombe J. S., Webber J. M., *Mucopolysaccharides*, Elsevier, New York, 1964.
17. Buddecke E., Kresse H., *Angliologia* **6**, 89, (1969).
18. Butler W. F., Wels C. M., *Biochem. J.* **122**, 647, (1971).
19. Calatroni A., Di Ferrante N., *Anal. Biochem.* **25**, 370, (1968).

20. Campo R. D., *Clin. Orthop.* 68, 182, (1970).
21. Campo R. D., Tourtellotte C. D., Bielan R. J., *Biochim. Biophys. Acta* 177, 501, (1969).
22. Chvapl M. w *Physiology of Connective Tissue*, red. Butterworths, London and Czechoslovak Medical Press, Praque, 1967.
23. Cifonelli J. A., Dorfman A., *J. Biol. Chem.* 235, 3283, (1960).
24. Cifonelli J. A., Dorfman A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 41, (1952).
25. Cifonelli J. A., King J., *Carbohydr. Res.* 12, 391, (1970).
26. Cole N. N., Lowther D. A., *FEBS Letters* 2, 351, (1969).
27. Conrad G. W., *Develop. Biol.* 21, 611, (1970).
28. Delferes E. R. Jr., Ruiz H., Kumar V., Radhakrishnemurthy B., Berenson G. S., *Atherosclerosis* 13, 121, (1971).
29. Denishefsky I., Abraham G., *Preparat. Biochem.* 1, 133, (1971).
30. Denishefsky I., Steiner H., Bella A., Friedelander A.; *J. Biol. Chem.* 244, 1741, (1969).
31. Dietrych C. P., *Biochemistry* 8, 2089, (1969).
32. Di Ferrante N., Donnelli P. V., Neri G., *Biochem. Med.* 5, 269, (1971).
33. Disalve J., Schubert M., *J. Biol. Chem.* 242, 705, (1967).
34. Doane W. M., Whistler R. L., *Arch. Biochem. Biophys.* 10, 436, (1963).
35. Dodgson K. S., Lloyd A. G., *Biochem. J.* 68, 88, (1958).
36. Dodgson K. S., Lloyd A. G. w *Carbohydrate Metabolism and its Disorders*, red. Dickens E., Fandle P. J., Whelan W. J., Academic Press, New York, 1968, tom. 1, str. 169.
37. Dziewiątkowski D. D., Tourtellotte C. D., Campo R. D. w *The Chemical Physiology of Mucopolisaccharides*, red. Little, Brown and Co., Boston, 1968, str. 63.
38. Engel U. R., *Atherosclerosis* 13, 45, (1971).
39. Fleischmajster R., Perlish J. S., Bashey R. I., *Biochim. Biophys. Acta* 279, 265, (1972).
40. Földes I., Módis L., Petkò M., Gehl A., Süveges I., Gyurkò M., *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* 18, 117, (1970).
41. Fransson L. A., *Ark. Kem.* 29, 95, (1968).
42. Fransson L. A., *J. Biol. Chem.* 243, 1504, (1968).
43. Fransson L. A., Havsmark B., *J. Biol. Chem.* 245, 4770, (1970).
44. Fransson L. A., Roden L., *J. Biol. Chem.* 242, 4170, (1967).
45. Fransson L. A., Roden L., *J. Biol. Chem.* 242, 4161, (1967).
46. Fransson L. A., Roden L., *J. Biol. Chem.* 242, 4170, (1967).
47. Gardell S., Szirmai J. A. w *The Connective Tissue*, red. Williams and Wilkins, Baltimore, 1967.
48. Gore T., Takeuchi J., Kimoto E., *Circulation* 30, suppl. 3, 10, (1964).
49. Grebner E. E., Hall C. W., Neufeld E. F., *Arch. Biochem.* 116, 391, (1966.)
50. Greiling H., Stahlsatz H. W.; *Z. Physiol. Chem.* 350, 449, (1969).
51. Hardingnam T. E., Phelps C. F., *J. Biol. Chem.* 179, 885, (1970).
52. Harris G. S., *Circulat. Res.* 26/27, suppl. 2, 91, (1970).
53. Harris G. S., Palmer W. A., *Clin. Sci.* 40, 293, (1971).
54. Hascall V. C., Sajdera C. W., *J. Biol. Chem.* 244, 2384, (1969).
55. Heinegard D., Gardell S., *Biochim. Biophys. Acta* 148, 164, (1967).
56. Helting T., *J. Biol. Chem.* 247, 4327, (1972).
57. Helting T., Ogren S., Lindhal U., Pertoft M., Laurent 2., *Biochem. J.* 126, 587, (1972).
58. Helting T., Roden L., *Biochim. Biophys. Acta* 170, 301, (1968).
59. Helting T., Roden L., *J. Biol. Chem.* 244, 2790, (1969).

60. Helting T., Roden L., *J. Biol. Chem.* **244**, 2799, (1969).
61. Hilborn J. C., Anastassiadis P. A., *Anal. Biochem.* **39**, 88, (1971).
62. Hilborn J. C., Anastassiadis P. A., *Biochim. Biophys. Acta* **215**, 57, (1970).
63. Hirano S., Onodera K., *Life Sci.* **6**, 2177, (1967).
64. Hoffman P., Linker A., Sampson P., Meyer K., *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 658, (1957).
65. Hoffman P., Meyer K., *Fed. Proc.* **21**, 1064, (1962).
66. Hollman E. P., Mier P. W., Van de Staak W. J., Urselmann E., Warndorff J. A., *Brit. J. Dermat.* **85**, 421, (1971).
67. Hopwood J. J., Robinson H. C., *Proc. Aust. Biochem. Soc.* **4**, 91, (1971).
68. Hovingh P., Linker A., *J. Biol. Chem.* **245**, 6170, (1970).
69. Hovner A. A., *J. Biol. Chem.* **246**, 231, (1971).
70. Hutterer F., *Biochim. Biophys. Acta* **115**, 312, (1966).
71. Inoue G., Sawada T., Funkunaga Y., Yoshikawa M., *Gerontologia* **16**, 261, (1970).
72. Jackson D. S., *Biochem. J.* **54**, 638, (1953).
73. Jackson D. S., Bentley J. P. w *Treatise on Collagen*, red. Gould B. J., Academic Press, New York, 1968, tom 2A, str. 189.
74. Jackson R. T., Arihood S. A., *Ann. Otolaryngol. Rhinol. Laryngol.* **80**, 586, (1971).
75. Jaques L. B., Ballieux R. E., Dietrich C. P., Kavanagh L. W., *Can J. Physiol. Pharmacol.* **46**, 351, (1968).
76. Jeanloz R. W., *Arthritis Rheum.* **3**, 233, (1960).
77. Jeffrey P. L., Rienitis K. G., *Aust. J. Biol. Sci.* **25**, 115, (1972).
78. Kabayashi S., *Inter. Rev. Cytolog.* **30**, 257, (1971).
79. Kaplan D., Meyer K., *J. Clin. Invest.* **41**, 743, (1962).
80. Kaplan D., Meyer K., *Nature* **183**, 1267, (1959).
81. Kaplan D., Meyer K., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **105**, 78, (1960).
82. Katzman R. L., Jeanloz W. R., *Biochim. Biophys. Acta* **220**, 516, (1970).
83. Kawiak J., *Postępy Biochem.* **10**, 143, (1964).
84. Kelly J. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **55**, 130, (1955).
85. Kimoto E., Akiyama K., Noguchi Y., *J. Biochem.* **66**, 369, (1969).
86. Kirk J. E., *Circulation* **20**, 975, (1959).
87. Kleine T. O., Hilz H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349**, 1027, (1968).
88. Kleine T. O., Kirsing H. J., Hilz H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 479, (1971).
89. Klynstra F. B., Böttcher C. Y., Van Melsen J. A., Van der Laan E. J., *J. Atheroscler. Res.* **7**, 301, (1967).
90. Knecht J. Cifonelli J. A., Dorfman A., *J. Biol. Chem.* **242**, 4652, (1967).
91. Kondo K., Seno N., Anno K., *Biochim. Biophys. Acta* **244**, 513, (1971).
92. Kopeć M., Węgrzynowicz Z., Latałło Z. S., *Thromb. Diath. Hemorrhagica*, suppl. **40**, 255, (1970).
93. Kresse H., Buddecke E., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **351**, 151, (1970).
94. Kresse H., Heidel H., Buddecke E., *Eur. J. Biochem.* **22**, 557, (1971).
95. Kumar V., Berenson G. S., Ruiz H., Dalfers E. Z., Strong J. P., *J. Atheroscler. Res.* **7**, 573, (1967).
96. Lash J. W., Whitehouse M. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **90**, 159, (1960).
97. Laurent T. C., *Fed. Proc.* **25**, 1128, (1966).
98. Leach R. M. Jr, *Fed. Proc.* **30**, 991, (1971).
99. Leach R. M. Jr, Muenster A. M., Woen E., *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, 22, (1969).

100. Lindahl U., *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 361, (1966).
101. Lindahl U., Axelsson O., *J. Biol. Chem.* **246**, 74, (1971).
102. Lindahl U., Bäckström G., Malmström A., Fransson L. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 985, (1967).
103. Lindahl U., Wasteson A. w The Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, red. Balazs E. A., Academic Press, New York, 1970, str. 867.
104. Linker A., w Methods in Enzymology, red. Neufeld E. F., Ginsburg V., Academic Press, New York, 1966, tom 8, str. 650.
105. Linker A., Hovingh P., *Biochim. Biophys. Acta* **165**, 89, (1968).
106. Linker A., Hovingh P., *Biochemistry* **11**, 563, (1972).
107. Loewi G., Meyer K., *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 453, (1958).
108. Lombardi V., Guidi G., Scardigli F., Zini F., *J. Gerontol.* **9**, 1143, (1961).
109. Lorack-Stone A., *Biopolimers* **3**, 617, (1965).
110. Luscombe M., Phelps C. F., *Biochem. J.* **103**, 103, (1967).
111. Malmström A., Fransson L. A., *Eur. J. Biochem.* **18**, 431, (1971).
112. Mankinen H. J., Lippiello L., *J. Clin. Invest.* **50**, 1712, (1971).
113. Manley G., *Brit. J. Exp. Pathol.* **56**, 125, (1965).
114. Manley G., Hawksworth J., *Nature* **206**, 1152, (1965).
115. Marbet R., Winterstein A., *Helv. Chim. Acta* **34**, 2311, (1951).
116. Margolis R. U., Atherton D. A., *Biochim. Biophys. Acta* **273**, 368, (1972).
117. Margolis R. U., Margolis R. K., *Biochim. Biophys. Acta* **264**, 426, (1972).
118. Maroudas A., *Biophys. J.* **8**, 575, (1968).
119. Martinez R. J., Wolfe J. B., Nahoda H. Y., *J. Biol. Chem.* **234**, 2236, (1959)
120. Matalon R., Dorfman A., *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 179, (1968).
121. Mathews M. B., *Biochem. J.* **96**, 710, (1965).
122. Mathews M. B., *Biol. Rev.* **42**, 499, (1967).
123. Mathews M. B., Cifonelli J. A., *J. Biol. Chem.* **240**, 4140, (1965).
124. Mathews M. B., Decker L., *Biochem. J.* **109**, 517, (1968).
125. Mathews M. B., Decker L., *Biochim. Biophys. Acta* **244**, 30, (1971).
126. Mathews M. B., Lozaityte I., *Arch. Biochem. Biophys.* **74**, 158, (1958).
127. Matsumura Y., Torii S., White H. J., Tanaka K., *J. Gerontol.* **26**, 386, (1971).
128. Meazan E., Davidson E. A., *J. Biol. Chem.* **242**, 4956, (1967).
129. Meyer K., *Am. J. Med.* **47**, 664, (1969).
130. Meyer K., Linker A., Davidson E. A., Weissmann B., *J. Biol. Chem.* **205**, 611, (1953).
131. Mier P. D., Wood M., *Clin. Chim. Acta* **24**, 105, (1969).
132. Miller Z. B., Waldman J., McLean F. C., *J. Exp. Med.* **95**, 497, (1952).
133. Muir A., *Am. J. Med.* **47**, 673, (1969).
134. Muir H., *Biochem. J.* **69**, 195, (1958).
135. Murata K., Oshima Y., *Atherosclerosis* **14**, 121, (1971).
136. Nakamura M., Torii S., Yatsuki K., Kikuchi Y., Yamamoto H., *Atherosclerosis* **13**, 185, (1971).
137. Nakamura T., Tokita K., Tateno S., Kotoku T., Ohba T., *J. Atheroscler. Res.* **8**, 891, (1968).
138. Olssen I., *Biochim. Biophys. Acta* **177**, 24, (1969).
139. Olssen I., *Exp. Cell Res.* **54**, 318, (1969).
140. Oneson J., Zacharias J., *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 271, (1960).
141. Partridge S. M., Davies H. F., Adair G. S., *Biochem. J.* **79**, 15, (1961).
142. Picard J., Gardais A., Dubernanel I., *Nature* **202**, 1213, (1964).

143. Pita C. J., Cuervol L. A., Madruga J. E., Muller F. J., Howell D. S., *J. Clin. Invest.* **49**, 2188, (1970).
144. Praus R., Brettschneider J., *Ophthal. Res.* **2**, 367, (1971).
145. Robinson H. C., *Biochem J.* **113**, 543, (1969).
146. Robinson H. C., Telser A., Dorfman A., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **56**, 1859, (1966).
147. Roden L., Armand G., *J. Biol. Chem.* **241**, 2113, (1966).
148. Roden L., Smith R., *J. Biol. Chem.* **241**, 5949, (1966).
149. Rokosova-Cmucalova B., Bentley J. P., *Biochem. Pharmacol. suppl.* **315**, (1968).
150. Rosenberg L., Hellman W., Kleinschmidt A. K., *J. Biol. Chem.* **245**, 4123, (1970).
151. Rosenberg L., Johnson B., Schubert M., *J. Clin. Invest.* **48**, 543, (1969).
152. Saigo K., Egami F., *J. Neurochem.* **17**, 633, (1970).
153. Saito H., Uzman B. G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 723, (1971).
154. Sato C. S., Gyorkey F., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **140**, 79, (1972).
155. Schiller S., *Ann. Rev. Physiol.* **28**, 137, (1966).
156. Schmidt M., Dmochowski A., *Acta Biochim. Polon.* **11**, 349, (1964).
157. Schmidt M., Dmochowski A., Wierzbowska B., *Biochim. Biophys. Acta* **117**, 258, (1966).
158. Schorach C. J., Lovell D., Curran R. C., *Brit. J. Exp. Pathol.* **49**, 574, (1968).
159. Seno N., Meyer K., Anderson B., Hoffman P., *J. Biol. Chem.* **240**, 1005, (1965).
160. Seppälä P. O., Kärkkäinen J., Lehtonen A., Mäkisara P., *Clin. Chim. Acta* **36**, 549, (1972).
161. Silbert J. E. w *Glucuronic Acid*. red. Dalton, Academic Press, New York, 1966, str. 385.
162. Silbert J. E., *J. Biol. Chem.* **239**, 1310, (1964).
163. Silbert J. E., *J. Biol. Chem.* **242**, 5133, (1967).
164. Silbert J. E., DeLuca S., *J. Biol. Chem.* **244**, 876, (1969).
165. Silbert J. E., DeLuca S., *J. Biol. Chem.* **245**, 1506, (1970).
166. Simunek Z., Muir H., *Biochem. J.* **126**, 515, (1972).
167. Smith W. S., Kreby G. P., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **103**, 562, (1960).
168. Sobel H. w *Advances in Gerontological Research*, red. Strehler B. L., Academic Press, New York, 1967.
169. Sobel A. E., Burger M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **87**, 7, (1954).
170. Srinivasan S. R., Dolan P., Radhakrishnamurthy B., Berenson G. S., *Preparative Biochem.* **2**, 83, (1972).
171. Srinivasan S. R., Lopez A., Radhakrishnamurthy B., Berenson G. S., *Atherosclerosis* **12**, 321, (1970).
172. Stone A. L., *Biopolimers* **3**, 617, (1965).
173. Stoolmiller A., Dorfman A. w *Comprehensive Biochemistry*, red. Florkin M., Stotz E. H., Elsevier, Amsterdam, 1969, tom 17, str. 241.
174. Suzuki S., Saito H., Yamagata I., Anno K., Seno N., Kawai Y., Furuhashi T., *J. Biol. Chem.* **243**, 1543, (1968).
175. Suzuki S., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.* **235**, 257, (1960).
176. Svejcar J., Robertson W. B., *Anal. Biochem.* **18**, 333, (1967).
177. Telser A., Robinson H. C., Dorfman A., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **56**, 1310, (1966).
178. Thunell S., Antonopoulos C. A., Gardell S., *J. Atheroscler. Res.* **7**, 283, (1967).

179. Tomaszewski J., Hanzlik J., Łopatyński J., Gilatowska B., *Pol. Arch. Med. Wewn.* **47**, 51, (1971).
180. Toole B. P., Lowether D. A., *Arch. Biochem.* **128**, 567, (1968).
181. Tsiganos C. P., Hardingham T. E., Muir H., *Biochim. Biophys. Acta* **229**, 529, (1971).
182. Tsiganos C. P., Hardingham T. E., Muir H., *Biochem. J.* **128**, 121p, (1972).
183. Tsiganos C. P., Muir H. w Abstract of 4th Meeting of the FEBS, Nr 490, str. 123, 1968.
184. Tsiganos C. P., Muir H., *Biochem. J.* **104**, 260, (1967).
185. Tsiganos C. P., Muir H., *Z. Physiol. Chem.* **350**, 661, (1969).
186. Vardi P. D., Griffiths C., *Biochim. Biophys. Acta* **230**, 248, (1971).
187. Vejleus L., *Calic. Tiss. Res.* **9**, 54, (1972).
188. Vittur F., Pugliarello M. C., Bernard B., *Biochim. Biophys. Acta* **257**, 389, (1972).
189. Wasteson A., *Biochem. J.* **122**, 477, (1971).
190. Wasteson A., Obrink B., *Biochim. Biophys. Acta* **170**, 201, (1968).
191. Wasteson A., Wessler E., *Biochim. Biophys. Acta* **252**, 13, (1971).
192. Weissman G., Spilberg L., *Arthritis Rheumat.* **11**, 162, (1968).
193. Wellauer P., Wyler T., Buddecke E., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1043, (1972).
194. Wolfrom M. L., Honda S., Wang P. Y., *Carbohydr. Res.* **10**, 259, (1969).
195. Young I. J., Custod J. T., *J. Neurochem.* **19**, 923, (1972).

STANISŁAWA KAROLCZYK-KOSTUCH *, MARIA ZUBEK **

Znaczenie rozerwania wiązań dwusiarczkowych w procesie inaktywacji enzymów i hormonów pod wpływem promieniowania ultrafioletowego

Role of Disulfide Bond Disruption in Ultraviolet Inactivation of Enzymes and Hormones

Probable mechanisms of inactivation of some cystine containing enzymes and hormones under UV-irradiation are reviewed.

Zdaniem wielu autorów rozerwanie wiązania dwusiarczkowego odgrywa zasadniczą rolę w procesie inaktywacji niektórych enzymów w czasie naświetlania, zwłaszcza promieniowaniem ultrafioletowym (7, 8, 10, 12, 29, 30, 40, 54, 58, 64, 66, 70). Inni autorzy modyfikacji reszt aminokwasów aromatycznych przypisują podstawową rolę w pierwotnym procesie inaktywacji (5, 44). Zwiększenie wydajności kwantowej rozkładu reszty cystynowej enzymu w obecności tryptofanu i tyrozyny tłumaczy przeniesieniem energii z grup chromoforowych tych aminokwasów na cystynę.

I. Korelacja między rozerwaniem wiązań dwusiarczkowych cystyny a inaktywacją enzymu

Badania fotochemicznej inaktywacji enzymów prowadzone w wielu laboratoriach wskazywały na związek między obniżeniem biologicznej aktywności enzymu a wzrostem liczby grup sufhydrylowych uwalnianych w czasie naświetlania (6, 7, 8, 9, 10, 44, 54). Nie wszyscy jednak autorzy wyciągali stąd wniosek, iż rozerwanie wiązania —S—S— jest pierwotnym procesem inaktywacji.

Według Mc Larena enzym ulega inaktywacji, gdy którykolwiek z jego komponentów aminokwasowych traci swą identyczność chemiczną,

* Mgr, Instytut Chemii Ogólnej i Technologii Rolnej, Akademia Rolnicza, Kraków.

** Mgr, Instytut Chemii Ogólnej i Technologii Rolnej, Akademia Rolnicza, Kraków.

a wydajność kwantowa procesu inaktywacji może być z góry określona drogą sumowania wydajności kwantowych odniesionych do poszczególnych reszt aminokwasowych (54, 56).

W przypadku jednak białek zawierających cystynę pogląd ten okazał się niesłuszny (30). Wykazano bowiem, że kwant promieniowania absorbowany bezpośrednio przez cystynę może być dziesięć razy tak efektywny w obniżeniu aktywności jak kwant absorbowany bezpośrednio przez inne aminokwasy wchodzące w skład enzymu (66). Stwierdzono ponadto, że nie wszystkie reszty cystynowe obecne w białkach są fotochemicznie równocenne (11, 40, 39), co potwierdziły doświadczenia przeprowadzone na związkach modelowych (28, 32). Znakowanie wolnych grup -SH na drodze reakcji z kwasem jodoctowym- C^{14} pozwoliło stwierdzić, że spośród czterech wiązań dwusiarczkowych w cząsteczce rybonukleazy rozerwaniu uległo tylko jedno lub dwa (8). Nasunęło się więc przypuszczenie, iż zmiany fotochemiczne zachodzące w poszczególnych resztach cystynowych nie są przypadkowe lecz ściśle określone.

Wzrost czułości fotochemicznej niektórych reszt cystynowych w białkach próbowano wyjaśnić obecnością reszty aminokwasu aromatycznego w bezpośrednim sąsiedztwie reszty cystynowej. W białkach zawierających tryptofan wydajność kwantowa rozerwania cystyny może być ponad pięć razy większa niż dla wolnej cystyny. D o s e i wsp. tłumaczyli to oddziaływaniem na cystynę wzbudzonego tryptofanu, który miałby spełniać rolę donora elektronu (30). Hipoteza ta postawiona została w oparciu o fakt, iż liczba grup -SH utworzonych przez rozerwanie cystyny jest około cztery razy większa w przypadku białek zawierających tryptofan (lizozym i trypsyna) niż w rybonukleazie i insulinie. Rolę wzbudzonego tryptofanu jako donora elektronu potwierdza jego oddziaływanie z tlenem (24, 61). Pod nieobecność tlenu cystyna może spełniać rolę akceptową elektronu. W białkach zawierających tryptofan energia wzbudzenia innych aminokwasów aromatycznych jest przynajmniej częściowo przenoszona na cząsteczki tryptofanu, które następnie mogą reagować wtórnie z sąsiednimi resztami cystyny (30). Dalsze prace D o s e potwierdzały wzrost wydajności kwantowej rozkładu cystyny w obecności tryptofanu. Autor naświetlał promieniowaniem o długości fali 254nm roztwór wolnej cystyny z dodatkiem tryptofanu (31). Otrzymane wyniki obrazuje tabela 1.

Wydajność kwantowa całkowitego rozpadu cystyny ϕ_{S-S} (tabela 1, kolumna 2) i zmniejszenie stężenia cystyny spowodowane redukcją wiązania S-S $\phi_{S-S(\text{red})}$ (kolumna 3), są obliczone w oparciu o liczbę kwantów zaabsorbowaną przez całkowitą ilość cystyny. Jak widać wzrost wydajności rozkładu cystyny w obecności tryptofanu jest głównie spowodowany zwiększeniem się ilości zredukowanych wiązań S-S. Jeśli wzrost wydajności rozkładu cystyny, obserwowany w przypadku dodania tryptofanu do roztworu cystyny jest związany z działaniem kwantu pierwotnie absorbowanego przez układ aromatyczny tryptofanu (układy aromatyczne posiadają dużą ab-

Tabela 1

Wydajność kwantowa dla rozpadu cystyny w obecności i nieobecności tryptofanu wg Dose (31).

| 1 | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--------------------|-----------|--------------|----------------------|-----------------------------------|--------|----------|-----------|-------|
| $10^{-3} \times M$ | | ϕ_{S-S} | $\phi_{S-S}^{(red)}$ | $\phi_{S-S} - \phi_{S-S}^{(red)}$ | ϕ | ϕ_A | f_{S-S} | f_A |
| Cystyna | Tryptofan | | | | | | | |
| 0,125—1,25 | | 0,12 | 0,04 | 0,08 | 0,010 | 0,015 | 1,00 | 0,93 |
| 1,25 | 1,5 | 0,25 | 0,15 | 0,10 | 0,007 | 0,013 | 0,07 | 0,93 |
| 0,625 | 0,75 | 0,21 | 0,12 | 0,09 | 0,002 | 0,008 | 0,07 | 0,93 |
| 0,125 | 0,15 | 0,15 | 0,06 | 0,09 | | 0,006 | | 1,00 |
| | 0,15—0,75 | | | | | | | |

sorpcję w paśmie 254nm), wydajność tego kwantu w rozkładzie cystyny można przedstawić równaniem:

$$\Phi = \frac{f_{s-s}(\phi_{s-s} - 0,12)}{f_A}$$

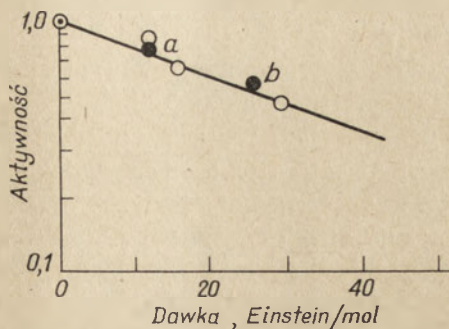
f_{s-s} i f_A są to ilości światła zaabsorbowanego przez cystynę i aromatyczny aminokwas (kolumna 7i 8), Φ_{s-s} jest to wydajność kwantowa rozkładu oystyny, 0,12 — wydajność kwantowa rozpadu wolnej cystyny.

Dodatek tyrozyny do naświetlanego roztworu cystyny powoduje wzrost rozkładu cystyny o około 20%. Natomiast dodatek fenyloalaniny, również posiadającej pierścień aromatyczny, nie wpływa w sposób zauważalny na fotochemiczną degradację cystyny (31).

Ciekawym uzupełnieniem hipotezy proponowanej przez Dose są wnioski wypływające z badań Grossweinerja i Usui (44). Doświadczenie prowadzone techniką fotolizy błyskowej z wodnym roztworem lizozymu wykazały, że początkowymi produktami fotochemicznego rozkładu tego enzymu są: hydratowany elektron e_{aq}^- , produkt utlenienia reszty tryptofanowej Try^+ oraz związek addycyjny elektronu z mostkiem dwusiarczkowym ($-S-S-$). Porównanie początkowej wydajności Try^+ w lizozymie i w mieszaninie odpowiadających mu wolnych aminokwasów wykazało, że reszta tryptofanowa w enzymie jest fotolitycznie jonizowana z wydajnością około 5 razy niższą niż wodny roztwór wolnego tryptofanu. Autorzy wnioskowali więc, że spośród sześciu reszt tryptofanowych zawartych w tym enzymie, tylko jedna lub najwyżej dwie dostarczają elektronu. Ponieważ hydratacja odszczepionego elektronu możliwa jest tylko wtedy, kiedy fotochemicznie reaktywne reszty tryptofanowe znajdują się w bezpośrednim kontakcie z wodą, w oparciu o znajomość strukturalnej budowy lizozymu (16, 17), można przypuszczać, iż fotomodyfikacji ulegają reszty: Try-62, Try-63 i Try-123. Reszty 62 i 63 znajdują się w aktywnym centrum enzymu, fotoliza zaś choćby jednej z nich spowoduje inaktywację enzymu. W takim przypadku przyłączenie elektronu do mostków dwusiarczkowych reszt cystynowych nie byłoby pierwotną przyczyną inaktywacji lizozymu.

Gdyby jednak założyć, że przyłączenie elektronu do mostków dwusiarczkowych reszt cystynowych jest pierwotną przyczyną inaktywacji enzymu, wówczas wydajność kwantowa inaktywacji winna być zależna od obecności wprowadzonych do środowiska reakcji substancji wychwytyjących elektrony, takich jak tlen lub jony wodorowe. Doświadczenia Grossweinerja i Usui nie wykazały takiej zależności w przypadku naświetlania lizozymu (rys. 1.), co jest argumentem przemawiającym za tym, iż fotolityczna modyfikacja reszt tryptofanowych jest pierwotnym procesem fotoinaktywacji lizozymu. Wniosek ten pozostaje w zgodzie z obserwacją braku inaktywacji enzymu pod wpływem promieniowania jonizacyjnego, którego jedynym efektem było przyłączenie elektronu do wiązania $-S-S-$ (3). Przykład lizozymu może nie być typowy dla procesu inaktywacji in-

nych enzymów, ze względu na wysoką absorpcję promieniowania przez chromofory (sześć reszt tryptofanowych), z których połowa leży w aktywnym centrum enzymu.



Rys. 1. Inaktywacja 17 μ M roztworu lizozymu przy naświetlaniu lampą ksenonową (44); ● — pH 9,3 (roztwór nasycony powietrzem), o a — pH 3,2 (roztwór odpowietrzony), o b — pH 9,3 (roztwór odpowietrzony)

W rozważaniach nad fotochemiczną inaktywacją enzymów zastanawiano się, jak wpływa zniszczenie drugorzędowej i trzeciorzędowej struktury białka na wydajność kwantową procesu inaktywacji (37). Badając efekt działania czynników denaturujących białka na wydajność kwantową procesu inaktywacji trypsyny przez promieniowanie nie uzyskano wyników jednoznacznych (8, 30, 37, 38, 59). Zaproponowano zatem dwa prawdopodobne mechanizmy inaktywacji trypsyny (37, 38): jeden zależny od konformacji białka i związany z absorpcją fotonów przez reszty cystynowe; drugi od konformacji niezależny, związany z absorpcją fotonów przez reszty aromatyczne.

II. Specyficzne działanie promieniowania UV

W ogólnych rozważaniach nad inaktywacją enzymów pod wpływem promieniowania UV, promieniowania jonizacyjnego, a także pod wpływem ogrzewania, Augenstein (7) rozpatruje sześć modeli mechanizmów reakcji. Celowym wydaje się zatem porównanie proponowanego udziału wiązań dwusiarczkowych na tle innych reakcji.

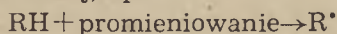
Model I. Inaktywację enzymu wywołuje każda wyraźna zmiana zachodząca w którymkolwiek z łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych, wchodzących w skład aktywnego centrum.

Model II. Proces inaktywacji może być wywołany rozerwaniem jednego lub kilku typów wiązań; energia wzbudzenia ulegająca przeniesieniu wzdłuż łańcucha polipeptydowego może powodować przypadkowe rozerwanie wiązań kowalencyjnych. Energia odpowiadająca liczbie rozerwanych

jednocześnie wiązań wodorowych może pozostawać w pewnej korelacji z liczbą wiązań kowalencyjnych odtwarzających się, albo z tendencją rozdzielenia się rozerwanych łańcuchów polipeptydowych. Inaktywacja fotochemiczna enzymu może być już wywołana energią kwantu promieniowania UV wynoszącą około 5eV, zniszczenie wiązań dwusiarczkowych odgrywa istotną rolę.

Model III. Tworzenie się wolnych rodników może być ważnym czynnikiem w oddziaływaniu promieniowania na białka.

Howard - Flanders (47) wyraża pogląd, że rodniki R' tworzące się w wyniku odszczepienia atomowego wodoru będą w pewnych wypadkach zdolne restytuować aktywność biologiczną cząsteczki, dopóki ich reakcje z dwurodnikami takimi jak O₂ lub NO nie uczynią przemiany nieodwracalnej, np.



Rodnikowi R' przypisuje się przy tym rolę taką samą jaką spełniałby niesparowany elektron atomu węgla na jednym z orbitali molekularnych w cząsteczce. Interesującą jest interpretacja Blumenfelda i Kalmansona (18, 19), która przyjmuje lokalizację wolnego elektronu na wiązaniu —S—S— w białkach z utworzeniem rodnika R'.

Model IV. Promieniowanie jonizujące wywołuje zdaniem Platzmana i Francka (62) nie tylko zniszczenie słabych oddziaływań elektrostatycznych (takich jak wiązania wodorowe) ale znaczną degradację struktury cząsteczki.

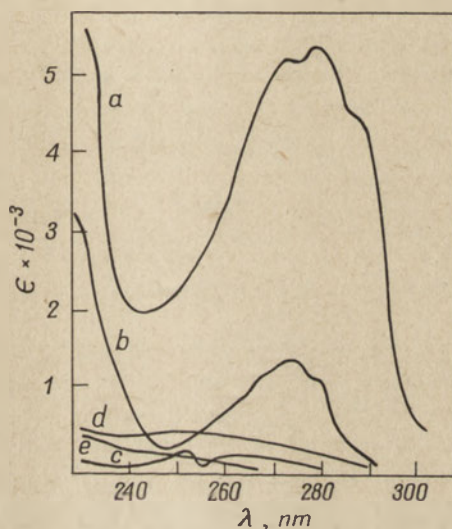
Model V. Inaktywacja enzymu jest rezultatem kolejnych i specyficznych zmian w konformacji cząsteczki, zachodzących prawdopodobnie w obrębie słabych wiązań dwusiarczkowych oraz innych wiązań wewnątrzcząsteczkowych, decydujących o utrzymaniu charakterystycznej topografii aktywnego centrum cząsteczki.

Rozerwanie wszystkich tych wiązań w aktywnym centrum jest przyczyną nieodwracalnej inaktywacji enzymu, podczas gdy zniszczenie tylko części z nich może mieć charakter odwracalny, aktywność enzymu może zostać przywrócona w wyniku procesów odtwarzających pierwotną strukturę. Model ten przypisuje szczególną rolę wiązaniom —S—S—, ale w odróżnieniu od modelu IV-tego bynajmniej nie zakłada „totalnego” udziału tych wiązań w procesie inaktywacji, chyba że wszystkie reszty cystynowe posiadają istotne znaczenie dla aktywności enzymu.

Model VI. Model ten odnosi się głównie do procesów radiolizy białek. Mason (55) wyraża pogląd, że wzbudzone stany trypletowe jako dłużej „żyjące” niż inne stany są istotnymi stanami pośrednimi w procesie inaktywacji enzymów. Konfiguracja białka odpowiadająca tym stanom wzbudzonym może jego zdaniem być uważana jako forma izomeryczna, bądź tautomeryczna pierwotnej cząsteczki; stąd osiągnięcie przez cząsteczkę

wzbudzonych stanów trypletowych może prowadzić do zmian w strukturze wtórnej, włączając w to zmiany decydujące o inaktywacji.

Spośród promieniowań różnego typu najbardziej specyficznie działa promieniowanie ultrafioletowe. W przypadku naświetlania wodnych rozтворów enzymów promieniowaniem X, inaktywacja spowodowana jest bowiem praktycznie działaniem pośrednim. Rodniki powstałe z wody pod wpływem tego promieniowania atakują cząsteczkę enzymu (63). W czasie naświetlania promieniowaniem UV, o odpowiednio dobranej długości fali, energia jest bezpośrednio absorbowana przez cząsteczkę białka. Absorpcja białek w paśmie 300 do 250nm jest zasadniczo taka sama jak składowych aminokwasów (wiązanie peptydowe tylko w niewielkim procencie absorbuje promieniowanie w tym zakresie) i jest spowodowana obecnością aminokwasów aromatycznych i cystyny, ponieważ grupami chromoforowymi są tu układy aromatyczne i wiązanie —S—S— (15, 20, 46).



Rys. 2. Widma absorpcyjne: tryptofanu (a), tyrozyny (b), fenyloalaniny (c), cystyny (d), cysteiny (e) przy neutralnym pH wg McLarena i Shugara (60).

Rysunek 2 przedstawia widma absorpcyjne tryptofanu, tyrozyny, fenyloalaniny, cysteiny i cystyny przy neutralnym pH (60).

III. Wygaszanie fluorescencji białek przez wiązania dwusiarczkowe

Fluorescencja białek związana jest z obecnością reszt tryptofanowych i tyrozynowych w cząsteczce białka, przy czym udział tryptofanu w widmie fluorescencyjnym białka jest dominujący (72, 22, 52).

Obecność grup dwusiarczkowych w białku powoduje wygaszenie fluorescencji białka (25, 68, 71). Spostrzeżenia te sugerowały, iż następuje przeniesienie energii z pierścienia aromatycznego tyrozyny lub tryptofanu na atom siarki. Problem ten rozpatrywał C o w g i l l na szeregu związków modelowych i peptydów (26, 27). W serii doświadczeń z insuliną i rybonukleazą badał zmiany fluorescencji pochodzącej tylko od reszty tyrozynowej. Redukcja wiązań dwusiarczkowych w rybonukleazie i insulinie powodowała wzrost fluorescencji, przy czym zmiana fluorescencji była większa w przypadku rybonukleazy niż insuliny; tłumaczyć to można tym, że rybonukleaza w porównaniu z insuliną posiada więcej reszt tyrozynowych położonych w sąsiedztwie wiązań dwusiarczkowych.

Badając widmo fluorescencyjne oksytocyny C o w g i l l stwierdził, że nie zmienia się ono po zredukowaniu wiązania —S—S—, natomiast fluorescencja znacznie wzrasta po całkowitej hydrolizie oksytocyny (pochodzi od wolnej tyrozyny) (26). Nasuwa się więc wniosek, iż w czasie wzbudzenia oksytocyny nie zachodzi przeniesienie energii z reszty tyrozynowej na sąsiednie wiązanie dwusiarczkowe.

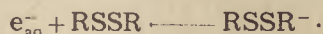
Badania widm fluorescencyjnych białek wykazały również, że widmo fluorescencyjne reszty tyrozynowej jest prawie takie samo w większości białek. Natomiast fluorescencja reszty tryptofanowej jest różna w różnych białkach, a ponadto zależy wyraźnie od środowiska, między innymi od stałej dielektrycznej rozpuszczalnika (69). Na podstawie tych obserwacji zaczęto przypuszczać, iż może zachodzić przeniesienie energii elektronowej zaabsorbowanej przez resztę tyrozynową na reszty tryptofanowe. Celem udowodnienia tego L o n g w o r t h (53) przeprowadził doświadczenia z modelowym dwupeptydem (L-tryptofanylo-L-tyrozyną) oraz białkiem rybonukleazą T_1 . Do wzbudzenia użył promieniowania o długości fali 278 nm i 295nm. Światło o długości fali 278nm absorbują zarówno reszty tryptofanowe jak i tyrozynowe, natomiast przy 295nm absorpcja energii świetlnej przez reszty tyrozynowe jest znikomo mała. Ponieważ widma fluorescencyjne enzymu rybonukleazy T_1 zarówno po wzbudzeniu światłem o długości fali 278nm jak i 295nm były identyczne, L o n g w o r t h wnioskuje, że emisja promieniowania pochodzi jedynie od reszty tryptofanowej tego białka (osiem reszt tyrozynowych, jedna reszta tryptofanowa). Natomiast identyczność widma wzbudzenia fluorescencyjnego i widma absorpcyjnego rybonukleazy T_1 pozwalała przypuszczać, że energia absorbowana przez reszty tyrozynowe ulega przeniesieniu na resztę tryptofanową. Podobny wniosek nasuwały wyniki badań fluorescencji modelowego dwupeptydu L-tryptofanylo-L-tyrozyny. Również i w tym przypadku widmo wzbudzenia fluorescencyjnego jest identyczne z widmem absorpcyjnym tego peptydu. Porównanie widm fosforescencji i fluorescencji tryptofanylotyrozyny oraz rybonukleazy T_1 wskazuje, że przeniesienie energii zachodzi od stanu singletowego tyrozyny na resztę tryptofanową (53). L o n g w o r t h zaobserwował także pewne oddziaływanie między stanem trypletowym ty-

rozyny a pobliskim wiązaniem dwusiarczkowym w niektórych enzymach i peptydach. Analiza widm fluorescencji i fosforescencji L-cystynylo-bis-L-tyrozyny, rybonukleazy, a także oksytocyny pozwala przypuszczać, że bliskie sąsiedztwo wiązania —S—S— utrudnia przejście reszt tyrozyny do stanu trypletowego.

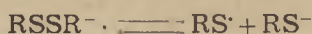
IV. Tworzenie się rodników w czasie naświetlania promieniowaniem UV aminokwasów i enzymów zawierających siarkę

Badania widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego pozwoliło stwierdzić powstawanie rodników, w których niesparowany elektron zlokalizowany był na atomie siarki (34, 35, 50, 51). W czasie naświetlania krystalicznej cystyny promieniowaniem UV w temperaturze 77°K stwierdza się asymetryczny sygnał EPR, którego struktura nie ulega istotnym zmianom po doprowadzeniu próbki do warunków pokojowych i ponownym oziębieniu do temperatury ciekłego azotu (13). Wnioskuje się stąd o dużej trwałości jono-rodnika $R-(S...S)^+-R$ powstałego przez dyslokację jednego z wolnych elektronów siarki. Z cysteiny i homocysteiny w tych samych warunkach powstaje rodnik $R-S^{*+}-H$, który w temperaturze pokojowej przekształca się w dwusiarczkowy rodnik cystyny. Przekształcenie takie może przebiegać według następującego schematu: przy podwyższeniu temperatury rodnik $R-S^{*+}-H$ odszczepia atom wodoru, po czym reaguje z cząsteczką $R-SH$ z uwolnieniem następnego atomu wodoru tworząc dwusiarczkowy jono-rodnik $R-(S...S)^+-R$. W czasie naświetlania cystyny i cysteiny zaobserwowano również tworzenie wolnych rodników typu $R-S^*$ (34, 35, 49, 50, 51). Naświetlając suche próbki insuliny, rybonukleazy, lizozymu w temperaturze pokojowej i temperaturach niższych, stwierdzono powstawanie rodników w obrębie reszt aminokwasów siarkowych wchodzących w skład tych białek (13, 36, 50, 51). G o r d y (39) stwierdził duże podobieństwo widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego cystyny z widmami otrzymanymi z napromienionych białek prostych, co nie może być wyjaśnione procesem rozerwania struktury polipeptydowej, lecz zlokalizowania niesparowanego elektronu przy atomie siarki. Wyraził także pogląd, że elektrony niesparowane nie są trwale zlokalizowane na rodnikach cystynowych pojedynczych reszt aminokwasowych, lecz mogą ulegać delokalizacji wzdłuż łańcucha polipeptydowego.

Innego typu rodniki powstają w czasie reakcji fotolizy błyskowej wodnych roztworów cystyny w obecności aminokwasów aromatycznych. Aminokwasy te uwalniają hydratowane elektrony e^-_{aq} (41, 42, 45), które mogą reagować z cystyną (1, 2, 43), tworząc jono-rodniki $RSSR^-$:



Rodniki tego typu pozostają w stanie równowagi z anionami cysteiny:



Odwracalny charakter tej reakcji wskazuje, że cysteina odgrywa w niej rolę stabilizatora rodników $\text{RSSR}^- \cdot$.

Również w czasie naświetlania enzymów światłem ultrafioletowym zanotowano powstawanie rodników (4, 14, 51) przy czym zarówno rodzaj jak i liczba rodników powstających w czasie naświetlania zależna jest od długości fali użytego promieniowania (5). Powstawaniu rodników towarzyszyła inaktywacja enzymu (33, 57), co więcej stwierdzono także występowanie liniowej zależności między liczbą wolnych rodników a stopniem inaktywacji enzymu (21, 48).

Androes i wsp. (5) w oparciu o badanie powstawania wolnych rodników w enzymach oraz związkach modelowych napromienianych światłem o długości fali $\lambda \geq 250\text{nm}$ w temperaturze 77°K , zaproponowali trzy mechanizmy tworzenia się rodników:

- 1) mechanizm oparty na absorpcji jednego fotonu dla utworzenia jednego rodnika
- 2) mechanizm oparty na akcji dwóch fotonów powodujących powstawanie jednego rodnika
- 3) powstawanie rodnika wymagające działania więcej niż dwóch fotonów.

Tworzenie się rodnika po zaabsorbowaniu jednego fotonu może nastąpić trzema drogami:

- a) bezpośrednio tworzenie się rodnika w absorbującej reszcie chromoforowej
- b) przeniesienie energii (według Foerstera) z absorbującego chromoforu do reszt o niższych poziomach energetycznych stanów wzbudzonych i następujące po tym utworzenie rodników w sensybilizowanych resztach aminokwasowych
- c) przeniesienie energii z absorbującego chromoforu lub z sensybilizowanej reszty aminokwasowej na resztę sąsiednią, co prowadzi do powstania rodnika w łańcuchu polipeptydowym.

W białkach zawierających chromofory z długo żyjącymi stanami trypletowymi, a w których aminokwasy aromatyczne nie znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie cystyny wolny rodnik powstawać może w efekcie akcji dwóch fotonów (mechanizm drugi). Zdaniem Androesa i wsp. energia absorbowana zarówno przez resztę tyrozynową jak i tryptofanową prowadzi do powstania tryptofanu w stanie trypletowym. Dla białek zawierających cystynę, tyrozynę i tryptofan (fotoinaktywowanych w warunkach podanych wyżej) autorzy proponują dwa rodnikowe mechanizmy rozzerwania wiązania dwusiarczkowego. Jeśli w łańcuchu polipeptydowym w bezpośrednim sąsiedztwie cystyny znajduje się tyrozyna, dla powstania rodnika wystarcza zaabsorbowanie jednego kwantu. Natomiast w przypadku odpowiedniego przestrzennego usytuowania cystyny i tryptofanu rozzerwanie wiązania zachodzi na drodze mechanizmu dwufotonowego. Po-

wstałe rodniki są różne, w zależności od tego na jakiej drodze zostały utworzone.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams G. E., McNaughton J. S., Michael B. D. w *The Chemistry of Ionizations and Excitation* red. Johnson G. R. A., Scholes J., str. 281—293 London (1967).
2. Adams G. E., McNaughton J. S., Michael B. D., *Trans. Faraday Soc.* **64**, 902 (1968).
3. Adams G. E., Willson R. L., Aldrich J. E., Cundall R. B., *Int. J. Radiat. Biol.* **16**, 333 (1969).
4. Allen B. J., Ingram D. J. E., w *Free Radicals in Biological Systems* red. Blois. M. S., H. W. Brown, R. M. Lemmon, R. O. Lindbom, M. Weissbluth, Academic Press, New York (1961).
5. Adroes G. M., Gloria H. R., Reinisch R. E., *Photochem. Photobiol.* **15**, 375 (1972).
6. Augenstein L. G., w *Information Theory in Biology*, red. Quastler Univ. of III. Press, Urbana (1953) str. 119.
7. Augenstein L. G., w *Adv. Enzymol.* **24**, 359 (1962).
8. Augenstein L. G., Chiron C. A., Grist K. L., Mason R., *Proc. Natl. Acad. Sci. US* **47**, 1530 (1961).
9. Augenstein L. G., Grist K. L., w *Biol. Effects of Ionizing Radiat. at the Molecular Level*, Proceedings of a Symposium Brno 1962, Vienna 1962, str. 263.
10. Augenstein L. G., Ray B. P., *J. Phys. Chem.* **61**, 1385 (1957).
11. Augenstein L. G., Riley P., *Photochem. Photobiol.* **3**, 353 (1964).
12. Augenstein L. G., *Photochem. Photobiol.* **7**, 613 (1968).
13. Azizova O. A., *Biofizyka* **8**, 556 (1963).
14. Azizova O. A., *Biophysics* **8**, 611 (1963).
15. Beaven G. H., Holiday E. R., *Advan. Protein. Chem.* **7**, 319 (1952).
16. Blake C. C. F., Koenig D. F., Mair G. A., North A. C. T., Philips D. C., Sarma V. R., *Nature* **206**, 757 (1965).
17. Blake C. C. F., Mair G. A., North A. C. T., Philips D. C., Sarma V. R., *Proc. Roy. Soc. London* **167B**, 365 (1967).
18. Blumenfeld L., Kalmanson A., *Biofizyka* **2**, 546 (1957).
19. Blumenfeld L., Kalmanson A., *Biofizyka* **3**, 87 (1958).
20. Bourdillon R. B., Gaddum J. H., Jenkins R. J. C., *Proc. Roy. Soc. London* **106B**, 388 (1930).
21. Brustad T., *Nature* **209**, 31 (1966).
22. Chen R. F., w *Fluorescence* red. Guilbault Marcel, Deklur G. G., Publ. New York (1967), str. 443.
23. Claesson I. M., *Arkiv. Kemi* **10**, 1 (1956).
24. Claesson I. M., *Arkiv. Kemi* **10**, 30 (1956).
25. Cowgill R. W., *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 272 (1963).
26. Cowgill R. W., *Arch. Biochem. Biophys.* **104**, 84 (1964).
27. Cowgill R. W., *Biochim. Biophys. Acta* **140**, 37 (1967).
28. Dose K., *Biophysik* **1**, 316 (1964).
29. Dose K., *Abhandl. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med.* **6**, 185 (1964).
30. Dose K., *Photochem. Photobiol.* **6**, 437 (1967).

31. Dose K., *Photochem., Photobiol.* **8**, 331 (1968).
32. Dose K., Rajewski B., *Photochem. Photobiol.* **1**, 181 (1962).
33. Dose K., Sena L., *Photochem. Photobiol.* **7**, 59 (1968).
34. Dunlop J. J., Nicholls C. H., *Photochem. Photobiol.* **4**, 881 (1965).
35. Forbs W. F., Savige W. E., *Photochem. Photobiol.* **1**, 77 (1962).
36. Forbs W. F., Sullivan P. D., *Biochim. Biophys. Acta* **120**, 222 (1966).
37. Ghiron C. A., Sellers D. R., *Photochem. Photobiol.* **12**, 433 (1970).
38. Ghiron C. A., Volkert W. A., Lohmeyer H., *Photochem. Photobiol.* **13**, 431 (1971).
39. Gordy W., *Rad. Res. Suppl.* **1**, 491 (1959).
40. Grist, Taylor T., Augenstein L. G., *Rad. Res.* **26**, 198 (1965).
41. Grossweiner L. J., Joschek H. J., w Solvated Electron red. Gould, R. F. *Adv. Chem. Ser.*, **50**, 279, American Chemical Society, Washington, D.C. (1965).
42. Grossweiner L. J., Joschek H. J., *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3261 (1966).
43. Grossweiner L. J., Usui Y., *Photochem. Photobiol.* **11**, 53 (1970).
44. Grossweiner L. J., Usui Y., *Photochem. Photobiol.* **13**, 195 (1971).
45. Grossweiner L. J., Zwicker E. F., *J. Chem. Phys.* **39**, 2774 (1963).
46. Ham J. S., Platt J. R., *Chem. Phys.* **20**, 335 (1952).
47. Howard-Flanders P., *Adv. in Biol. and Med. Phys.* **6**, 553 (1953).
48. Ichimura S., Sawada F., Someno K., *J. Rad. Res.* **9**, 35 (1968).
49. Knopp J. A., Ten Bosch J. J., Longworth J. W., *Biochim. Biophys. Acta* **188**, 185 (1969).
50. Koch R., Franz J., Markau K., *Atompraxis* **8**, 345 (1962).
51. Koch R., Monig H., *Nature* **203**, 859 (1964).
52. Konev S. V., *Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids*. Plenum Press, New York (1967).
53. Longworth J. W., *Photochem. Photobiol.* **7**, 587 (1968).
54. Luse R. A., McLaren A. D., *Photochem. Photobiol.* **2**, 343 (1963).
55. Mason R., *Rad. Res. Suppl.* **2**, 452 (1960).
56. Mc Laren A. D., 2-Intern. Biophys. Cong. Vienna, 1966, Abstract No 573.
57. McLaren A. D., Hidalgo-Salvatierra O., *Photochem. Photobiol.* **3**, 349 (1964).
58. McLaren A. D., Luse R. A., *Science* **134**, 836 (1961).
59. McLaren A. D., Pearson S., *J. Polymer Sci.* **4**, 45 (1949).
60. McLaren A. D., Shugar D., *Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids*, Pergamon Press (1964).
61. McLean D. J., Giese A. C., *J. Biol. Chem.* **187**, 537 (1950).
62. Platzman R., Franck J., N. Yockey, red. Symposium on Information Theory in Biology, Pergamon Press, New York, 1958, str. 262.
63. Quintiliani M., Shejbal J., *Inter. Radiat. Biol.* **16**, 267 (196) (1969).
64. Risi S., Dose K., Rathinasamy T. K., Augenstein L. G., *Photochem. Photobiol.* **6**, 423 (1967).
65. Setlow R., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 444 (1955).
66. Setlow R., Doyle B., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 27 (1957).
67. Shugar D., *Biochim. Biophys. Acta* **8**, 302 (1952).
68. Steiner R. F., Edelhoeh H., *Nature* **192**, 873 (1961).
69. Teale F. W. J., *Biochem. J.* **76**, 381 (1960).
70. Vladimirov Yu. A., Roshchupkin D. J., Fesenko E. F., *Photochem. Photobiol.* **11**, 227 (1970).
71. Weber J., *Biochem. J.* **75**, 345 (1960).
72. Weber J., Teale F. W. J., w The Proteins red. Neuroth 3, Academic Press, Now York (1965), str. 445.

SPRAWOZDANIA

X Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Poznań 21—23 wrzesień 1972

X Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizował Oddział Poznański pod protektoratem Zarządu Głównego. W Zjeździe wzięło udział blisko 600 uczestników z krajowych ośrodków biochemicznych oraz 20 z różnych ośrodków zagranicznych.

Obrady toczyły się w ramach sympozjów na temat „Struktura i funkcja kwasów nukleinowych” oraz na temat „Własności molekuly białkowej”, a także w sześciu sekcjach tematycznych.

Ogółem wygłoszono 13 referatów sympozjalnych i 210 krótkich doniesień.

Materiały Zjazdowe: program i tom streszczeń zostały wydane staraniem Komitetu Naukowo-Organizacyjnego w pięknej szacie graficznej. Teksty streszczeń referatów i komunikatów opublikowano w brzmieniu nadesłanym przez autorów.

Otwarcia Zjazdu dokonał prof. dr Lech Działoszyński, Przewodniczący Komitetu Naukowo-Organizacyjnego Zjazdu i Przewodniczący Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Poznaniu. W przemówieniu powitalnym prof. Działoszyński podziękował Władzom miasta Poznania za życzliwą pomoc w organizacji zjazdu, powitał również Członków Honorowych Towarzystwa i zaproszonych przez Komitet Naukowo-Organizacyjny Zjazdu zagranicznych wykładowców: prof. F. Cramera (*Göttingen*, NRF), Dr Monique Jacob (*Strassbourg*, Francja) i prof. A. W. Lisa (*Portland*, USA).

Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prof. dr Tomasz Borkowski w swym przemówieniu inauguracyjnym powitał wszystkich uczestników Zjazdu życząc owocnych obrad i miłych kontaktów osobistych, a także podziękował Kolegom z Poznańskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za trud i sprawność w organizacji jubileuszowego X Zjazdu Towarzystwa. Prezes Towarzystwa następnie dokonał uroczystego aktu wręczenia dyplomów przybyłym na otwarcie Członkom Honorowym Towarzystwa prof. dr Janinie Opieńskiej-Blauth, seniorowi Oddziału Lubelskiego, prof. dr Bronisławowi Filipowiczowi, drugiemu Prezesowi Towarzystwa i wieloletniemu Przewodniczącemu Rady Redakcyjnej kwartalnika „Postępy Biochemii” oraz prof. dr Tadeuszowi Baranowskiemu, organizatorowi Wrocławskiego Oddziału PTBioch. i Przewodniczącemu Komitetu Biochemicznego i Biofizycznego PAN.*

Wykład inauguracyjny pt. „Funkcja białka w fazie stałej” wygłosił prof. dr Kazimierz Zakrzewski. Wykład ten otworzył równocześnie obrady zorganizowanego przez prof. Zakrzewskiego (*Warszawa*) Sympozjum na temat „Właściwości molekuly białkowej”. W programie sympozjum wygłoszono następujące referaty:

„Molekularna organizacja białek miofibrilli” — (Prof. dr Witold Drabikowski, *Warszawa*)

* Prof. dr Antoni Dmochowski, senior Oddziału Towarzystwa w Łodzi nie mógł wziąć udziału w Zjeździe z powodu choroby, dyplom Członkostwa Honorowego został przeto przekazany Mu poprzez Zarząd Oddziału.

„Badania porównawcze struktury immunoglobulin za pomocą pomiaru dyspersji skracalności optycznej dichroizmu kołowego” — (Prof. dr Józef Lisowski, *Wrocław*)
 „Nierozpuszczalne enzymy” — (Dr M. Wellman-Bednawska, współautor doc. dr A. Szewczuk)

Symposium na temat: „Struktura i funkcja właściwości kwasów nukleinowych” zorganizował prof. dr Jerzy Pawełekiewicz (*Poznań*). W programie symposium przedstawiono następujące referaty:

„Translacja natywnego i zmodyfikowanego RNA faga f_2 *in vitro*” — (Prof. dr Przemysław Szafranski, *Warszawa*)

„Correlation between structure and function of RNA” — (Prof. dr F. Cramer, *Göttingen, NRF*)

„The transport of dRNA from the nucleus to the cytoplasm” — (Dr M. Jacob, *Strasbourg, Francja*)

„Międzycząsteczkowe oddziaływanie stabilizujące struktury kwasu rybonukleinowego” — (Prof. dr K. L. Wierzchowski)

„Konformacje nukleozydów, dwunukleotydów i RNA” — (Dr A. Rabczenko, *Warszawa*)

„Ostatnie osiągnięcia w syntezie oligonukleotydów o określonej sekwencji” — (Prof. dr M. Wiewiórowski, *Poznań*)

„5-hydroxyuridine a component of RNA” — (Prof. A. W. Lis, *Portland, USA*).

W ramach symposium zorganizowano również specjalną uroczystą sesję, której przewodniczył Prof. dr T. Borkowski, Prezes Towarzystwa, a w czasie której wykład na temat „Nukleaza I z kielków groszku *Mung*” wygłosił prof. dr Michał Laskowski, senior (*Buffalo, USA*), członek Honorowy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Dyplom członkostwa Honorowego wręczył profesorowi Laskowskiemu Prezes Towarzystwa podkreślając wielkie osiągnięcia naukowe, zasługi w kształceniu polskich naukowców i stały kontakt naukowy z ośrodkami biochemicznymi w kraju.

W czasie trwania obrad czynne były wystawy aparatury i odczynników następujących firm: Zjednoczenie Wytwórni Surowic i Szczepionek „Biomed”, „Reanal” (*Węgry*), Beckmann (*Austria*), Sartorius (*NRF*), „Pharmacia” (*Szwecja*), Paul Brunning (*Holandia*) oraz MSE (*Anglia*). Cenną inicjatywą wystawców zagranicznych było zorganizowanie cyklu wykładów oraz pokazów użytkowania niektórych spośród wystawionych aparatów.

Spotkanie towarzyskie uczestników Zjazdu odbyło się w salach Pałacu Kultury i Nauki, dało ono sposobność do osobistych kontaktów i dyskusji a także okazję do miłej zabawy. Ufundowane przez Wydział Kultury miasta Poznania przedstawienie w Operze Poznańskiej było dla uczestników Zjazdu prawdziwą przyjemnością i niespodzianką. Wycieczki — jedna szlakiem Piastowskim a druga do Rogalina i Kórnik — dały możliwość Kolegom z innych stron kraju poznać piękno i kulturę Wielkopolski.

Sukces Jubileuszowego X Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, sprawność jego organizacji i dobra koleżeńską atmosferę są niewątpliwie osobistą zasługą Kolegów z ośrodka poznańskiego, którzy nie szczędzili sił, trudu i inwencji, a także przyjaznej troski o umilenie uczestnikom Zjazdu pobytu w Poznaniu.

Zofia Zielińska

Międzynarodowa Konferencja na temat „Chemiluminescencja”

Athens, Georgia, USA 10—13 październik 1972

Na Wydziale Biochemii i Chemii Uniwersytetu Georgia w Athens została zorganizowana czterodniowa, druga z kolei Międzynarodowa Konferencja Chemilumi-

nescencyjna. Bezpośrednimi organizatorami byli wybitni badacze z tej dziedziny, biochemik dr Milton J. Cormier oraz fizyko-chemicy dr David M. Hercules i John Lee, profesorowie Uniwersytetu stanu Georgia w Athens.

Poważnego poparcia finansowego udzieliły tej imprezie takie instytucje amerykańskie, jak Narodowy Fundusz Badań (NSF), Agencja Ochrony Środowiska (EPA), Komisja Energii Atomowej (USAEC) i inne. Komfortowo urządzony ośrodek uniwersytecki, przeznaczony specjalnie na tego typu imprezy „Center for Continuing Education”, położony malowniczo wśród rozległego campusu, zapewniło ponad 150 uczestników konferencji. Byli to chemicy, fizycy, biochemicy, biologowie jak również lekarze i technicy, przede wszystkim z USA. Poza Stanami Zjednoczonymi reprezentowane były: Japonia, Australia, Wielka Brytania, NRF, Kanada i Holandia. Z Polski uczestniczyły dwie osoby: doc. dr Danuta Sławińska i autor niniejszej notatki, którzy ogłosili komunikaty na temat chemiluminescencji w procesach utleniania chinonów i ich polimerów.

Tematyka Konferencji obejmowała siedem następujących zagadnień:

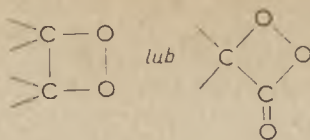
1. Teoria chemiluminescencji i reakcje w fazie gazowej — wzbudzone transwibracyjne i elektronowe stany atomów i cząsteczek.
2. Jono-rodniki w chemiluminescencji — generowanie wzbudzonych elektronowo cząsteczek w reakcjach chemicznych i elektrochemicznych podczas anihilacji kationo-aniono-rodników związków aromatycznych.
3. Reakcje z tlenem — rola tlenu singletowego, nadtlenu i rodników nadtlenkowych w chemiluminescencji.
4. Zastosowanie chemi- i bioluminescencji — analiza śladów metali w wodach i ściekach, określanie produktywności biosystemów, chemiczne oświetlenie.
5. Zastosowanie chemiluminescencji w fazie gazowej — analiza zanieczyszczeń atmosfery, zastosowania w aeronautyce i balistyce, pompowanie i lasery chemiczne.
6. Chemiczne mechanizmy bioluminescencji — struktury i reakcje lucyferyn owadów i skorupiaków morskich.
7. Mechanizmy reakcji związków organicznych uczestniczących w chemiluminescencji — przestrzenne rozdzielanie struktur „pompujących” i emitujących w obrębie jednej cząsteczki, dioksoetany, dwuazachinony i ich egzoergiczny rozpad.

Prawie 40% referatów i komunikatów poświęconych było chemiluminescencji układów biologicznych. Referowane prace ująć można w trzy grupy tematyczne:

1. Mechanizmy bioluminescencji i ich lokalizacja.
2. Wykorzystanie praktyczne bioluminescencji.
3. Ultraślaba chemiluminescencja w transporcie elektronów i procesach odpornościowych.

Ad. 1

Chociaż silna, a więc wygodna do badań pod względem metodyczno-technicznym, bioluminescencja owadów (*Photinus pyralis*) i skorupiaków (*Cypridina*) jest obiektem intensywnych badań od ponad pół wieku, szczegóły mechanizmów są jeszcze dalekie od pełnego wyjaśnienia. Stosunkowo dobrze poznano strukturę i właściwości substratów reakcji świecącej — lucyferyn, natomiast znacznie mniej wiadomo pod tym względem o specyficznych enzymach — lucyferazach oraz o sekwencji i energetyce elementarnych stadiów reakcji, prowadzących do emisji światła. Obecnie uwzględnia się różne stany jonizacji enzymu lucyferazy (E) oraz stereochemię nukleotydów wiązanych w kompleks E-LH₂-AMP, wpływające na skład widmowy emitowanego promieniowania (W. D. McElroy, M. De Luca — Uniwersytet Kalifornijski, H. H. Seliger — Uniwersytet Johns Hopkins w Baltimore). Panuje przekonanie, że zarówno w procesach bio- jak i chemiluminescencji związków organicznych powstają z utlenianego substratu przejściowe, czterocłonowe pierścienie nadtlenkowe (rysunek).



Ulegając egzoergicznemu rozkładowi ($\Delta H \approx -400 \text{ kJ/mol}$) do wzbudzonych związków karbonylowych $\text{>C=O} (n\pi^*)$ w stanach tripletowych lub singletowych i CO_2 dają emisję światła w zakresie 440–600nm (F. McCapra, Uniwersytet w Sussex, Anglia; E. White, John Hopkins Uniw.). Ostatnie badania bioluminescencji *Renilla reniformis* i *Photinus pyralis* (M. De Luca i M. E. Dempsey) z użyciem ^{18}O wskazują, że ^{18}O w produkcie końcowym — CO_2 pochodzi z wody, a nie z molekularnego O_2 . Stwierdzenie to spowodowało żywe dyskusje i próby modyfikacji szczegółów mechanizmów z udziałem pierścieni dwuoksyetanowych (W. D. McElroy, De Luca, White, F. H. Johnson i O. Shimomura — Princeton Uniw.).

Szereg prac dotyczyło lokalizacji świecących układów i ich struktury. U większości świecących jamochłonów odkryto luminescencyjne organelle tzw. lumisomy. Zawierają one niezbędne dla bioluminescencji substraty — lucyferinę, lucyferazę i fotoproteinę, a także zielono fluoryzujące białko, uczestniczące w transporcie energii wzbudzenia. W trigerowym mechanizmie świecenia uczestniczą O_2 i jony Ca^{2+} , Sr^{2+} i Ba^{2+} (M. J. Cormier; J. W. Hastings — Harvard Uniw.).

Zdołano w pewnym stopniu wyjaśnić naturę bakteryjnej lucyferazy. Składa się ona z podjednostek α i β , przy czym centrum aktywne, zlokalizowane w podjednostce α , zawiera sekwencję Phe-Gly-Ileu-Cys-Arg (J. W. Hastings, T. Baldwin, M. N. Nicoli i inni — Harvard).

Ad. 2

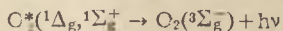
Nowe układy optyczno-elektronowe, stosujące fotopowielacze o niskim poziomie szumów lub pracujące w układzie antykoincydencyjnym pozwalają rejestrować 10–40fotonów/sek. Dla reakcji, którym towarzyszy luminescencja o wydajności za ledwie 1%, takie natężenie świecenia odpowiada szybkości reakcji poniżej 10^{-20} mol/sek. Jak to określili Seliger, jest to „wstrząsająca” czułość, nieosiągalna żadną inną metodą. Z tego względu bioluminescencja jest już z powodzeniem wykorzystana w badaniach biochemicznych. W przyszłości znajdzie też zapewne szersze wykorzystanie np. w badaniu mechanizmów rytmów i regulacji procesów biologicznych, indukcji enzymów, aktywnych centrów, kinetyki Ca^{2+} w pracy mięśni, w taksonomii i ekologii, zwłaszcza bioluminescentów morskich. Seliger i współprac. przedstawił wyniki badań nad określaniem produktywności masy organicznej fito- i zoo-planktonu, stanowiącego pierwsze i zasadnicze ogniwo ekosystemu hydrobiontów.

Klasyczne zastosowania analityczne bioluminescencji przedstawił P. E. Stanley (Uniw. w Adelajdzie, Australia). Przez sprzężenie „ciemnych” reakcji enzymatycznych, których produkty (ATP, NADH) są substratami dla reakcji świecących, z reakcjami bioluminescencji *Photobacterium fisheri* lub *Photinus pyralis* można szybko oznaczać 10pikomoli (!) nieorganicznych pirofosforanów, maleinianów lub szczawiooctanów. Oznaczenia takie mogą być monitorowane w standardowych spektrometrach typu *liquid scintillation counters*, z dużą dokładnością i selektywnie.

Ad. 3

Jednym z najciekawszych zjawisk omawianych podczas konferencji jest ultrasłaba chemiluminescencja towarzysząca mikrosomalnemu transportowi elektronów i zjawiskom fagocytozy. Prace Steele'a i współpracowników z Uniwersytetu w Nowym Orleanie w tym zakresie nawiązują do ultrasłabej „bioluminescencji” żywych organizmów i tkanek, badanej szeroko od lat 60-tych przez Tarusowa, Władimi-

rowa i Żurawłowa. W mikrosomalnej frakcji błon komórkowych w obecności NADH i O_2 stwierdzono występowanie ultrasłabej chemiluminescencji. Steele i współpracownicy przedstawili szereg danych wskazujących, że w układzie tym powstają elektronowo wzbudzone cząsteczki tlenu singletowego $^1\Delta_g$ i $^1\Sigma_g^+$. Dezaktywacja promienista tych cząsteczek do stanu podstawowego tripletowego



manifestuje się jako obserwowana chemiluminescencja. Z procesem tym konkurują fizyczne procesy gaszenia oraz procesy biochemiczne, zużywające aktywne formy tlenu singletowego — utlenianie lipidów, hydroksylacje ksenobiotyków i reakcje towarzyszące fagocytozie. Dlatego zużycie tlenu singletowego w tych procesach prowadzi na ogół do osłabienia chemiluminescencji. Pomiar natężenia świecenia w czasie mogłyby więc stanowić wskaźnik kierunku i szybkości tego rodzaju procesów.

Mając na uwadze powszechność chemiluminescencji w układach biologicznych i jej związek ze stanem fizjologicznym organizmu można oczekiwać w najbliższych latach rozszerzenia zakresu wykorzystania „świeceń biologicznych” do badania procesów biochemicznych na poziomie molekularnym. Dlatego też na Konferencji padły propozycje, by następne spotkanie odbyło się już za cztery lata i obejmowało oddzielnie bioluminescencję i chemiluminescencję.

Janusz Sławiński

RECENZJE

O możliwościach badań ilościowych w histochemii

Recenzja z tomu *Acta Histochemica*,

wyd. Gustaw Fischer, Jena. Supplement XII, zawierającego materiały Sympozjum na temat *Quantitative Histochemie der Proteine und Ribonukleinsäure, der Enzyme, Kohlenhydrate und Lipide*

Jest chyba regułą w rozwoju każdej, wyodrębniającej się w samodzielną naukę, gałęzi wiedzy, że po etapie zbierania informacji raczej opisowych przechodzi się do ich usystematyzowania a także do ich ujęcia ilościowego. Taką dążność daje się zaobserwować także w cyto- czy histochemii, która w tej chwili już coraz mniej zadawała się czysto opisowym przedstawieniem właściwości chemicznych komórki i stara się przekształcić w cytochemię ilościową. Tej właśnie formie cytochemii poświęcone było Sympozjum zorganizowane we wrześniu 1970 roku w Kolonii, wspólnie przez niemieckie i holenderskie Towarzystwo Histochemiczne. Materiały Sympozjum wydrukowane zostały w tomie dodatkowym do *Acta Histochemica*, wydawnictwo Gustawa Fischera, Jena. (Suppl. XII, str. 372, 1972), redaktorzy: D. Wittekind, Br. i J. F. Jonkind). Tematem obrad była histochemia ilościowa kwasów nukleinowych, białek, także enzymów, węglowodanów i lipidów. Zagadnienia te analizowano podczas tak zwanych dyskusji okrągłego stołu, które na ogół otwierały referaty wprowadzające, o charakterze bardziej ogólnym. Poza tym na Sympozjum przedstawiono również cały szereg referatów tak zwanych „wolnych”, które jednak związane były z zasadniczą tematyką. W recenzowanym tomie czytelnik znajdzie zatem szeroki przegląd nowoczesnych metod pozwalających na badanie głównych związków wielkocząsteczkowych komórki z jednoczesnym przykładem zastosowania tych metod przy rozwiązywaniu konkretnych zagadnień.

W referatach dotyczących kwasów nukleinowych (temat Ia) przedstawiono metody ilościowe polegające głównie na mierzeniu właściwej tym związkom absorpcji w ultrafiolecie, przy długości fali 265nm, oraz metody oparte na pomiarach fotometrycznych kompleksów kwasów nukleinowych z odpowiednimi barwnikami zasadowymi. W pierwszym przypadku zasadniczą sprawą jest wyeliminowanie błędu spowodowanego absorpcją, jaką wykazują w tymże zakresie widma białka zawierające tyrozynę i tryptofan, jak również konieczność selektywnego usunięcia jednego z kwasów nukleinowych dla oznaczenia zawartości drugiego z nich. W drugim przypadku o precyzji pomiaru decyduje dobranie odpowiedniego barwnika, który w określonych warunkach pH i siły jonowej tworzyłby z resztami fosforanowymi kwasów nukleinowych stechiometryczne, trwałe połączenia. W stanie natywnym — reszty te w znacznym stopniu są zneutralizowane przez grupy aminowe i guanidynowe towarzyszących kwasom nukleinowym białek. Denaturacja białek mająca miejsce podczas histologicznego utrwalania komórki powoduje stopniowe ich odślonięcie, co ma zasadniczy wpływ na wynik reakcji. Różny stopień denaturacji białek podczas utrwalania różnego rodzaju aldehydami powoduje zapewne — o czym mówiono w tej sesji — subtel-

ne zmiany w obrębie ultrastruktury karioplazmy, jak również nie pozostaje bez wpływu na możliwość enzymatycznego usunięcia z komórki DNA lub RNA.

W referacie omawiającym stosowanie metod autoradiograficznych w badaniu kwasów nukleinowych zwrócono uwagę na konieczność odpowiedniego dobrania znakowanych prekursorów. Np. jedynie użycie urydyny znakowanej trytem przy 5-ym węglu pierścienia pirymidynowego (urydyna-5-T) daje pewność, że uzyskane piętno wbudowane zostało wyłącznie w RNA. W czasie bowiem metylacji tego związku prowadzącej do powstawania kwasu tymidylowego, znakowanie trytem odpada, powstały zatem z urydyny prekursor DNA jest już nieradioaktywny. Z drugiej strony, urydyna jest na ogół szybciej rozkładana i wydalana przez komórkę, niż cytydyna. Dlatego w przypadku, gdy w badanych komórkach nie zachodzi synteza DNA stosowana jako prekursora syntezy RNA cytydyny jest parokrotnie (5x) wydajniejsze.

Z ilości uzyskanych w autoradiogramie zredukowanych ziaren srebra można — znając aktywność specyficzną stosowanych prekursorów i ilość rozpadów powodujących w danej emulsji zredukowanie jednego ziarna srebra — wyliczyć ilość wykorzystanych przy danej syntezie radioaktywnych prekursorów. Do tego jednak, aby ściśle określić ilość nowosyntetyzowanego RNA należy uwzględnić stopień rozcieńczenia podanego znakowanego prekursora przez wewnątrzkomórkową pulę prekursorów.

To samo zagadnienie poruszone zostało również przy omawianiu autoradiografii ilościowej białek. Histochemia ilościowa białek była przedmiotem sesji Ib. Poza wspomnianą już autoradiografią dyskutowano podczas tej sesji metody:

1) oznaczania fotometrycznego zawartości białek w komórce po zabarwieniu ich zasadowymi lub kwaśnymi barwnikami lub też po przeprowadzeniu barwnej reakcji między odczynnikiem Schiffa i grupami aldehydowymi powstałymi po utlenieniu ninhydryną pierwszorzędowych grup aminowych białek,

2) metody oznaczania fluorometrycznego ogólnej zawartości białek i samych histonów, po zastosowaniu fluorochromów o charakterze kwaśnym (barwienie przy pH 2—3 i 8), oraz

3) metody immunologiczne. W przypadku tych ostatnich stosuje się fluorometryczną ocenę ilości związanego z danym antygenem przeciwciała, połączonego uprzednio z barwnikiem fluorescencyjnym. Wielka czułość reakcji immunologicznych powoduje, że ilości powstających w badanych skrawkach w reakcji przeciwciała — antygen strąków są tak małe, że nie dałoby się wykryć ich metodami cytofotometrycznymi. Stąd konieczność wprowadzenia fluorochromu, co jednak stwarza z kolei szereg nowych trudności polegających między innymi na znalezieniu odpowiedniego standardu oraz na konieczności zbadania, jaki wpływ powiązanie użytego fluorochromu z danym przeciwciałem będzie miało na kinetykę przebiegu badanej reakcji. Mimo tych trudności metoda immunologiczna jest jednak chyba najbardziej selektywną metodą stosowaną przy badaniu białek.

Histochemia białek enzymatycznych była przedmiotem osobnych dwóch sesji, poświęconych metodom cytofotometrycznym (II a) i ultramikrochemicznym (II b) oznaczania aktywności enzymów. Obok stosowanego od dawna oznaczania cytofotometrycznego produktów barwnych reakcji pozwalającego na uzyskanie względnej aktywności enzymu dyskutowano również możliwości określania jej w wartościach bezwzględnych. Można to osiągnąć przez porównanie wyników cytofotometrycznych z wynikami analogicznych reakcji przeprowadzonych na związkach modelowych. Określone mikroilości takich związków można zawiesić (same, lub w mieszaninie z białkami imitującymi środowisko wewnątrzkomórkowe) w żelach poliakrylamidowych, formując z nich cienkie błony. Ocenę ilościową wyników reakcji przeprowadzonych na tak przygotowanych związkach modelowych uzyskuje się w fotometrze (spektrofotometr Zeissa, PMQ II), specjalnie przystosowanym do pomiarów absorpcji

światła przez błony. Przy założeniu, że warunki przeprowadzenia reakcji barwnej na skrawku histologicznym i na błonie modelowej były identyczne, można znając masę związku odpowiedzialnego za jej wynik w błonie obliczyć masę analogicznego związku badanego w komórce. Metodą tą posługiwano się nie tylko przy oznaczaniu aktywności enzymatycznej, lecz także przy oznaczaniu zawartości DNA w jądrach komórkowych.

Intensywność reakcji enzymatycznych podczas których zachodzi redukcja nukleotydów pirydynowych NAD i NADP można oceniać ilościowo, dzięki nabywanej wówczas przez te koenzymy fluorescencji, w mikroskopie fluorofotometrycznym (Leitz, MPV).

Interesująco przedstawia się również możliwość ilościowej oceny reakcji enzymatycznych typu reakcji Gomoriego, w których produktem są jony ołowiu. Można zawartość ich — po odpowiednim wyekstrahowaniu ze skrawka — zmierzyć przy pomocy spektrometrii absorpcji atomowej. Metoda jest do tego stopnia czuła, że pozwala na wykazanie ilości ołowiu rzędu 10^{-4} mg/ml. Można dzięki tak wielkiej czułości posługując się nią oceniać ilościowo wynik reakcji przeprowadzanych na skrawkach grubości 20—40 μ , a więc na ultraskrawkach stosowanych w mikroskopii elektronowej.

Następnym z kolei tematem dyskusji była histochemia ilościowa polisacharydów. Charakterystycznym — powszechnie znanym — zjawiskiem, jakie występuje przy reakcji tych związków z niektórymi barwnikami zasadowymi (jak np. błękit toluidynowy, Azur A, dwumetylo-błękit metylenowy) jest metachromazja, polegająca na widocznym i dającym się mierzyć fotometrycznie przesunięciu maksimum absorpcji użytych barwników. Zjawisko to zależy od obecności odpowiednio gęsto występujących w makrocząsteczce grup kwasowych, przy czym reszty kwasu siarkowego wywołują o wiele silniejszą metachromazję, niż reszty kwasu fosforowego, czy wreszcie grupy karboksylowe. W referatach przedstawiono konieczność precyzyjnego ustalania warunków reakcji między innymi takich, jak charakter i stężenie barwnika, wielkość stałych dielektrycznych — zależna od użytego rozpuszczalnika, wysokość pH, — od których to wartości zależy możliwość wnioskowania na podstawie pomiaru metachromazji o ilości odpowiedzialnego za nią związku.

Obecność reszt kwasu siarkowego wyróżniająca kwaśne polisacharydy od innych związków wielkocząsteczkowych komórki daje możliwość badania ich przy pomocy autoradiografii. Jako prekursorzy stosuje się wówczas S^{35} -siarczany. W badaniach prowadzonych w mikroskopie świetlnym bardzo korzystne dla obiektywnej oceny otrzymanych wyników (i niezmiernie tę ocenę ułatwiające) jest mierzenie fotometryczne światła odbitego od zredukowanych ziaren srebra w autoradiogramie (Mikroskop fotometryczny Leitz'a, M. P. V.). Jeżeli chodzi o autoradiografię w mikroskopie elektronowym — to przy dokładnym zachowaniu standardowych warunków doświadczenia oraz przy ścisłym oznaczeniu wielkości takich parametrów, jak zdolność rozdzielcza mikroskopu, grubość preparatu, grubość warstwy założonej emulsji, ilość rozpadów radioaktywnego atomu prowadząca w danej emulsji do wywołania jednego ziarna srebra, można ją również traktować jako metodę ilościową.

W histochemii mukopolisacharydów stosuje się również metody leżące niejako na pograniczu klasycznych metod histochemicznych i biochemicznych. Należą do nich elektroforeza i chromatografia skrawków, oraz mikrochemiczne oznaczanie zawartości badanego materiału w próbkach wyizolowanych przy pomocy mikromanipulacji ze skrawków histologicznych. W tym ostatnim przypadku uwalnia się badane związki dezintegrując struktury komórki działaniem enzymów proteolitycznych. Tak otrzymany hydrolizat przenosi się na kolumnienki celulozowe nasycone roztworem chlorku cetylopirydyny (CPC). Utworzone z CPC kompleksy mukopolisacharydów (glikozaminoglikanów, według nomenklatury Jeanioza) roztworami soli obojętnych o wzrasta-

jącym stężeniu (NaCl, lub $MgCl_2$). W tak otrzymanych eluatach można oznaczać mikrogramowe zawartości hexozoaminy.

Wspomniana już elektroforeza, lub chromatografia „skrawkowa” polega na tym, że stosuje się w niej nie wyciągi tkankowe, lecz same skrawki przygotowane z materiału nieutralnego na mikrotomie mroźniowym. Posługując się tą metodą dokonano np. rozdziału elektroforetycznego mukopolisacharydów z gruczołów ślinowych *Chironomus*.

Chromatografia skrawkowa (cienkowarstwowa) stosowana jest również w badaniach nad lipidami. Wobec ogromnej jednorodności tej grupy związków, wydaje się być ona najlepszą metodą identyfikacji lipidów w określonych komórkach. Zwłaszcza, że porównanie chromatogramów uzyskanych z całych skrawków i z ich ekstraktów wykazuje daleko idącą zgodność. Poza to wyższość tej metody nad badaniem składu lipidowego wyciągów tkankowych polega na tym, że skrawki można przed i po chromatografii poddać badaniom mikroskopowym, co istotnie umożliwia zlokalizowanie poszczególnych rodzajów lipidów w komórkach. Można również przy jej pomocy badać wpływ rozmaitych utrwalaczy na zachowanie lipidów w komórkach. Ten ostatni problem był również szeroko dyskutowany na omawianym Sympozjum. Zarówno z przedstawionych prac, jak i z zestawień danych z literatury wynika, że po wszystkich stosowanych powszechnie w mikroskopii elektronowej utrwalaczach (OsO_4 , glutaraldehyd) niekiedy nawet bardzo znaczne ilości różnego rodzaju lipidów (kilka do kilkudziesięciu procent) ulega ekstrakcji podczas dalszej procedury odwadniania komórki. Natomiast okazało się, że zabezpiecza przed tym niemal całkowicie utrwalenie w czterotlenku osmu z dodatkiem octanu uranylu. Strata fosfolipidów podczas następującego po takim utrwalaniu odwadnianiu etanolem spada poniżej 0.5%.

Jak już zaznaczono na wstępie, Sympozjum zakończone było przedstawieniem szeregu referatów, które w niektórych przypadkach nie tylko uzupełniały ale i rozszerzały omówione uprzednio tematy. Podane tu omówienie ważniejszych spośród tych tematów, wydaje mi się, że w wystarczający sposób świadczy o wartości recenzowanego tomu. Nie jest to podręcznik histochemii ilościowej, czytelnik nie znajdzie w nim przepisów na przeprowadzenie takiej, czy innej reakcji, znajdzie natomiast zwięźle przedstawioną charakterystykę nowoczesnych metod ilościowego badania składu chemicznego i metabolizmu komórek, perspektywy rozwoju tej dziedziny, oraz wskazówki — gdzie w literaturze szukać bliższych informacji o sposobie wykorzystania prezentowanych metod i o wynikach przy ich pomocy osiągniętych.

A. Przelęcka

Ross H. Hall — The Modified Nucleosides in Nucleic Acids

Columbia University Press, New York 1971

W roku 1971 ukazała się książka „The Modified Nucleosides in Nucleic Acids” wydana przez Wydawnictwo Uniwersytetu Columbia w Nowym Yorku. Autorem pracy jest doktor Ross H. Hall, profesor biochemii na Uniwersytecie McMaster w Hamilton, Kanada, doskonały specjalista w dziedzinie rzadkich nukleozydów.

Monografia ta jest pierwszą tego typu pozycją w literaturze światowej. Zbiera ona materiał ze wszystkich dziedzin dotyczących modyfikowanych zasad, nukleozydów oraz kwasów nukleinowych. Książka zawiera konkretne dane niezbędne w pracy

laboratoryjnej. Składa się ona z 9 rozdziałów. Po krótkim wprowadzeniu autor przedstawia rozdział o własnościach fizycznych, syntezie i występowaniu rybo- i dezoksyrybonukleozydów, wolnych zasad, w tym również rzadkich. W części tej przedstawiono wszystkie niezbędne wiadomości oraz odnośniki literaturowe do syntezy chemicznej, własności spektralnych oraz występowania w materiale biologicznym.

Autor w sposób konsekwentny scharakteryzował 82 związki z tej serii. Wartościowym uzupełnieniem jest tabela podająca porównanie występowania 30 modyfikowanych nukleozydów w tRNA i rRNA.

Bardzo pożytecznym rozdziałem szczególnie dla osób zajmujących się tRNA jest przegląd ogólnych metod izolacji rzadkich zasad oraz dane chromatograficzne. Autor jako specjalista w tym zagadnieniu, uwzględnił również specjalne techniki wyodrębnienia dla bardzo labilnych związków.

Dla interesujących się budową i funkcją rRNA ciekawy będzie rozdział poświęcony występowaniu „niezwykłych” nukleozydów w strukturze pierwszorzędowej tRNA.

Prof. Ross H. Hall podobnie jak M. Staehelin, *Experientia* 27, 1 (1971) i T. H. Jukers i L. Gathin, *Prog. Nuc. Acids Res. Mol. Biol.* 11, 339 (1971) analizuje pozycje w 11 transferowanych RNA z drożdży, *E. coli* i wątroby szczura. Podaje ogólne wnioski dotyczące występowania tych samych nukleozydów w określonych miejscach tRNA. Autor dokonuje również przeglądu danych eksperymentalnych mających na celu rozwiązanie zagadnienia rozpoznawania tRNA przez ligazy.

W kolejnej części książki zebrany jest materiał dotyczący hipermodyfikowanych nukleozydów w tRNA. Autor przedstawia komplet danych dla N^6 - Δ^2 -izopentenylo-adenozyny oraz dla N-/nebularyno-6-ilkarbamoilo/-treoniny (tcp). Większość danych odnośnie tcp otrzymano w laboratorium prof. R. H. Halla. Kontynuacją tego rozdziału jest szeroko opracowana biosynteza tych związków.

Ważnym rozdziałem pracy jest przegląd reakcji stosowanych do modyfikacji nukleozydów i tRNA. Przedstawiono 27 reakcji, które są popularnie stosowane w wielu laboratoriach.

Zakończenie książki stanowią uwagi oraz uzupełnienia: „Dane dla chromatografii bibułowej” zawierające informacje dotyczące 82 związków.

Książka liczy 452 strony łącznie z 835 odnośnikami literaturowymi oraz skorowidzem. Została ona napisana w roku 1969 i nie obejmuje oczywiście materiału, który się pojawił później. Od tego czasu między innymi ustalono i potwierdzono na drodze syntetycznej budowę kilku zasad hipermodyfikowanych typu Y.

Książka prof. R. H. Halla jest bardzo cenną pozycją dla naukowców pracujących w dziedzinie chemii i biochemii kwasów nukleinowych. Może być także użyteczną dla chemików organików interesujących się kwasami nukleinowymi.

A. J. Rafalski,
J. Barciszewski

KOMUNIKAT

Komitet Mikrobiologiczny Polskiej Akademii Nauk i Redakcja „Postępów Mikrobiologii” uprzejmie zawiadamiają P. T. Czytelników, że od roku 1974 „Postępy Mikrobiologii” ukazywać się będą jako kwartalnik. Prenumerata roczna wynosi 80 zł.

Zamówienia i prenumeratę przyjmują wszystkie urzędy pocztowe i listonosze. Wpłaty można również uiszczać na konto PKO nr 1—6—100020 RSW „Prasa — Książka — Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-839 Warszawa.

SPIS TREŚCI

| | |
|--|-----|
| R. Dąbrowska, W. Drabikowski — Molekularne podstawy skurczu mięśni | 343 |
| B. Baryłko — Charakterystyka i znaczenie białek wiążących wapń | 361 |
| B. Brysch — Jądrowe RNA organizmów eukariotycznych | 377 |
| T. Gołaszewski — Losy metaboliczne rybosomowych kwasów nukleinowych | 393 |
| B. Grzelakowska-Sztabert — Adenozyno 3',5'-monofosforan jako regulator wzrostu komórek <i>in vitro</i> | 423 |
| J. Tomaszewski — Glikoaminoglikany tkanki łącznej | 447 |
| S. Karolczyk-Kostuch, M. Zubek — Znaczenie rozerwania wiązań dwusiarczkowych w procesie inaktywacji enzymów i hormonów pod wpływem promieniowania ultrafioletowego | 471 |
| Sprawozdania: X Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Poznań 21—23.IX.1972 (Z. Zielińska) | 483 |
| Międzynarodowa Konferencja na temat „Chemiluminescencja” Athens, Georgia, USA, 10—13.X.1972 (J. Sławiński) | 484 |
| Recenzje | 489 |
| Komunikat | 494 |

POSTĘPY BIOCHEMII

July 1972

ARTICLES IN POLISH

| Volume 19 | Number 3 |
|--|----------|
| R. Dąbrowska, W. Drabikowski — Molecular Basis of Muscular Contraction (Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa) | 343 |
| B. Baryłko — Characterization and Role of the Calcium Binding Proteins (Nencki Inst. Exp. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa) | 361 |
| B. Brysch — Nuclear RNA-s of the Eucariotic Organisms (Inst. Oncology, Gliwice) | 377 |
| T. Gołaszewski — Metabolic Fates of Ribosomal Ribonucleic Acids (Inst. Biochem. Biophys. Pol. Acad. Sci., Warszawa) | 393 |
| B. Grzelakowska-Sztabert — Role of Adenosine 3',5'-monophosphate in the Regulation of Cell Growth <i>in vitro</i> (Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa) | 423 |
| J. Tomaszewski — Glycosoaminoglycans of the Connective Tissue (Medical School, Lublin) | 447 |
| S. Karolczyk-Kostuch, M. Zubek — Role of Disulfide Bond Disruption in Ultraviolet Inactivation of Enzymes and Hormones (School Agricul, Kraków) | 471 |
| Meeting Reports: 10 th Meeting of the Polish Biochemical Society (Z. Zielińska) | 483 |
| International Conference on Chemiluminescence (J. Sławiński) | 484 |
| Book Reviews | 489 |
| Communication | 494 |

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

Piśmiennictwo: W artykule powinny być cytowane prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawianą dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. Należy stosować numerowanie prac w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem będzie obejmował prace opatrzone kolejnymi numerami ale nieuporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 276, (1) np.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SPIS TREŚCI

| | |
|--|-----|
| R. Dąbrowska, W. Drabikowski — Molekularne podstawy skurczu mięśni | 343 |
| B. Baryłko — Charakterystyka i znaczenie białek wiążących wapń | 361 |
| B. Brysch — Jądrowe RNA organizmów eukariotycznych | 377 |
| T. Gołaszewski — Losy metaboliczne rybosomowych kwasów nukleinowych | 393 |
| B. Grzelakowska - Sztabert — Adenozyno 3',5'-monofosforan jako regulator wzrostu komórek <i>in vitro</i> | 423 |
| J. Tomaszewski — Glikoaminoglikany tkanki łącznej | 447 |
| S. Karolczyk-Kostuch, M. Zubek — Znaczenie rozerwania wiązań dwusiarczkowych w procesie inaktywacji enzymów i hormonów pod wpływem promieniowania ultrafioletowego | 471 |
| Sprawozdania: X Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Poznań 21—23.IX.1972 (Z. Zielińska) | 483 |
| Międzynarodowa Konferencja na temat „Chemiluminescencja” Athens, Georgia, USA, 10—13.X.1972 (J. Sławiński) | 484 |
| Recenzje | 489 |
| Komunikat | 494 |