

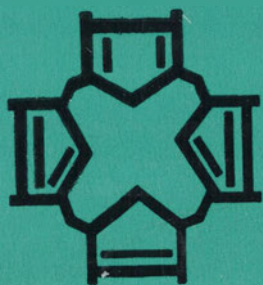
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 27(1)
(1-120) (1981)

1981

tom 27 nr 1
PL ISSN 0032-5422



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu jedynie piśmiennictwo z ostatniego roku lub dwu lat. Kwartalnik publikuje także krótkie noty informujące o nowych i ważniejszych osiągnięciach biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

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

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

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

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

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1981 TOM 27 ZESZYT 1

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 27(1)
(1-120) (1981)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Sekretarz: I. Szumiel (Warszawa)

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Chorąży (Gliwice), W. Drabikowski (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), J. Gregorczyk (Szczecin), B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Legocki (Poznań), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa)

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

SEKRETARZ REDAKCJI

A. Wieraszko

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (Warszawa), E. Czuryło (Warszawa), J. Skangiel-Kramaska (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

Adres Redakcji

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

Nakład 2.390

Oddano do składania 10.XI.1980 r.

Ark. wyd. 9,5, ark. druk. 7,5

Podpisano do druku w lipcu 1981 r.

Papier druk. sat. kl. V 70 g, 70×100

Druk ukończono w lipcu 1981 r.

1315/12/80

Cena zł 20,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

NIKODEM GRANKOWSKI *)

Problemy regulacji syntezy białka u *Eukariota*

The Regulation Problems of Protein Synthesis in *Eukaryotes*

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Represor syntezy białka kontrolowany przez heminę
 - II-1. Właściwości represora
 - II-2. Mechanizm działania HCR
 - II-3. Aktywacja HCR
 - II-4. Swoistość HCR
- III. Interferon — dsRNA
 - III-1. Aktywacja inhibitorów translacji oraz indukcja syntezy interferonu przez naturalne i syntetyczne dsRNA
 - III-2. Inaktywacja eIF-2
 - III-3. Degradacja mRNA i tRNA
- IV. Regulacja etapu wiązania mRNA do rybosomowego kompleksu inicjującego
 - IV-1. Rola końca 5' mRNA
 - IV-2. Rola końca 3' mRNA
- V. Inne czynniki mogące wpływać na translację

* Dr, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Akademicka 19, 20-033 Lublin.

Wykazy stosowanych skrótów: HCR, HCI, HRI — skróty różnych nazw tego samego represora (inhibitora) translacji mRNA w retikulocytach króliczych, RF — czynnik białkowy odwracający zahamowaną translację w lisatach retikulocytarnych pozbawionych heminy, CBP — białko wiążące się specyficznie z *cap* mRNA, ESP — czynnik białkowy stymulujący inicjację syntezy polipeptydu, TDI, SF — czynniki białkowe stabilizujące kompleks potrójny (eIF-2 : Met-tRNA_f : GTP) i zapobiegające jego rozkładowi, TDF — czynnik białkowy stymulujący rozkład kompleksu potrójnego, DAI — kinaza-inhibitor syntezy białka aktywowana przez dwuniciowy RNA, eIF's — czynniki inicjujące, tRNA — transportujący RNA, mRNA — informacyjny RNA, Met-tRNA_f — metioninowy tRNA (inicjujący), dsRNA — dwuniciowy RNA, ATP — adenozynotrójfosforan, GTP — guanozynotrójfosforan, cAMP — cykliczny adenozynomonofosforan, cGMP — cykliczny guanozynomonofosforan, GSSG — glutation, forma utleniona, NADPH — fosforan dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego, forma zredukowana, DTE — dwutioerytrytol, SDS — sodowy siarczan do-decyłu.

- V-1. Powiązanie syntezy białka z metabolizmem komórki
- V-2. Wpływ czynników białkowych na aktywność eIF-2
- VI. Uwagi końcowe

Contents

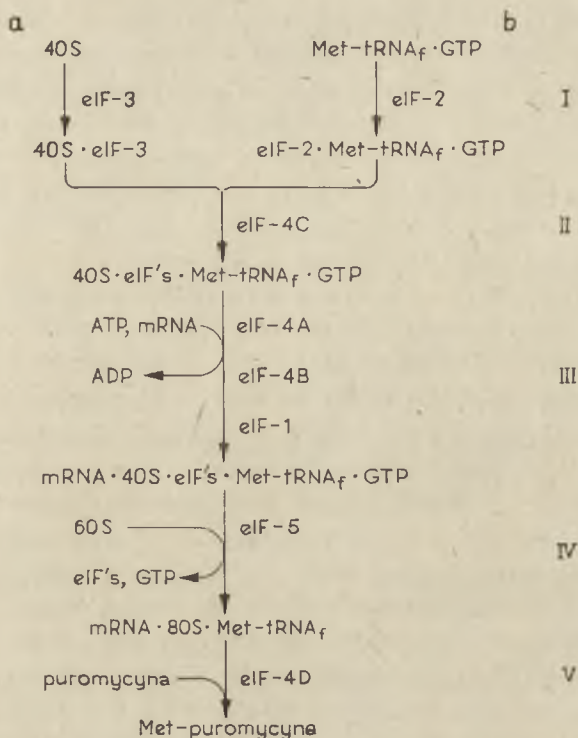
- I. Introduction
- II. Hemin-controlled repressor of protein synthesis
 - II-1. Properties of repressor
 - II-2. Mechanism of HCR action
 - II-3. HCR activation
 - II-4. HCR specificity
- III. Interferon — dsRNA
 - III-1. Activation of translation inhibitors and interferon synthesis induced by natural and synthetic dsRNAs
 - III-2. eIF-2 inactivation
 - III-3. mRNA and tRNA degradation
- IV. Regulation step of mRNA binding to the ribosomal initiation complex
 - IV-1. Role of 5' end of mRNA
 - IV-2. Role of 3' end of mRNA
- V. Other factors that may affect translation
 - V-1. Relationship between protein synthesis and cell metabolism
 - V-2. Effect of protein factors on eIF-2 activity
- VI. Final remarks

I. Wstęp

Poznanie mechanizmu regulacji syntezy białka w komórkach organizmów eukariotycznych nastęrcza wiele trudności wynikających z bardzo rozbudowanego aparatu translacyjnego: enzymy biorące udział w zapoczątkowaniu syntezy nowego polipeptydu (czynniki inicjujące), wydłużaniu łańcucha polipeptydowego (czynniki elongacyjne), zakańczające syntezę pełnego łańcucha polipeptydowego (czynniki terminacyjne), specyficzne mRNA i tRNA. Ponadto istnieją czynniki wpływające bezpośrednio lub pośrednio na maszynę translacyjną. Należą tu: fosfokinazy, fosfatazy, deacylazy, nukleazy oraz modulatory białkowe i niebiałkowe regulujące aktywność wymienionych grup enzymów.

Nie ulega wątpliwości, że podczas inicjacji syntezy białka u *Eukariota* najczęściej zachodzą procesy regulacyjne (1—3). Inicjację translacji eukariotycznych mRNA omówiono poprzednio w jednym z artykułów *Postępow Biochemii* (4). Użyte tam nazewnictwo czynników inicjujących jest wypierane przez nową nomenklaturę, ujednoliczoną na Międzynarodowym Sympozjum w Bethesda, USA (5). Z tego względu w artykule niniejszym omówiono we Wstępie aktualny schemat inicjacji syntezy białka u organizmów eukariotycznych, uwzględniający nowe nazewnictwo czynników. Schemat inicjacji u *Eukariota* przedstawia rycina 1 (6).

W procesie inicjacji wyróżnia się pięć zasadniczych podetapów, w



Ryc. 1. Schemat inicjacji syntezy białka u *Eukariota* (6).

których uczestniczy osiem enzymatycznych czynników inicjujących. W pierwszym podetapie (I b) następuje łączenie się inicjatorowego, metioninowego tRNA (Met-tRNA_t) z czynnikiem inicjującym 2 (eIF-2) i GTP dając w rezultacie tzw. kompleks potrójny [Met-tRNA_t: eIF-2: GTP]. Czynnikiem inicjującym 2 zbudowany jest z trzech łańcuchów polipeptydowych α , β , γ różniących się ciężarem cząsteczkowym. W przypadku eIF-2 retikulocytów króliczych polipeptyd α posiada ciężar cząsteczkowy 38.000, polipeptyd β 52.000 oraz γ 57.000. eIF-2 obok katalizowania reakcji syntezy kompleksu potrójnego odpowiedzialny jest również za wiązanie tego kompleksu z podjednostką rybosomową 40 S, która wchodzi do reakcji w połączeniu z czynnikiem inicjującym eIF-3 (podetap I a). Czynnikiem ten zbudowany jest aż z 9 podjednostek o sumarycznym ciężarze cząsteczkowym ponad 700.000. Uważa się, że zapobiega on przedwczesnemu przyłączeniu się większej podjednostki rybosomowej 60 S. W wyniku reakcji zachodzących w podetapie I a i I b (Ryc. 1) tworzy się złożony kompleks, za stabilizację którego odpowiada czynnikiem eIF-4 C (podetap II). W następnej kolejności z kompleksem tym wiąże się mRNA w obecności trzech czynników: eIF-4 A, eIF-4 B oraz eIF-1 (podetap III). Reakcja wymaga energii, która pochodzi z hydrolizy ATP. Do utworzonego wieloskładnikowego kompleksu, zwanego kompleksem inicjującym

40 S, przyłącza się większa podjednostka rybosomowa 60 S (podetap IV). W reakcji tej następuje hydroliza GTP a wydzielona energia jest prawdopodobnie niezbędna do odszczepienia przyłączonych wcześniej eIF-2 oraz eIF-3. Nie wiadomo dokładnie, jaki jest los eIF-4 A, eIF-4 B, eIF-1; czy ulegają one odszczepieniu od kompleksu inicjującego 80 S czy też nie. Aktywność kompleksu inicjującego można sprawdzić w reakcji syntezy wiązania peptydowego, z udziałem eIF-4 D i puromycyny (podetap V). W wyniku reakcji grupy aminowej puromycyny z grupą karboksylową metioniny przyłączonej do inicjatorowego tRNA, dochodzi do utworzenia metionino-puromycyny. Jest to modelowy układ syntezy pierwszego wiązania peptydowego. Bliższe dane na ten temat znaleźć można w poprzednim artykule publikowanym na łamach niniejszego czasopisma (7).

Najwięcej informacji o mechanizmie regulacji syntezy białka w organizmach eukariotycznych uzyskano w badaniach, w których wykorzystano retikulocyty królicze. W komórkach tych brak jest jąder, zatem wyeliminowany jest proces transkrypcji. Retikulocyty posiadają natomiast pełny zestaw translacyjnych składników syntetyzujący białko globinowe. Komórki te łatwo ulegają lizie ze względu na cienką błonę komórkową w wyniku czego uzyskuje się prosty, zbliżony do naturalnego, układ translacyjny tak zwane lizaty retikulocytarne. Pewne, wybrane sprawy dotyczące regulacji syntezy białka przedstawiono już w piśmiennictwie krajowym (8) i zagranicznym (9—11). Artykuł ten dotyczy w zasadzie wszystkich problemów, które mają istotne znaczenie w poznaniu mechanizmu regulacji translacji u *Eukariota*.

II. Represor syntezy białka regulowany przez heminę

II-1. Właściwości represora

Od dawna wiadomo było, że biosynteza białka w retikulocytach króliczych regulowana jest przez niebiałkowy składnik hemoglobiny — heminę (12—15). Dodanie heminy do reagującego układu przedłużało w budowanie aminokwasów do około 2 godzin (14—20). Wysunięto więc przypuszczenie o obecności w retikulocytach króliczych inhibitora, którego aktywność regulowana jest przez heminę. Z tego względu przyjęto nazywać go HCR (ang. *hemin controlled repressor*) (21—22), HRI (ang. *hemin regulated inhibitor*) (23) lub HCI (ang. *hemin controlled inhibitor*) (10).

Wyróżniono kilka form represora, których aktywność i wrażliwość na heminę zależy od czasu preinkubacji lizatów retikulocytarnych w nieobecności heminy (24—25). Uważa się, że nieaktywna forma represora

zwana prorepresosem ulega przekształceniu w tzw. represor „odwracalny” po kilkuminutowej preinkubacji w temperaturze $+34^{\circ}\text{C}$. Określenie „odwracalny” wiąże się z inaktywacją tej formy represora przez heminę. Dalsza preinkubacja prowadzi do powstania formy represora „pośredniego”, którego aktywność tylko w pewnym stopniu może być blokowana przez heminę. Ostatnią formą jest represor „nieodwracalny”, czyli niewrażliwy na heminę a powstający po kilku, czy nawet kilkunastogodzinnej preinkubacji. Szybkość aktywacji represora może być skrócona do kilku minut przez związki blokujące grupy $-\text{SH}$ jak N-etylomaleimid czy o-jodobenzoesan (20). Podobny efekt wywołuje utleniony glutation (26) lub preinkubacja lizatów retikulocytarnych w temp. powyżej $+40^{\circ}\text{C}$ (27—32). Związki chemiczne zapobiegające utlenieniu grup sulfhydrylowych (DTE, merkaptoetanol) opóźniają proces aktywacji HCR (33).

Gross i Rabinovitz (21—22) wyizolowali z supernatantu bezrybosomowego preinkubowanych lizatów retikulocytarnych frakcję białkową, która po dodaniu do translacyjnego układu zawierającego heminę i egzogeny ATP hamowała syntezę białka globinowego. Okazało się, że frakcja ta zawiera specyficzną kinazę fosfoproteinową niezależną od cAMP (EC.2.7.1.37.), fosforylującą pelipeptyd α czynnika inicjującego 2. W pracowni Londona (34) oczyszczono kinazę do homogenności i wykazano, że jej ciężar cząsteczkowy po elektroforezie na żelu poliakrylamidowym z SDS wynosi około 100.000 lub około 140.000, oszacowanym na podstawie wirowania w gradiencie stężenia glicerolu.

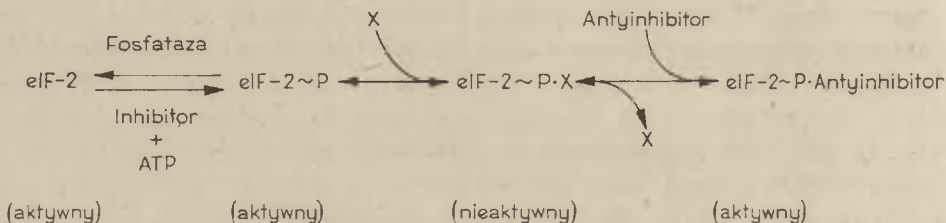
II-2. Mechanizm działania HCR

Już z początkowych danych o mechanizmie działania HCR wynikało, że blokuje on syntezę białka na etapie inicjacji. Świadczył o tym zanik polisomów po dodaniu represora do translacyjnego układu (35—37). Okazało się, że aktywność represora jest dwójaka: 1. deacyluje inicjatorowy tRNA, 2. fosforyluje eIF-2 α . Dane z pracowni Gross'a (38—39) wykazują stymulujący wpływ HCR na deacylację Met-tRNA_i. Obecność zdeacylowanego inicjatorowego tRNA w kompleksie inicjującym 40 S (patrz Ryc. 1, podetap III) uniemożliwia przyłączenie się podjednostki rybosomowej 60 S, a tym samym utworzenie kompleksu inicjującego 80 S (Ryc. 1, podetap IV). Być może HCR oddziałuje tu pośrednio na układ translacyjny poprzez aktywację deacylazy dla Met-tRNA_i.

Korelację między hamowaniem syntezy białka przez HCR a fosforylacją eIF-2 α zaobserwowano w pracowniach Hardesty'ego, Londona, Hunta i Gupta'y (40—44). Wykazano, że fosforylacja eIF-2 α prowadzi do hamowania aktywności czynnika inicjującego w wiązaniu kompleksu potrójnego [Met-tRNA_i:eIF-2:GTP] z podjednostką rybosomową 40 S. Nie stwierdzono natomiast większych zmian w aktyw-

ności ufosforylowanego eIF-2 podczas tworzenia się kompleksu potrójnego (43).

Od dawna znane były fakty świadczące o tym, że tylko nieufosforylowane eIF-2 mogą odwracać zahamowaną syntezę białka w układzie bezheminowym lub przez HCR. Wskazywało to na podobny lub identyczny w obydwu przypadkach mechanizm inaktywacji eIF-2 (37, 45—47). Postulowano więc niezdolność ufosforylowanych eIF-2 do uczestnictwa w inicjacji syntezy białka (48). W ostatnim czasie ukazały się prace poddające w wątpliwość fosforylację eIF-2 α , jako drogę inaktywacji czynnika i jednej z możliwości blokowania translacji mRNA w retikulocytach króliczych (49—51). Zaproponowany przez grupę Voorma'y i Benne (Ryc. 2) schemat inaktywacji eIF-2 i rewersji bloku translacji zakłada obecność czynnika X oraz czynnika zwanego antyinhibitorem występujących w retikulocytach (52).

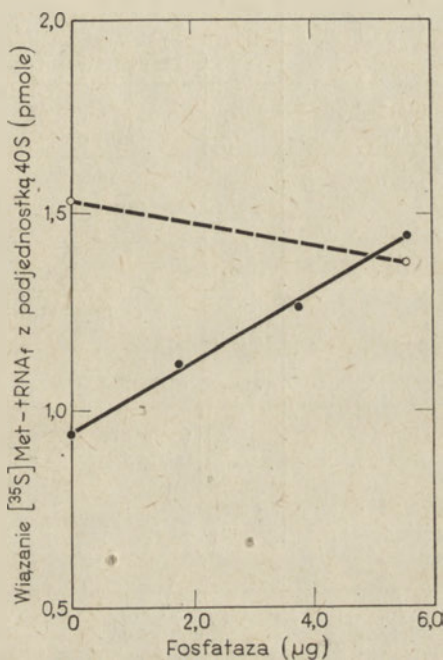


Ryc. 2. Proponowany model działania antyinhibitora (52).

Z zamieszczonego schematu wynika, że ufosforylowany eIF-2 (eIF-2-P) jest aktywny w syntezie białka do momentu połączenia się z nieokreślonym, hipotetycznym czynnikiem X. Wtedy dopiero tworzy się nieaktywny kompleks eIF-2-P-X. Przyłączenie antyinhibitora powoduje odszczepienie czynnika X i tym samym przywrócenie aktywności biologicznej eIF-2-P w kompleksie z antyinhibitorem. Autorzy nie precyzują jakiego charakteru aktywność enzymatyczna zawarta jest we frakcji antyinhibitorowej i w czynniku X. Jediną możliwością potwierdzenia lub zaprzeczenia braku wpływu fosforylacji eIF-2 na proces translacji byłaby defosforylacja czynnika inicjującego.

Obecność sprzężonego układu procesów fosforylacji i defosforylacji w odniesieniu do komponent translacyjnych retikulocytów króliczych sugerowana była przez grupę Traugh (53—54) i Safera (55). Ostatnio wyizolowano z bezrybosomowego supernatantu lizatów retikulocytarnych fosfatazę, zaliczaną do grupy fosfataz wielofunkcyjnych (56). Fosfataza ta obok defosforylacji egzogennych substratów, defosforyluje również eIF-2 α -P, przywracając w ten sposób czynnikowi inicjującemu pełną aktywność enzymatyczną w reakcji wiązania kompleksu potrójnego

go z podjednostką rybosomową 40 S (Ryc. 3). O specyficzności substratowej fosfatazy decydują niskocząsteczkowe czynniki białkowe. Jeden z nich o ciężarze cząsteczkowym 17.400 wykazuje zdolność wybiórczego stymulowania aktywności enzymu względem eIF-2 α -P (57). Przedstawione dane i załączony rysunek 3 wskazują jednoznacznie na istotną rolę fosforylacji i defosforylacji eIF-2 w regulacji syntezy białka. O swoistości sprzężonego układu decyduje specyficzność substratowa kinazy — HCR oraz niskocząsteczkowe białko zwane aktywatorem fosfatazy.



Ryc. 3. Przywrócenie przez fosfatazę aktywności eIF-2-P w reakcji wiązania kompleksu potrójnego z podjednostką rybosomową 40 S (56).

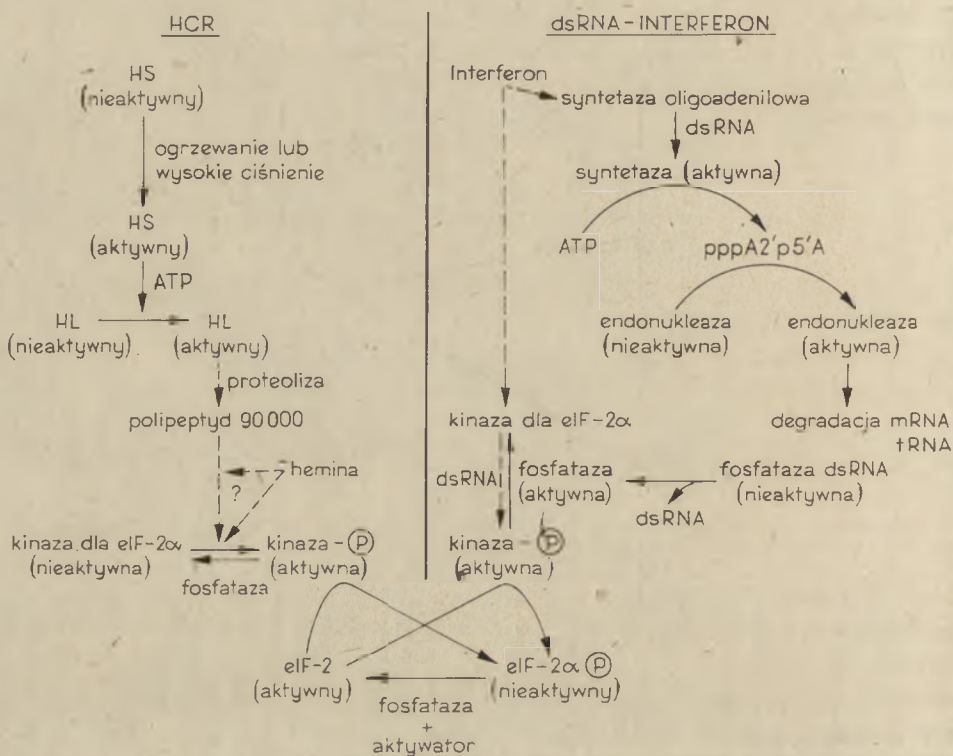
(○—○) aktywność kontrolnych, nieufosforylowanych eIF-2

(●—●) aktywność eIF-2-P w obecności wzrastających ilości fosfatazy

W pracowni Gupta'y (58) wyizolowano frakcję białkową nazwaną czynnikiem RF (ang. *reverse factor*), który również odwraca zahamowaną syntezę białka w lizatach retikulocytarnych pozbawionych heminy. Autorzy nie podają charakteru aktywności enzymatycznej RF. Być może jest to frakcja fosfatazowa w kompleksie z niskocząsteczkowym faktorem. Za taką interpretacją przemawia współczyszczanie się z RF białka o ciężarze cząsteczkowym zbliżonym do omawianego wyżej czynnika aktywującego specyficznie fosfatazę dla eIF-2 α -P.

II-3. Aktywacja HCR

Zaproponowany przez grupę Hardesty'ego (59) mechanizm aktywacji HCR przedstawia Ryc. 4. Uwzględnia on aktualne dane o poznanych czynnikach enzymatycznych i nieenzymatycznych biorących udział w aktywacji represora, nie pomijając jednocześnie tych reakcji, o których wiadomo, że są istotne dla poznania całości problemu ale ze względu na ich niepełną charakterystykę wymagają dalszego opracowania.



Ryc. 4. Schemat kaskadowego systemu indukcji i aktywności inhibitorów syntezy białka.

(→) reakcje sprawdzone eksperymentalnie,
 (----→) reakcje o bliżej nieznanym mechanizmie.

Ostatnio wykryto układ dwóch czynników: HS (ang. *heat-stable*) i HL (ang. *heat-labile*) aktywujący HCR systemem kaskadowym (60—61). Nieaktywny HS przekształcany jest w postać aktywną w czasie kilkunastominutowego ogrzewania w temperaturze 100°C lub poprzez działanie wysokiego ciśnienia (około 1000 Atm.). Czynniki HL występuje również w dwóch formach. Przekształcenie formy nieaktywnej w aktywną odbywa się przy udziale aktywnego HS w obecności ATP. Mechanizm tego pro-

cesu nie jest jasny. HL aktywuje następnie kinazę niezależną od cAMP typu HCR. Podczas aktywacji represora przez HS/HL zachodzi proteoliza, która jest niezbędna dla ujawnienia inhibitorowej aktywności. Świadczy o tym synteza białka globinowego na poziomie kontrolnym w obecności dodanego inhibitora trypsyny. Przypuszcza się, że HL uaktywnia najpierw proteolityczny enzym(y), który następnie przeprowadza nieaktywną kinazę (zagregowaną, wielkocząsteczkową formę) w postać aktywnego enzymu (patrz: Ryc. 4).

Fosforylacji eIF-2 α przez HCR w obecności [γ^{32} P]ATP jako donora reszt fosforanowych, towarzyszy wykrywana autoradiograficznie fosforylacja kinazy — represora. Hemina blokując aktywność represora blokuje jednocześnie fosforylację eIF-2 α i fosforylację kinazy — HCR (62). Wskazuje to, że jednym z czynników aktywacji represora jest jego fosforylacja. Nasuwają się więc pytania: 1. czy fosforylacja HCR jest wynikiem autofosforylacji?, 2. w jakim etapie aktywacji represora działa hemina? Okazuje się, że aktywność HCR znacznie podwyższona jest przez czynnik enzymatyczny o ciężarze cząsteczkowym 90.000. Nie fosforyluje on eIF-2 α , a tym samym nie wpływa na zależne od eIF-2 przyłączenie Met-tRNA_i do podjednostki rybosomowej 40 S. Przeciwciała dla homogenego czynnika „90.000” hamują fosforylację eIF-2 α przez HCR. Uważa się, że czynnik enzymatyczny o ciężarze cząsteczkowym 90.000 jest kinazą aktywującą represor lub przynajmniej częścią fosforylującego układu odgrywającego istotną rolę w aktywacji HCR i regulacji syntezy białka globinowego retikulocytów króliczych (63). Podobny mechanizm aktywacji kinaz białkowych wykryto w szlaku metabolicznym przemian glikogenu (64—66). Brak jest jak dotąd, jednoznacznej odpowiedzi o miejscu działania heminy. Może ona blokować zarówno kinazę aktywującą jak i kinazę — HCR (patrz: Ryc. 4).

Wiele kontrowersji budziły dane o udziale cAMP w aktywacji HCR i regulacji biosyntezy białka. Z jednej strony są doniesienia o tym, że wysokie stężenia cAMP (2—10 mM) mogą odwracać zahamowaną translację endogennego mRNA w lizatach retikulocytarnych inkubowanych bez heminy (67—69). Z drugiej strony wykazywano hamujący wpływ cAMP na syntezę białka w translacyjnym układzie izolowanym z wątroby szczura (70—73). Tu należy wspomnieć, że stężenia cAMP używane w badaniach były wyższe o kilka rzędów wielkości od stężeń cAMP, przy których następuje aktywacja kinaz (74). Na tle tych danych interesująco przedstawiały się wyniki badań grupy Ochoa'y sugerujące możliwość aktywacji kinazy — represora przez częściowo oczyszczoną kinazę zależną od cAMP izolowaną z retikulocytów króliczych lub z mięśnia serca wołu (75—76). Zdaniem autorów kinaza zależna od cAMP fosforyluje kinazę dla eIF-2 α przekształca ją z formy nieaktywnej czyli prorepresora w formę aktywnego represora. Rola heminy polegać zatem może na wiązaniu się z podjednostką regulatorową holoenzymu kinazy zależnej od

cAMP, uniemożliwiając jego dysocjację, a tym samym pojawienie się aktywności fosfokianzowej.

Ostatnio udowodniono zupełny brak wpływu cAMP oraz kinazy zależnej od tego nukleotydu na aktywację HCR i regulację translacji endogennego mRNA retikulocytów króliczych (77—78). Wyizolowana katalityczna podjednostka kinazy zależnej od cAMP fosforyluje jedno z białek rybosomowych podjednostki 40 S (79). Hemina jest bez wpływu na tę reakcję. Nie stwierdzono również by kinaza-HCR fosforylowana była przez holoenzym w obecności cAMP lub przez podjednostkę katalityczną tego enzymu (77). Testy biologiczne w układzie frakcjonowanym oraz w lizatach retikulocytarnych potwierdziły ostatecznie brak wpływu kinazy zależnej od cAMP oraz samego cAMP zarówno na translację endogennego mRNA (77), jak i przyłączanie Met-tRNA_i do ufosforylowanej podjednostki rybosomowej 40 S (79).

II-4. Swoistość HCR

Obecność inhibitorów translacji o właściwościach zbliżonych do właściwości HCR wykazano w komórkach rakowych *Ehrlicha* (80), komórkach wątrobowych szczura (81), erytrocytach ludzkich (82) oraz leukemicznych komórkach *Friend* (FLC) (83—84). Inhibitor z FLC hamuje syntezę białka zarówno w układzie homologicznym jak i w lizatach retikulocytarnych (83). HCR jest bez wpływu na translację w FLC (84), mimo że są to również komórki erytroidalne (pewna forma proerytroblastów zmodyfikowanych wirusem *Friend*). Następnym przykładem swoistości HCR są wyniki badań nad jego wpływem na aktywność translacyjnego układu z zarodków kielków pszenicy (85). HCR fosforyluje tu jeden z polipeptydów eIF-2, ale nie zmienia aktywności czynnika inicjującego w tworzeniu kompleksu potrójnego i nie wpływa na syntezę białka w układzie bezkomórkowym zarodków kielków pszenicy.

Na podstawie tych przykładów należy sądzić, że retikulocytarny HCR to kinaza specyficzna tylko dla układu homologicznego. Zahamowanie translacji jest wynikiem ufosforylowania ściśle określonych miejsc w polipeptydzie α retikulocytarnych eIF-2. Nie oznacza to braku występowania w innych komórkach eukariotycznych inhibitorów translacji wrażliwych na heminę. Hemina stymuluje translację w komórkach rakowych *Krebs* II (86), komórkach *HeLa* (87) i komórkach wątrobowych (88). Świadczyć to może, albo o wpływie heminy na kinazy typu HCR, albo o blokowaniu inhibitorów translacji o innym mechanizmie działania.

III. Interferon — dwuniciowy RNA

Traktowanie komórek eukariotycznych przeciwwirusowym czynnikiem zwanym interferonem prowadzi do syntezy wewnątrz komórki nieaktywnych form pewnych enzymów, które w obecności dsRNA (ang. *double-stranded RNA*) i ATP przekształcane są w formę aktywną. Aktywność enzymów tych skierowana jest na aparat translacyjny. Indukcję enzymów, mechanizm ich aktywacji oraz wpływ na syntezę białka przedstawia Ryc. 4.

III-1. Aktywacja inhibitorów translacji oraz indukcja syntezy interferonu przez naturalne i syntetyczne dsRNA

dsRNA aktywuje inhibitory syntezy białka w stężeniach nanogramowych/ml mieszaniny inkubacyjnej. Stężenia mikrogramowe/ml nie wywołują takiego efektu (89). Do najefektywniejszych aktywatorów wśród naturalnych dsRNA należą: replikacyjna forma wirusa *Polio* (90—91) i bakteriofaga f_2 (89), dsRNA wirusów *Reo* (92) i wirusa mozaiki grochu pastewnego (93), dsRNA ekstrahowany z jąder komórek *HeLa* (94) i blastocytów krwi ludzkiej (95) oraz mykofagowy dsRNA (89,92). Syntetyczne dsRNA aktywatory to: homopolimery nukleotydu inozylowego i cytydylowego [poli(I)·poli(C)] (89, 96), nukleotydu adenilowego i urydylowego [poli(A)·poli(U)] (89) oraz kopolimery [poli(A-U)·poli(A-U)] (97). Najefektywniejsze hamowanie syntezy białka występuje wtedy, gdy aktywator posiada co najmniej 50 par nukleotydów lub stałą sedymentacji około 4 S (89, 98).

Naturalne i syntetyczne dsRNA obok właściwości aktywowania inhibitorów translacji posiadają również zdolność indukowania syntezy przeciwwirusowego czynnika — interferonu (99—100). Ponieważ synteza białka interferonowego (interferon to glikoprotein) odbywa się *de novo* w komórce gospodarza po infekcji wirusowej, zatem musi istnieć zróżnicowana aktywność dsRNA. Wyjaśnień w tej sprawie dostarczyły wyniki z pracowni De Clercq'a (97). Okazuje się, że nie wszystkie dsRNA posiadają jednakową zdolność aktywowania inhibitora translacji i indukowania syntezy interferonu. W przypadku retikulocytów króliczych naturalne dsRNA (reowirusowe i replikatywna forma bakteriofaga f_2) doskonale aktywują inhibitor translacji i znacznie słabiej indukują syntezę interferonu. Homopolimery dsRNA [poli(I)·poli(C)] są bardzo dobrymi induktorami syntezy interferonu i o wiele gorszymi aktywatorami inhibitora syntezy białka. Kopolimery [poli(A-U)·poli(A-U)] w jednakowym stopniu aktywują inhibitor oraz indukują syntezę interferonu. O tym, czy następuje indukcja syntezy interferonu czy aktywacja inhibitora translacji decyduje określony skład i sekwencja nukleotydowa dsRNA.

III-2. Inaktywacja eIF-2

Dodanie dsRNA i [γ - 32 P]ATP do ekstraktów otrzymanych z komórek potraktowanych wcześniej interferonem wywołuje wykrywaną autoradiograficznie intensywną fosforylację dwóch białek. Pierwsze z nich posiada ciężar cząsteczkowy 38.000, drugie 67.000 (42, 101—103). Białko pierwsze odpowiada podjednostce α eIF-2 (42, 104—107). Szereg danych wskazuje, że drugie z białek jest kinazą odpowiedzialną za fosforylację eIF-2 α (42, 107—109). Zdaniem autorów, fosforylacja kinazy tej jest czynnikiem aktywującym, który przeprowadza enzym z formy nieaktywnej w aktywną, przenoszącą reszty fosforanowe z ATP na eIF-2 α . Rola dsRNA nie ogranicza się tu do aktywacji układu fosforylującego eIF-2. Ostatnio wykazano, że dsRNA wykazuje powinowactwo względem fosfatazy defosforylującej aktywną, ufosforylowaną formę kinazy. Fosfataza w kompleksie z dsRNA jest nieaktywna (110). Tak więc dsRNA z jednej strony aktywuje kinazę, z drugiej zaś zapobiega jej inaktywacji. Patrz Ryc. 4.

Ze względu na obecność kinazy — inhibitora we frakcji rybosomowej nazywa się ją kinazą rybosomową (109). Spotkać można również określenie DAI (ang. *double-stranded RNA activated inhibitor*) (42). DAI w obecności ATP powoduje rozpad polirybosomów (111), fosforylację eIF-2 α i hamowanie wiązania Met-tRNA_i z podjednostką rybosomową 40 S (42, 105). Analiza hydrolizatów trypsynowych eIF-2 α [32 P] nie wykazuje różnic w obrazie chromatograficznym i autoradiograficznym po ufosforylowaniu czynnika inicjującego przez HCR czy DAI (42, 112—113). Mimo podobieństwa DAI do HCR w mechanizmie aktywacji poprzez fosforylację oraz bloku inicjacji syntezy białka, nie są to te same kinazy — inhibitory. Przeciwciała anty HCR hamują aktywność inhibitora indukowanego brakiem heminy w retikulocytach króliczych, natomiast są bez wpływu na aktywność DAI (113—114). Ponadto w odróżnieniu od HCR kinaza aktywowana przez dsRNA fosforyluje histony bogate w argininę (107).

III-3. Degradacja mRNA i tRNA

W pracowni Kerr'a zaobserwowano (115—116) i opisano (117—120) indukowaną interferonem degradację RNA, która prowadzi do zahamowania syntezy białka. W obecności interferonu komórki eukariotyczne syntetyzują nieaktywną formę syntetazy adenilowej o ciężarze cząsteczkowym 56.000 (121), którą dsRNA przekształca w postać aktywnego enzymu syntetyzującego z ATP tzw. „niezwykłe” oligonukleotydy o strukturze ppp A(2'p5'A)_n. Związek ten aktywuje następnie endonukleazy degradujące mRNA (122—125) i tRNA (126). Patrz Ryc. 4. Synteza oligo-adenilowych cząstek o wiązaniu 2'-5' występuje w różnych komórkach

Eukariota. Wykryto je w mysich komórkach L (117), komórkach embriónów kurzych (127), w retikulocytach (128) oraz komórkach rakowych *Ehrlicha* (122). Nie wszystkie mRNA ulegają degradacji w jednakowym stopniu i z jednakową szybkością. mRNA wirusa *Reo* czy wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej są bardziej wrażliwe na indukowaną interferonem i dsRNA nukleazę niż mRNA globinowy (129—130). Jest to jedna z dróg uzyskania oporności organizmu po zakażeniu wirusowym.

IV. Regulacja etapu wiązania mRNA z rybosomowym kompleksem inicjującym

Większość eukariotycznych i wirusowych mRNA posiada na końcach 5' i 3' charakterystyczną strukturę. Na końcu 5' znajduje się 7-metyloguanozyna (m^7G), która połączona jest w łańcuchu mRNA z następnym nukleozydem (N) mostkiem trójfosforanowym (ppp) wiązaniem 5'-5' między rybozami. Struktura ta [$m^7G/5'/ppp/5'/N$] nosi nazwę ang. *cap*. Modyfikacja końca 5' odbywa się podczas lub po zakończeniu transkrypcji.

Koniec 3'mRNA zawiera odcinek 50—200 kwasów adenilowych. Sekwencje poli(A) dobudowywane są do mRNA po zakończeniu transkrypcji a ich długość zwiększa się w miarę coraz to wyższego poziomu organizacyjnego komórek eukariotycznych. Wyczerpujące dane na temat struktury końca 5' i 3'mRNA znaleźć można w piśmiennictwie zagranicznym (131—132) oraz w *Postęпах Biochemii* (4, 133).

IV-1. Rola końca 5' mRNA

Istnieje szereg przykładów wskazujących na udział 5'-*cap* w wydajnej translacji eukariotycznych (134—138) i wirusowych (134—135, 139—140) mRNA. Badania z analogami końca 5' pozwoliły ustalić zaangażowanie *cap* w pierwszym etapie translacji (141—142) a ściślej podczas oddziaływania mRNA — rybosom (143—148) i mRNA — czynniki inicjujące (149—150). Nie zawsze jednak translacja mRNA zależy od obecności *cap*. I tak niektóre wirusowe mRNA naturalnie nie zawierające *cap* są odczytywane z wysoką wydajnością zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. W innym przypadku usunięcie 7-metyloguanozyny z mRNA wirusów *Reo* czy wirusów pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej niewiele zmienia matrycową aktywność mRNA w układzie retikulocytarnym natomiast w układzie z zarodków kielków pszenicy hamowanie translacji jest prawie całkowite (151—155). Są to przykłady pewnej tolerancji układów trans-

lacyjnych względem mRNA pozbawionych zmodyfikowanego końca 5'. Nie zmienia to faktu udziału *cap* w translacji. Przykładem tego jest wyizolowana przez Filipowicza i wsp. (156) z popłuczyn rybosomów *Artemia Salina* frakcja białkowa zawierająca czynnik zwany CBP (ang. *cap binding protein*), który wzmacnia translację globinowego i reowirusowego mRNA. Czynnik ten wykazuje właściwość specyficznego wiązania się ze zmetylowanym końcem 5'mRNA nie tworząc jednocześnie kompleksu z mRNA pozbawionych *cap*.

Po zakażeniu wirusowym obserwuje się wzmożoną translację mRNA wirusowego przy jednoczesnym zahamowaniu translacji informacyjnego RNA komórki gospodarza. Nie następuje tu degradacja mRNA komórkowego ale jak sugerowano zachodzić mogą zmiany w czynnikach inicjujących. Zahamowana translacja mRNA komórki gospodarza na korzyść syntezy białka wirusowego odwracana jest przez dodanie eIF-4B (157—158). Sugerowano nawet, że czynnik ten może wiązać się z *cap* (149, 159), ponieważ istnieje większe zapotrzebowanie na ten czynnik inicjujący w translacji mRNA, które posiadają zablokowany koniec 5' 7-metyloguanozyną (157—158). Podobną rolę przypisywano eIF-3 (160) a nawet eIF-2 (150). W pracowni Shatkina (161) wyizolowano i oczyszczono białko o ciężarze cząsteczkowym 24.000, które rozpoznaje zablokowany koniec 5'mRNA i przypomina właściwościami CBP. Chociaż białko to współpracuje się z eIF-4 B oraz eIF-3 nie stanowi jednak integralnej części czynników inicjujących. Stało się to punktem wyjścia do wyjaśnienia jednego z problemów hamowania translacji mRNA gospodarza po infekcji wirusowej. Okazuje się, że wirus nie modyfikuje eIF-4 B czy eIF-3 ale CBP. W wyniku modyfikacji białko to traci zdolność specyficznego łączenia się z *cap* mRNA gospodarza (162).

Kodon AUG jako sygnał startowy syntezy białka oddzielony jest od końca 5'mRNA odcinkiem polinukleotydowym pozbawionym informacji dla syntezy białka. Długość odcinka jest różna i waha się wśród poznanych mRNA od 11 nukleotydów w przypadku wirusa mozaiki stokłosy (163) do około 250 nukleotydów w mRNA onkogenego wirusa SV₄₀ (164). Ten fragment mRNA bogaty jest w sekwencje zawierające kwas urydylowy, adenilowy i cytydylowy, którym przypisuje się istotne znaczenie w tworzeniu kompleksu inicjującego 80 S (165). Nie wydaje się natomiast by odległość kodonu startowego od końca 5'mRNA miała znaczenie w translacji. Wskazują na to wyniki z pracowni Lodish'a (166—167). mRNA dla α -globiny posiadający AUG bliżej końca 5' jest odczytywany z mniejszą wydajnością niż mRNA dla β -globiny posiadający kodon startowy bardziej oddalony od końca 5'. Podobnie jest i u wirusowych mRNA.

Podjednostka rybosomowa 40 S wraz z inicjatorowym tRNA i czynnikami inicjującymi nie przyłącza się bezpośrednio do kodonu startowe-

go ale najpierw do końca 5' mRNA. Następnie przesuwana jest po odcinku niezawierającym informacji genetycznej w kierunku końca 3' do momentu napotkania trypletu AUG (168—169). Być może dodatkowym sygnałem rozpoznawczym kodonu startowego jest guanina (169), która występuje zaraz po AUG w wielu mRNA dając sekwencję nukleotydową AUGG. Taka kolejność liter stwarza potencjalną możliwość komplementarnego parowania się zasad z pętlą antykodonową Met-tRNA_i o sekwencji 3' ... UACC ... 5' (170).

IV-2. Rola końca 3' mRNA

Różnorodność opinii o udziale struktury końca 3' w regulacji translacji mRNA spowodowana jest być może tym, że nie zawsze obserwowany jest jednakowy wpływ fragmentów poli(A) na ten proces (171—172). Na pewno jedną z najistotniejszych funkcji odcinka poli(A) jest ochrona mRNA przed degradacją 3'-nukleazą (173).

Wiele nadziei na rozwiązanie problemu regulacji aktywności mRNA w kompleksie inicjującym wiąże się z badaniami rybonukleoproteinowych cząstek — mRNP (ang. *messenger ribonucleoprotein particles*), opisanymi po raz pierwszy przez Spirina i nazwanymi informosomami (174). Zagadnienie to zostało już omówione w *Postęпах Biochemii* (175). W ostatnim czasie stwierdzono różnicę między wolnymi, cytoplazmatycznymi mRNP a mRNP izolowanymi z polirybosomów. Różnice te dotyczą ilości i jakości białek (176—178). Jedno z nich o ciężarze cząsteczkowym 78.000 tworzy specyficzny kompleks z fragmentem poli(A) mRNA otrzymanym z polirybosomowych mRNP. Zdaniem autorów białko to chroni mRNA przez 3'-nukleazą (179—180).

Istnieje również inna teoria próbująca wyjaśnić udział końca 3' w regulacji translacji mRNA. Heywood i wsp. (181—182) wyizolowali z embrionów mięśnia kurczącego niskocząsteczkowy RNA zwany tcRNA (ang. *translational control RNA*), który hamuje translację mRNA otrzymanych z wolnych, cytoplazmatycznych mRNP nie mając jednocześnie wpływu na translację mRNA polirybosomowego. Sugeruje się, że przyczyna bloku translacji leży w sekwencji kwasu poliurydylowego tcRNA (około 50% całego łańcucha tcRNA). Na zasadzie komplementacji zasad (A-U) tworzy on strukturę podwójnej nici z fragmentem poli(A) na końcu 3' blokując w ten sposób aktywność mRNA. Obecność specyficznego białka o ciężarze cząsteczkowym 78.000 na końcu 3' polirybosomowych mRNA zapobiegałoby interakcji z tcRNA. Koncepcja ta jest atrakcyjna ze względu na specyficzność tcRNA w obrębie homologicznego układu. Wymaga ona jednak dalszego opracowania, gdyż w innych pracowniach nie stwierdzono oddziaływania tcRNA z mRNA (183—184).

V. Inne czynniki mogące wpływać na translację

V-1. Powiązania syntezy białka z metabolizmem komórki

Efekt hamowania syntezy białka przez utleniony glutation (patrz rozdz. II-1) jest podobny do tego jaki obserwuje się po preinkubacji retikulocytów króliczych w warunkach beztlenowych, gdy doda się do układu translacyjnego inhibitorów fosforylacji oksydatywnej lub usunie na drodze filtracji żelowej niebiałkowe, niskocząsteczkowe składniki (185—188). We wszystkich przypadkach blok translacji cofany jest przez dodanie do układu translacyjnego frakcji czynników inicjujących lub tylko eIF-2 (187—188). Podobny efekt wywołują fosfocukry takie jak: glukozo-6-fosforan, fruktozo-6-fosforan lub fruktozo-1, 6-dwufosforan (189—192), które zaangażowane są w procesie regeneracji NADPH (189). Okazuje się, że NADPH jest dawcą wodoru do redukcji GSSG przez endogenną reduktazę glutationową. Proces regeneracji NADPH z udziałem fosfocukrów sprawia, że obniża się poziom blokującego translację GSSG. Fosfocukrom przypisuje się również rolę stymulatora fosfatazy defosforylującej eIF-2 α -P (191). Jest to bardzo prawdopodobne, gdyż od dawna wiadomo jest, że estry fosforowe heksoz stymulują aktywność fosfataz (193).

V-2. Wpływ czynników białkowych na aktywność eIF-2

eIF-2 należy do najlepiej poznanych czynników inicjujących. Mimo tego nadal ukazują się prace wykazujące, że aktywność biologiczna eIF-2 zależy od dodatkowych czynników białkowych. Jednym z nich jest oczyszczony do homogenności Co-eIF-2 (ang. *cofactor* eIF-2), który znacznie zwiększa powinowactwo eIF-2 do Met-tRNA_t. Co-eIF-2 przypisuje się pierwszeństwo w łączeniu z eIF-2 a dopiero później zostają przyłączone Met-tRNA_t i GTP dając w rezultacie czteroskładnikowy kompleks [Co-eIF-2 : eIF-2 : Met-tRNA_t : GTP]. Nie wiadomo czy kompleks taki wiązany jest w całości z podjednostką rybosomową 40 S czy też Co-eIF-2 zostaje odszczepiony wcześniej (194—195).

Podobną aktywność wykazuje ESP (ang. *eucaryotic stimulating protein*), który został wyizolowany z retikulocytów króliczych (196), komórek raka *Ehrlicha* (197) i embrionów *Artemia salina* (198). Aktywność ESP dotyczy zarówno homologicznych jak i heterologicznych eIF-2 (198—199).

Trwałość wiązania kompleksu potrójnego z podjednostką rybosomową 40 S uzależniona jest od przyłączonego mRNA do rybosomu (200) oraz jak wykazano ostatnio od dwóch czynników białkowych: TDI (ang. *ternary*

complex dissociation inhibitor) (201) i SF (ang. *stabilization factor*) (202). W nieobecności informacyjnego RNA następuje szybka dysocjacja kompleksu potrójnego pod wpływem kolejnego czynnika białkowego TDF (ang. *ternary complex dissociation factor*) (203—204). Z danych tych wynika, że za tworzenie kompleksu potrójnego i wiązania Met-tRNA_f z podjednostką rybosomową 40 S odpowiedzialny jest nie tylko eIF-2 ale również inne dodatkowe czynniki białkowe. Fakty te wskazują raz jeszcze na złożoność mechanizmu regulacji syntezy białka w komórkach eukariotycznych.

VI. Uwagi końcowe

Jak dotychczas, najwięcej wiadomo jest o mechanizmie regulacji syntezy białka organizmów eukariotycznych poprzez fosforylację aparatu translacyjnego. Obok fosforylacji podjednostki α eIF-2 procesowi temu ulega również podjednostka β czynnika inicjującego. Reakcję katalizuje kinaza niezależna od cAMP inna niż kinaza-HCR czy kinaza aktywowana przez dsRNA. O roli tej fosforylacji nic nie jest wiadomo jak nie wiadomo jest jaką rolę pełnić może fosforylacja czynników: eIF-3, eIF-4 B, eIF-5 (205—208). Z pewnością ma to znaczenie, gdyż jak wykazano ostatnio (209—211) fosforylacja innych niż eIF-2 czynników inicjujących prowadzi do hamowania procesu translacji.

Od dziesięciu lat prowadzone są badania nad fosforylacją rybosomów *in vivo* i *in vitro* (212—214). Do chwili obecnej ukazała się ogromna ilość prac wykazujących fosforylację kilku białek rybosomowych w podjednostce 40 S i 60 S. Trzy z nich ulegają intensywnej fosforylacji. Pierwsze, to białko charakteru zasadowego należące do mniejszej podjednostki rybosomowej i odpowiadające białku S6 według nomenklatury Sher-ton i Wool'a (215). Powszechność jego fosforylacji została udokumentowana licznymi wynikami badań na różnorodnym materiale (216—221). Reakcja katalizowana jest przez kinazę zależną od cAMP (222—225) a nawet przez kinazę zależną od cGMP (226). Wzrost radioaktywnego piętna [³²P] w białku tym obserwuje się w obecności glukagonu (227—228), podczas regeneracji wątroby szczura (216) oraz w obecności takich inhibitorów translacji jak NaF (21), cykloheximid i puromycyna (224), a nawet w komórkach zainfekowanych wirusem (220). W tym ostatnim przypadku obok białka S6 fosforylowane są jeszcze inne białka rybosomowe podjednostki 40 S zaś proces ten jest wynikiem aktywności kinazy będącej strukturalnym białkiem wirionu.

W podjednostce rybosomowej 60 S u wszystkich badanych organizmów eukariotycznych ulegają intensywnej fosforylacji dwa białka o charakterze kwaśnym (216, 219, 229—239). Białka te w odróżnieniu od S6 fosforylowane są *in vitro* przy udziale kinaz niezależnych od cAMP, wy-

korzystujących ATP i GTP jako donorów reszt fosforanowych (216, 238). Wyizolowana ostatnio (240) kinaza tego typu fosforyluje specyficznie omawiane białka kwaśne podjednostki rybosomowej 60 S. Fakt ten w połączeniu z danymi o fosforylacji tych samych białek *in vivo* (237, 239, 241—243) daje podstawy do przypuszczeń o udziale fosforylacji rybosomów w regulacji translacji.

Postęp badań w tym problemie zależy od szerokiego podejścia nie tylko do spraw fosforylacji rybosomów ale również do spraw związanych z defosforylacją. Z tym wiąże się sprawa regulacji aktywności kinaz i fosfataz. Skoro wiadomo, że aktywność enzymów tych kontrolowana jest przez niskocząsteczkowe modulatory białkowe (inhibitory, aktywatory) to w perspektywie rozważań nad regulacją translacji nie mogą być te czynniki pominięte.

Zaakceptowano do druku 4.09.1980.

Autor składa serdeczne podziękowania Panu Prof. dr Eugeniuszowi Gąsiorowi i Pani Dr Teresie Jakubowicz za przeczytanie rękopisu i cenne uwagi oraz Pani Krystynie Rusinek i Panu Mgr Ryszardowi Szyszce za pomoc techniczną podczas przygotowywania artykułu.

Część badań przedstawionych w artykule była wykonana w ramach problemu węzłowego Nr 09.7.1.2.1.

PISMIENICTWO

1. Lodish H. F., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 39—72.
2. Weissbach H., Ochoa S., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 191—216.
3. Revel M., (1977) w *Molecular mechanisms of protein biosynthesis*, red. Weissbach H., Pestka S., str. 246—306; Academic Press, N. Jork.
4. Filipowicz W., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 21—59.
5. Anderson W. F., Bosch L., Cohn W. E., Lodish H., Merrick W. C., Weissbach H., Wittmann H. G., Wool I. G., (1977), *FEBS Lett.*, **76**, 1—10.
6. Benne R., Hershey J. W. B., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3078—3087.
7. Grankowski N., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 173—195.
8. Rychlik W., (1981), *Postępy Biol. Kom.* — w druku.
9. Safer B., Anderson W. F., (1978), *CRC Crit. Rev. Biochem.* **5**, 261—290.
10. Ochoa S., de Haro C., (1979), *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 459—480.
11. Austin S. A., Clemens M. J., (1980), *FEBS Lett.*, **110**, 1—7.
12. Kruh J., Borsook H., (1956), *J. Biol. Chem.*, **220**, 905—915.
13. Bruns G. P., London I. M., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 236—242.
14. Adamson S. D., Herbert E., Godchaux W., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 671—683.
15. Zucker W. V., Schulman H. M., (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 582—589.
16. Grayzel A. I., Hörchner P., London I. M., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 650—655.
17. Waxman H. S., Rabinovitz M., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **129**, 369—379.

18. Howard G. A., Adamson S. D., Herbert E., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **213**, 237—240.
19. Balkow K., Mizuno S., Rabinovitz M., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 315—323.
20. Legon S., Jackson R., Hunt T., (1973), *Nature New Biol.*, **241**, 150—152.
21. Gross M., Rabinovitz M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **287**, 340—352.
22. Gross M., Rabinovitz M., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 832—838.
23. Ranu R. S., London I. M., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4349—4353.
24. Gross M., Rabinovitz M., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1565—1568.
25. Gross M., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **366**, 319—332.
26. Kosower N. S., Vanderhoff G. A., Kosower E. M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **272**, 623—637.
27. Sprechman L. M., Ingram V. M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5004—5009.
28. Mizuno S., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **414**, 273—282.
29. Bonanou-Tzedaki S. A., Arnstein H. R. V., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **61**, 397—407.
30. Spieler P. J., Ibrahim N. G., Freedman M. L., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **518**, 366—379.
31. Bonanou-Tzedaki S. A., Smith K. E., Sheeran B. A., Arnstein H. R. V., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 601—610.
32. Arnstein H. R. V., Bonanou-Tzedaki S. A., (1977), Translation of Natural and Synthetic Polinucleotides, wyd. Legocki A. B., str. 32—38; University of Agriculture of Poznań.
33. Gross M., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **520**, 642—649.
34. Trachsel H., Ranu R. S., London I. M., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3654—3658.
35. Mizuno S., Fisher J. M., Rabinovitz M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **272**, 638—650.
36. Balkow K., Mizuno S., Fisher J. M., Rabinovitz M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **324**, 397—409.
37. Clemens M. J., Henshaw E. C., Rahaminoff H., London I. M., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2946—2950.
38. Gross M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2370—2377.
39. Gross M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2378—2383.
40. Kramer G., Cimadevilla J. M., Hardesty B., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3078—3082.
41. Levin D. H., Ranu R., Ernst V., London I. M., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3112—3116.
42. Farrell P. J., Balkow K., Hunt T., Jackson R. J., Trachsel H., (1977), *Cell*, **11**, 187—200.
43. Kramer G., Henderson A. B., Pinphanichakarn P., Wallis M. H., Hardesty B., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1445—1449.
44. Ranu R. S., London I. M., Das A., Dasgupta A., Majundar A., Ralston R., Roy R., Gupta N. K., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 745—749.
45. Kaempfer R., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 591—597.
46. Clemens M. J., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **66**, 413—422.
47. Ranu R. S., Levin D. H., Delaunay J., Ernst V., London I. M., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2720—2724.

48. Cherbas L., London I. M., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3506—3510.
49. Trachsel H., Staehelin T., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 204—208.
50. Farrell P. J., Hunt T., Jackson R. J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **89**, 517—521.
51. Benne R., Salimans M., Goumans H., Amesz H., Voorma H. O., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 501—509.
52. Amesz H., Goumans H., Haubrich-Morree T., Voorma H. O., Benne R., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **98**, 513—520.
53. Lightfoot H. N., Mumby M., Traugh J. A., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1141—1146.
54. Traugh J. A., Sharp S. B., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3738—3744.
55. Safer B., Jagus R., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1094—1098.
56. Grankowski N., Lehmusvirta D., Kramer G., Hardesty B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 310—317.
57. Grankowski N., Lehmusvirta D., Stearns G. B., Kramer G., Hardesty B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5755—5762.
58. Ralston R. O., Das A., Dasgupta A., Roy R., Palmieri S., Gupta N. K., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 4858—4862.
59. Kramer G., Henderson A. B., Grankowski N., Hardesty B., (1980) w Ribosomes structure, function and genetics, red. Chamblis G., Crayen G. R., Davies J., Kahan L., Nomura M., str. 825—845, University Park Press, Baltimore.
60. Henderson A. B., Miller A. H., Hardesty B., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2605—2609.
61. Henderson A. B., Hardesty B., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 715—723.
62. Gross M., Mendelewski J., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **520**, 650—663.
63. Wallis M. H., Kramer G., Hardesty B., (1980), *Biochemistry* **19**, 798—804.
64. Krebs E. G., Beavo J. A., (1979), *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 923—959.
65. Rubin C. S., Rosen O. M., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 831—887.
66. Cohen P., (1978), *Curr. Top. Cell. Regul.* **14**, 117—121.
67. Balkow K., Hunt T., Jackson R. J., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 366—375.
68. Ernst V., Levin D.H., Ranu R. S., London I. M., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1112—1116.
69. Legon S., Bradley A., Hunt T., Jackson R. J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**, 745—752.
70. Sellers A., Bloxham D. P., Munday K. A., Akhtar M., (1974), *Biochem J.*, **138**, 335—340.
71. Klaipongpan A., Bloxham D. P., Akhtar M., (1975), *FEBS Lett.*, **58**, 81—84.
72. Klaipongpan A., Bloxham D. P., Akhtar M., (1977), *Biochem J.*, **168**, 271—275.
73. Hoshino J., Kühne U., Studinger G., Kröger H., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 663—669.
74. Beavo J. A., Bechtel P. J., Krebs E. G., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3580—3583.
75. Datta A., de Haro C., Sierra J. M., Ochoa S., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1463—1467.

76. Datta A., de Haro C., Ochoa S., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **75**, 1148—1152.
77. Grankowski N., Kramer G., Hardesty B., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3145—3147.
78. Levin D., Ernst V., London F. M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7935—7941.
79. Grankowski N., Kramer G., Hardesty B., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **197**, 618—629.
80. Clemens M. J., Pain V. M., Henshaw E. C., London I. M., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 768—775.
81. Delaunay J., Ranu R. S., Levin D. H., Ernst V., London I. M., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2264—2268.
82. Freedman M. L., Geraghty M., Rosman J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7290—7294.
83. Cimadevilla J. M., Kramer G., Pinphanichakarn P., Konec ki D., Hardesty B., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**, 145—153.
84. Pinphanichakarn P., Kramer G., Hardesty B., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2106—2112.
85. Benne R., Kasperaitis M., Voorma H. D., Ceglaz E., Legocki A. B., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 109—117.
86. Beuzard Y., Rodvien R., London I. M., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1022—1026.
87. Weber L. A., Feman E. R., Baglioni C., (1975), *Biochemistry* **14**, 5315—5321.
88. Jennings C., Ranu R. S., London I. M., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 1623.
89. Hunter T., Hunt T., Jackson R. J., Robertson H. D., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 409—417.
90. Hunt T., Ehrenfeld E., (1971), *Nature New Biol.*, **230**, 91—94.
91. Ehrenfeld E., Hunt T., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1075—1078
92. Robertson D. H., Mathews M. B., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **70**, 225—229.
93. Reijnders L., Aalbers A. M. J., Van Kammer A., Berns A. J. M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **390**, 69—77.
94. Bases R., Kaplan B. H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **312**, 574—580.
95. Torelli U., Cadossi R., Torelli G., Ferrari St., Ferrari Se., (1975), *FEBS Lett.*, **56**, 96—100.
96. Shenk T. E., Stollar V., (1972), *Biochim. Biophys. Acta.*, **287**, 501—513.
97. Content J., Lebleu B., De Clercq E., (1978), *Biochemistry*, **17**, 88—94.
98. De Clercq E., (1974), *Top. Curr. Chem.*, **52**, 173—208.
99. Colby C., Morgan M. J., (1971), *Ann. Rev. Microbiol.*, **25**, 333—360.
100. Carter W. A., De Clercq E., (1974), *Science* **186**, 1172—1178.
101. Roberts W. K., Clemens M. J., Kerr I. M., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3136—3140.
102. Lebleu B., Sen G. C., Shaila S. Carber B., Lengyel P., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **73**, 3107—3111.
103. Zilberstein A., Federman P., Shulman L., Revel M., (1976), *FEBS Lett.*, **68**, 119—124.
104. Cooper J. A., Farrell P. J., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 124—131.
105. Lenz J. R., Baglioni C., (1977), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4219—4223.
106. Zilberstein A., Kimchi A., Schmidt A., Revel M., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4734—4738.

107. Kimchi A., Zilberstein A., Schmidt A., Shulman L., Revel M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9846—9853.
108. Clemens M. J., Safer B., Merrick W. C., Anderson W. F., London I. M., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1286—1290.
109. Levin D., London I. M., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1121—1125.
110. Epstein D. A., Torrence P. F., Friedman R. M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **77**, 107—111.
111. Darnbrough C., Hunt T., Jackson R. J., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1556—1564.
112. Samuel Ch. E., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 600—604.
113. Levin D. H., Petryshyn R., London I., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 832—836.
114. Petryshyn R., Trachsel H., London I. M., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1575—1579.
115. Kerr I. M., Brown R. E., Ball L. A., (1974), *Nature (London)* **250**, 57—59.
116. Kerr I. M., Brown R. E., Clemens M. J., Gilbert C. Š., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **69**, 551—561.
117. Roberts W. K., Hovanessian A. G., Brown R. E., Clemens M. J., Kerr I. M., (1976), *Nature (London)*, **264**, 477—480.
118. Hovanessian A. G., Brown R. E., Kerr I. M., (1977), *Nature (London)*, **268**, 537—540.
119. Kerr I. M., Brown R. E., Hovanessian A. G., (1977), *Nature (London)*, **268**, 540—542.
120. Kerr I. M., Brown R. E., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 256—260.
121. Ball L. A., (1979), *Virology*, **94**, 282—296.
122. Ratner L., Wiegand R. C., Farrell P. J., Sen G. C., Cabrer B., Lengyel P., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 947—954.
123. Eppstein D. A., Samuel C. E., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 145—153.
124. Shaila S., Lebleu B., Brown G. E., Sen G. C., Lengyel P., (1977), *J. Gen. Virol.*, **37**, 537—546.
125. Clemens M. J., Williams B. R. G., (1978), *Cell*, **13**, 565—572.
126. Zilberstein A., Dudock B., Berrisi H., Revel M., (1976), *J. Mol. Biol.*, **108**, 43—54.
127. Ball L. A., White C. N., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1167—1171.
128. Hovanessian A., G., Kerr I. M., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 149—159.
129. Sen G. C., Lebleu B., Brown G. E., Kawakita M., Slattery E., Lengyel P., (1976), *Nature*, **264**, 370—373.
130. Ratner L., Sen G. C., Brown G. E., Leblen B., Kawakita M., Carber M., Slattery E., Lengyel P., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **79**, 565—577.
131. Revel M., Groner Y., (1978), *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 1079—1126.
132. Shatkin A. J., (1976), *Cell* **9**, 645—653.
133. Brysch B., (1973), *Post. Bioch.*, **19**, 377—391.
134. Muthukrishnan S., Both G. W., Furuichi Y., Shatkin A. J., (1975), *Nature*, **255**, 33—37.
135. Both G. W., Banerjee A. K., Shatkin A. J., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1189—1193.
136. Kozarich J. W., Deegan J. L., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9345—9348.
137. Fresno M., Vazquez D., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **103**, 125—132.
138. Zan-Kowalczewska M., Bretner M., Sierakowska H., Szczę-sna E., Filipowicz W., Shatkin A. J., (1977), *Nucleic Acid Res.*, **4**, 3065—3081.

139. Both G. W., Furuichi Y., Muthukrishnan S., Shatkin A. J., (1975), *Cell* 6, 185—195.
140. Muthukrishnan S., Filipowicz W., Sierra J. M., Both G. W., Shatkin A. J., Ochoa S., (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 9336—9341.
141. Gąsior E., Herrera F., Sadnik I., McLaughlin C. S., Moldave K., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 3965—3969.
142. Gąsior E., Herrera F., McLaughlin C. S., Moldave K., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 3970—3976.
143. Weber L., Feman F., Hickey E., Williams M., Baglioni C., (1976), *J. Biol. Chem.*, 251, 5657—5662.
144. Hickey E., Weber L., Baglioni C., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 19—23.
145. Roman R., Brooker J., Seal M., Marcus A., (1976), *Nature (London)* 260, 359—360.
146. Brooker J., Marcus A., (1977), *FEBS Lett.*, 83, 118—124.
147. Rao M. S., Blackstone M., Busch H., (1977), *Biochemistry*, 16, 2756—2762.
148. Muthukrishnan S., Moss B., Cooper J. A., Maxwell E. S., (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 1710—1715.
149. Shafritz D. A., Weinstein J. A., Safer B., Merrick W. C., Weber L. A., Hickey E. D., Baglioni C., (1976), *Nature (London)*, 261, 291—294.
150. Kaempfer R., Rosen H., Israeli R., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 650—654.
151. Canaani D., Revel M., Groner Y., (1976), *FEBS Lett.*, 64, 326—331.
152. Hewlett M. J., Rose J. K., Baltimore D., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 327—330.
153. Smith A. E., Carrasco L., (1978), *MTP International Review of Science, Biochemistry, Series One, vol. 18, p. 261, Butterworths, London.*
154. Nomoto A., Lee Y., Wimmer E., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 375—380.
155. Rose J. K., Lodish H. F., (1976), *Nature* 262, 32—37.
156. Filipowicz W., Furuichi Y., Sierra J. M., Muthukrishnan S., Shatkin A. J., Ochoa S., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1559—1563.
157. Rose J., Trachsel H., Leong K., Baltimore D., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2732—2736.
158. Golini F., Thach S., Birge C., Safer B., Merrick W., Thach R., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 3040—3044.
159. Padilla M., Canaani D., Groner Y., Weinstein J., Bar-Joseph M., Merrick W., Shafritz D. A., (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 5939—5945.
160. Helentjaris T., Ehrenfeld E., Brown-Luedi M., Hershey J. W. B., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 10973—10978.
161. Sonenberg N., Morgan M., Merrick W., Shatkin A., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4843—4847.
162. Trachsel H., Sonenberg N., Shatkin A., Rose J. K., Leong K., Bergmann J. E., Gordon J., Baltimore D., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 770—774.
163. Dasgupta R., Shih D. S., Saris C., Kaesberg P., (1975), *Nature* 256, 624—628.
164. Ghosh P. K., Reddy V. B., Swinscoe J., Choudary P. V., Lebowitz P., Weissman S. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 3643—3647.

165. Both G. W., Furuichi Y., Muthukrishnan S., Shatkin A. J., (1976), *J. Mol. Biol.*, **104**, 637—658.
166. Lodish H. F., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7131—7138.
167. Lodish H. F., Froshauer S., (1977), *J. Biol. Chem.*, 8804—8811.
168. Kozak M., Shatkin A. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6568—6577.
169. Kozak M., (1978), *Cell*, **15**, 1109—1123.
170. Piper P. W., Clark B. F. C., (1974), *Nature*, **247**, 516—518.
171. Nemer M., Dubroff L. M., Graham M., (1975), *Cell*, **6**, 171—178.
172. Doel M. T., Carey N. H., (1976), *Cell*, **8**, 51—58.
173. Huez G., Marbaix G., Burny A., Hubert E., Le Clercq M., Clenther Y., Chantrenne H., Soreg H., Littauer U. Z., (1977), *Nature*, **226**, 473—474.
174. Spirin A., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **10**, 20—34.
175. Jachymczyk W., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 119—147.
176. Vincent A., Civelli O., Buri J. F., Scherrer K., (1977), *FEBS Lett.* **77**, 281—286.
177. Jeffery W. R., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3525—3532.
178. Dworkin M. B., Rudensky L. M., Infante A. A., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**, 2231—2235.
179. Kwan S., Brawerman G., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3247—3250.
180. Blobel G., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 924—938.
181. Heywood S. M., Kennedy D. S., Bester A. J., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **71**, 2428—2431.
182. Bester A., Kennedy D., Heywood S., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1523—1527.
183. Berus A., Salden M., Bogdanovsky D., Raymondjean M., Schapira G., Bloemendal H., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 714—718.
184. Lee Huang S., Sierra J. M., Naranjo R., Filipowicz W., Ochoa S., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.* **180**, 276—287.
185. Giloh H., Mager J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **232**, 537—555.
186. Giloh H., Mager J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **414**, 293—308.
187. Giloh H., Schochot L., Mager J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **414**, 309—320.
188. Hunt T., (1976), *Br. Med. Bull.*, **32**, 257—261.
189. Ernst V., Levin D. H., London I. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7163—7172.
190. Wu J. M., Cheung Chi P., Suhadolnik R. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8578—8582.
191. Lenz J. R., Chatterjee G. E., Maroney P. A., Baglioni C., (1978), *Biochemistry* **17**, 80—87.
192. West D. K., Lenz J. R., Baglioni C., (1979), *Biochemistry* **18**, 624—632.
193. Hurd S. S., Teller D., Fischer E. H., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 79—84.
194. Dasgupta A., Majumdar A., George A. D., Gupta N. K., (1976), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 1234—1241.
195. Dasgupta A., Das A., Roy R., Ralston R., Majumdar Am., Gupta N. K., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6054—6059.
196. de Haro C., Datta A. Ochoa S., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 243—247.
197. Mastropaolo W., Smith K., Ickowicz R., Henshaw E., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 1623.
198. de Haro C., Ochoa S., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2713—2716.

199. Matathi V. G., Mazumder R., (1978), *FEBS Lett.*, **86**, 155—159.
200. Darnbrough C., Legon S., Hunt T., Jackson R. J., (1973), *J. Mol. Biol.*, **76**, 379—403.
201. Das A., Gupta N. K., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 1433—1441.
202. Ranu R. S., London I. M., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 1079—1083.
203. Chatterjee B., Dasgupta A., Palmieri S., Gupta N. K., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6379—6387.
204. Majumdar A., Roy R., Das A., Dasgupta A., Gupta N. K., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 161—169.
205. Traugh J. A., Tahara S. M., Sharp S. B., Safer B., Merrick W. C., (1976), *Nature* **263**, 163—165.
206. Issinger O. G., Benne R., Hershey J. W. B., Traut R. R., (1976), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6471—6474.
207. Tahara S. M., Traugh J. A., Sharp S. B., Lundak T. S., Safer M., Merrick W. C., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **75**, 789—793.
208. Benne R., Edman J., Traut R. R., Hershey J. W. B., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 108—112.
209. Rychlik W., Matic-Zabala M., Zagórski W., (1979), *Acta Biochim. Polon.*, **26**, 115—122.
210. Rychlik W., Zagórski W., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **106**, 653—659.
211. Rychlik W., Kupidłowska E., Zagórski W., (1980), *Biochemistry* — w druku.
212. Kabat D., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4160—4175.
213. Kabat D., (1971), *Biochemistry* **10**, 197—203.
214. Loeb J. E., Blat C., (1970), *FEBS Lett.*, **10**, 105—108.
215. Sherton C. C., Wool I. G., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4460—4467.
216. Gressner A. M., Wool I. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6917—6925.
217. Rankine A. D., Leader D. P., (1975), *FEBS Lett.*, **52**, 284—287.
218. Leader D. P., Rankine A. D., Coia A. A., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 966—974.
219. Zinker S., Warner J. R., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1799—1807.
220. Kaerlein M., Horak I., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **90**, 463—469.
221. Bélanger G., Bellemare G., Lemieux G., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 862—868.
222. Traugh J. A., Mumby M., Traut R. R., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 373—376.
223. Cawthon M. L., Bitte L. F., Krystosek A., Kabat D., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 275—278.
224. Gressner A. M., Wool I. G., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1482—1490.
225. Traugh J. A., Sharp S. B., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3738—3744.
226. Traugh J. A., (1979), FMI-EMBO Workshop on Protein Phosphorylation and Bio-Regulation, Bazylea.
227. Blat C., Loeb J. E., (1971), *FEBS Lett.*, **18**, 124—126.
228. Gressner A. M., Wool I. G., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1500—1504.
229. Stöffler G., Wool I. G., Lin A., Rak K. H., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **71**, 4723—4726.
230. Martini O. H. W., Gould J. H., (1975), *Molec. Gen. Genet.*, **142**, 299—316.
231. Möller W., Slobin L. I., Amons R., Richter D., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4744—4748.
232. Kruijswijk T., Planta, R. J., (1975), *FEBS Lett.*, **58**, 102—105.

233. Howard G. A., Smith R. L., Gordon I., (1976), *J. Mol. Biol.*, **106**, 623—637.
234. Grankowski N., Kudlicki W., Paleń E., Gąsior E., (1976), *Acta Biochim. Polon.*, **23**, 341—352.
235. Kudlicki W., Grankowski N., Gąsior E., (1976), *Molec. Biol. Rep.*, **3**, 121—129.
236. Van Agthoven A. J., Kriek J., Amons R., Möller W., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **91**, 553—565.
237. Kruiswijk T., De Hey J. T., Planta R. J., (1978), *Biochem. J.*, **175**, 213—219.
238. Kudlicki W., Grankowski N., Gąsior E., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 493—498.
239. Leader D. P., Coia A. A., (1977), *Biochem. J.*, **162**, 199—200.
240. Kudlicki W., Szyszka R., Paleń E., Gąsior E., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **633**, 376—385.
241. Grankowski N., Kudlicki W., Gąsior E., (1977), w Translation of natural and synthetic polynucleotides, str. 317—320, red. Legocki A. B., Poznań.
242. Issinger O. G., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **477**, 185—189.
243. Kudlicki W., Szyszka R., Grankowski N., Gąsior E., (1980), praca w przygotowaniu do druku.

KORNEL NOWAK *)

Prebiałka

Preproteins

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Otrzymywanie prebiałek
- III. Sekwencje aminokwasów NH_2 -końcowej części prebiałek
- IV. Hipoteza sygnałowa

Contents

- I. Introduction
- II. Preparation of preproteins
- III. Amino acid sequences of NH_2 -terminal extensions of preproteins
- IV. Signal Hypotesis

I. Wstęp

W ostatnich kilkunastu latach stwierdzono, że wiele białek syntezowanych w komórkach, powstaje w postaci dłuższych łańcuchów polipeptydowych, aby później ulec skróceniu do postaci aktywnej biologicznie. Do takich białek należą np. proinsulina, promelityna, prokarboksypeptydaza, proelastyna i wiele innych. Należą też takie białka, które tradycyjnie noszą końcówkę „gen”, jak np. trypsynogen, pepsynogen, czy plazminogen i one właśnie nazywane są prebiałkami. Ich uczynienie biologiczne polega także na oderwaniu pro-części łańcucha polipeptydowego.

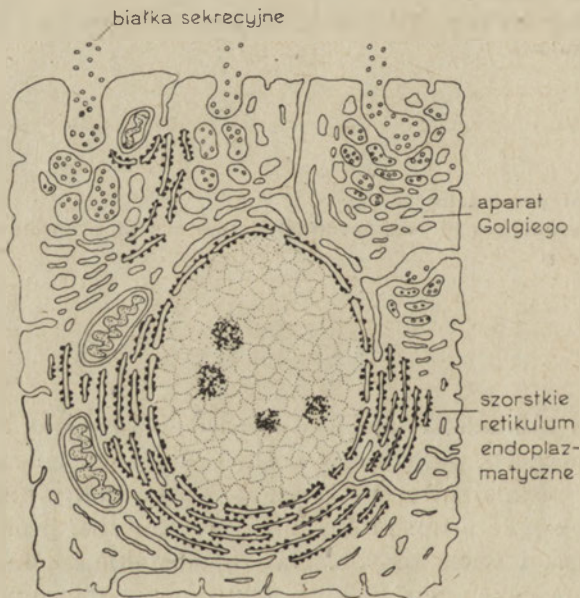
Ostatnio odkryto nowy typ sekwencji aminokwasów, występujący w początkowym odcinku łańcucha polipeptydowego licznych białek sekrecyjnych. Ten „prepeptyd” ma całkiem inne znaczenie niż „propeptyd” i w

*) Doc. dr hab., Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 10.

materiale biologicznym mogą występować prebiałka, probiałka, jak również preprobiałka. Ten stan rzeczy oraz szereg faktów dotyczących biosyntezy białek sekrecyjnych ujęto w tzw. „hipotezie sygnałowej” sformułowanej przez Blobela i Dobbersteina w 1975 roku (1). Umożliwiła ona wyjaśnienie niektórych zagadek związanych z biosyntezą białek sekrecyjnych, takich jak wybór spośród wszystkich produkowanych białek w komórce właśnie tych, które mają być wydalone poza komórkę oraz jaki jest mechanizm samego wydalania.

II. Otrzymywanie prebiałek

Według współczesnych poglądów, opartych głównie na badaniach histologicznych, komórki które wytwarzają białka sekrecyjne wydala je do światła retikulum endoplazmatycznego, a stamtąd do aparatu Golgiego i wreszcie na zewnątrz komórki najczęściej na drodze egzocytozy (2) (Ryc. 1).



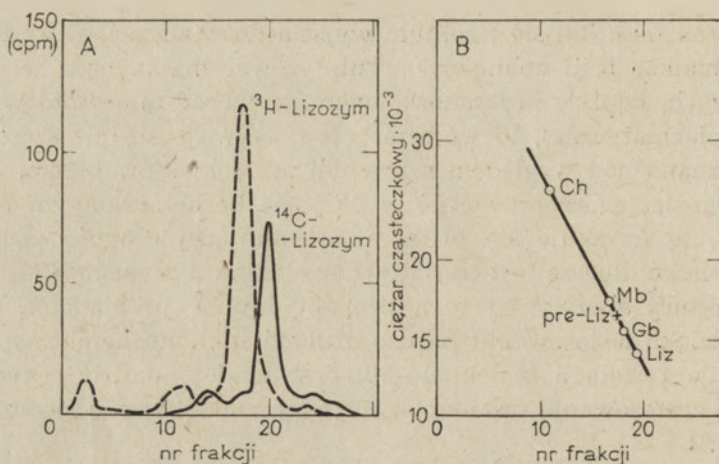
Ryc. 1. Komórka sekrecyjna zwierzęca.

Szczegóły tego procesu nie są do dzisiaj dokładnie poznane, chociaż „hipoteza sygnałowa” stara się wyjaśnić niektóre z nich, zwłaszcza te dotyczące wyboru białka sekrecyjnego spośród wszystkich syntezowanych w komórce białek oraz transportu przez błonę endoplazmatyczną.

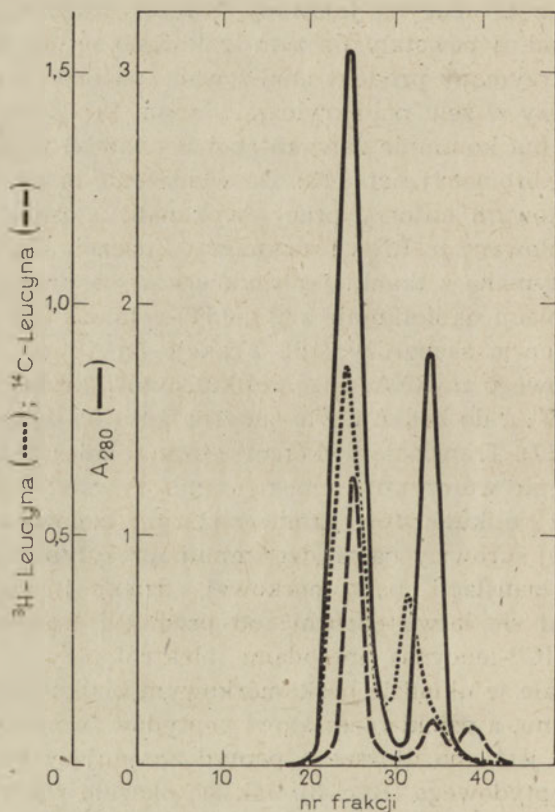
Większość białek sekrecyjnych powstaje przy udziale rybosomów związanych z retikulum endoplazmatycznym szorstkim, (Ryc. 1). Ten zna-

ny od dawna fakt stał się punktem wyjścia doświadczeń, w których wykryto prebiałka. Jeśli mianowicie syntetyzować białka bądź w układach komórkowych, bądź w bezkomórkowych ale wobec mikrosomów (retikulum endoplazmatyczne), to wówczas nie obserwuje się nic szczególnego, powstaje znane pod względem sekwencji aminokwasów białko. Jeśli natomiast translację przeprowadzić w układzie bezkomórkowym i bez mikrosomów, to uzyskuje się białko o zaskakującej długości. Otrzymane wówczas białko dłuższe jest od natywnego białka o prepeptyd (1, 3). Ustalenie struktury pierwotnej tych prepeptydów w prebiałkach stało się możliwe dzięki zastosowaniu bardzo czułych immunochemicznych metod wykrywania i izolacji białek (4—10) oraz czulej analizie sekwencyjnej opartej na zastosowaniu promieniotwórczych aminokwasów podczas translacji (4—12).

Przykładem badań prowadzących do wykrycia prebiałka może być izolacja i ustalenie sekwencji preczęści w lizozymie (5), wytwarzanego w jajowodach kurcząt. Doświadczenie *in vivo* przeprowadzono w ten sposób, że inkubowano z C^{14} -leucyną jajowody kurcząt długotrwale stymulowanych estrogenami, a powstały lizozym izolowano na drodze immunoprecypitacji (4). Otrzymany produkt analizowano na obecność lizozymu metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym. Przeprowadzono również chromatografię (na kolumnie zawierającej Sephadex) produktów rozszepienia lizozymu bromocyjanem (13). Doświadczenie *in vitro*, czyli w układzie bezkomórkowym autorzy pracy wykonali, stosując do translacji wcześniej wyizolowany m-RNA lizozymowy. Znacznie oczyszczony matrycowy RNA otrzymano z tkanki jajowodów kur, na drodze strącania magnezem (14), izolacji na kolumnie z oligo(dT)-celulozą (15) oraz frakcjonowaniu w gradiencie sacharozy (16). Frakcje od 7S do 12S użyto jako źródło lizozymowego m-RNA. Lizę retikulocytów króliczych przeprowadzono wodą w 0° , a do badań użyto supernatantu po odwirowaniu szczątków komórek (17). Translację wykonano stosując mieszaninę m-RNA z lizatami i promieniotwórczymi aminokwasami. Powstały w układzie bezkomórkowym z retikulocytów królika lizozym izolowano przy pomocy antylizozymowej surowicy na drodze immunoprecypitacji (16). Produkt otrzymany z translacji bezkomórkowej, dzięki innemu znakowaniu (H^3 -leucyną) dał się łatwo odróżnić od produktu translacji w układzie komórkowym (C^{14} -leucyną) metodami elektroforezy i chromatografii (Ryc. 2). Powstałe w układzie bezkomórkowym białko jest cięższe od natywnego lizozymu, a dzięki rozdziałowi peptydów bromocyjanowych wiadomo także, że jest ono dłuższe o peptyd znajdujący się przy N-końcu łańcucha polipeptydowego (Ryc. 3). Jak się okazało rozdział prelizozymu od lizozymu możliwy był tylko za pomocą elektroforezy w 15% żelu poliakryloamidowym, gdyż w 10% żelu oba białka migrują z taką samą szybkością. Fakt ten był zresztą przyczyną nieudanych wyników tak samo przeprowadzonych doświadczeń 3 lata wcześniej (18).



Ryc. 2. Rozdział produktów syntezy komórkowej (^3H -lizozym, pre-liz) i bezkomórkowej (^{14}C -lizozym, liz) na kolumnie z *Sephadex* G-100 (A) oraz elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym (B).



Ryc. 3. Rozdział peptydów bromocyjanowych otrzymanych z lizozymu (^{14}C -leucyna) i prelizozymu (^3H -leucyna) na kolumnie z *Sephadex* G-75.

Fracje 20 do 28 zawierają C-końcowe peptydy bromocyjanowe lizozymu i prelizozymu. Fracje od 28 do 36 zawierają różniące się masą cząsteczkową N-końcowe peptydy bromocyjanowe lizozymu (—) i prelizozymu (....) (5).

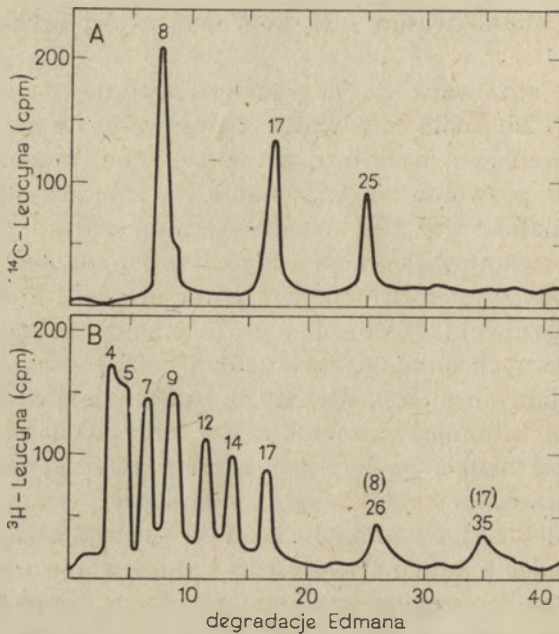
III. Sekwencje aminokwasów NH_2 -końcowej części prebiałek

Powszechnie stosowana do degradacji peptydów i białek metoda Edmana (19, 20) znalazła również zastosowanie w analizie sekwencji aminokwasów prebiałek. Było to możliwe tylko dzięki zautomatyzowaniu procesu (21), co pozwoliło na wykonanie do kilkudziesięciu degradacji jednej próbki białka, oraz dzięki zastosowaniu czułych metod rozdziału i identyfikacji produktów degradacji tj. fenyltiohydantoin aminokwasów, takich jak metody wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (22, 23), chromatografii gazowej (24), chromatografii jonowymiennej po uprzedniej hydrolizie do wolnych aminokwasów (25), wreszcie pomiary radioaktywności tych pochodnych (5, 26). Metody te umożliwiają oznaczenie N-końcowej sekwencji kilkunastu aminokwasów przy użyciu mniejszych niż pikomolowe ilości białka. Są to ilości, które zazwyczaj izoluje się w doświadczeniach translacyjnych metodą immunoprecypitacji (5).

W celu ustalenia ilości aminokwasów w prepeptydzie, metodą automatycznej degradacji Edmana, wystarczy oznakowanie podczas translacji prebiałka lub białka jednym promieniotwórczym aminokwasem, takim który występuje często w strukturze pierwotnej białek. Wówczas rozmieszczenie takiego znacznika w kolejnych etapach degradacyjnych prebiałka i białka jednoznacznie wskazuje na długość prepeptydu. W przypadku oznaczania długości prepeptydu w prelizozymie (5) posłużono się w translacji bezkomórkowej H^3 -leucyną a w translacji komórkowej C^{14} -leucyną i dlatego w wyniku degradacji Edmana uzyskano rozkład obu promieniotwórczych leucyn w początkowej sekwencji prelizozymu i lizozymu (Ryc. 4). Leucyna w pozycji 26 prelizozymu odpowiada leucynie w pozycji 8 lizozymu a leucyna z pozycji 35 — leucynie 17, co wskazuje, że prepeptyd obejmuje 17 aminokwasów.

Do istotnych problemów związanych z oznaczeniem sekwencji prepeptydu należy stwierdzenie, czy jest on pierwotnym produktem translacji m-RNA, tzn. czy jeśli się zaczyna od N-końcowej metioniny to jest to metionina inicjująca. W przypadku prelizozymu problem ten rozwiązano stosując w translacji bezkomórkowej Met-tRNA z metioniną znakowaną promieniotwórczym izotopem siarki (5). W wyizolowanym prelizozymie już w pierwszej degradacji Edmana stwierdzono obecność promieniotwórczej pochodnej metioniny, a tym samym początek translacji.

Posługując się kompletem znakowanych aminokwasów oraz wyżej przedstawionymi metodami analizy sekwencyjnej oznaczono struktury pierwotne N-końcowych fragmentów licznych prebiałek. Poznano sekwencje aminokwasów prepeptydów prelizozymu (5), preowomukoidu (27, 28), prekonalbuminy (29), preuteroglobiny (30), preamylazy (31), preglikoproteidu błonowego (32) oraz niektórych preprobiałek jak prepromelityna (33), pretrypsynogen i preprokarboksypeptydaza (3), preproinsulina (34), preproparathormon (35), preproalbumina (36), preprolaktyna



Ryc. 4. Kolejność ułożenia leucyn w łańcuchu polipeptydowym lizozymu (C^{14} -leucyna) A i prelizozymu (H^3 -leucyna) B wynikająca z degradacji Edmanna obu białek (5).

(37—40), preprokolagen (41), preprokortykotropina (42), preooksydaza cytochromowa (43, 44), preprogonadotropina (hCG) (26), a także prekursorów lekkich łańcuchów immunoglobulin (45—47). Nie jest też wykluczone, że również białka błony zewnętrznej prokariotów produkowane są jako prebiałka. Stwierdzono mianowicie, że lipoproteina błony zewnętrznej gram-ujemnych bakterii powstaje w postaci dłuższej o 20 aminokwasów (48). W postaci dłuższej powstaje także ATP-aza przestrzeni periplazmatycznej tych bakterii (49).

Na podstawie znajomości sekwencji aminokwasów prepeptydów możliwe są pewne uogólnienia dotyczące ich budowy i własności. Szczególnie zwraca uwagę (Tabela 1) znaczna zawartość aminokwasów hydrofobowych, a więc takich, jak leucyna, walina, izoleucyna, metionina i fenylalanina oraz podobna długość sekwencji wynosząca od 15 do 30 aminokwasów.

Liczba aminokwasów hydrofobowych w części prepeptydowej jest znacznie większa niż w pozostałej części prebiałka, i wynosi ona w pretrypsynogenie 87,5% wszystkich aminokwasów prepeptydu, w preowomukoidzie co najmniej 87,5%, w prelizozymie 83%, a w prepromelitynie co najmniej 71,5%. W bezpośrednim sąsiedztwie inicjującej metioniny występuje na ogół aminokwas zasadowy, lizyna lub arginina (Tabela 1). Natomiast C-koniec prepeptydu nie wyróżnia się jakimś szczególnym charakterem, gdyż występują tam raczej aminokwasy obojętne (treonina, glicyna, alanina, czy cysteina).

Tabela 1.

N-końcowe sekwencje aminokwasów w prebiałkach

		miejsce działania peptydaz sygnatowych
preowomukoid (28)	M-A-M-A-G-V-F-V-L-F-S-F-V-L-C-G-F-L-P-D-A-A-F-G-A-E-V-	-10 -1 ↓ 1 2 3
prelizozym (5)	M-R-S-L-L-Y-L-V-L-C-F-L-P-L-A-A-L-G-K-V-F-	↓
prekonalbumina (29)	M-K-L-I-L-C-X-V-L-X-L-G-I-A-A-X-C-F-A-A-P-P-	↓
preuteroglobina (30)	M-K-L-A-I-T-L-A-L-V-T-L-A-L-L-C-S-P-A-S-A-G-I-C-	↓
preglikoproteid (32)	M-K-C-L-L-Y-L-A-F-L-F-I-H-V-N-C-K-F-	↓
prelipoproteid (48)	M-K-A-T-K-L-V-L-G-A-V-I-L-G-S-T-L-L-A-G-C-S-S-	↓
preprolaktyna (40)	M-N-S-Q-V-S-A-R-K-A-G-T-L-L-L-M-S-N-L-L-F-C-Q-N-V-Q-T-L-	↓
prepromelityna (33)	M-K-F-L-V-X-V-A-L-V-F-M-V-Y-I-X-Y-I-Y-A-A-P-E-	↓
pretrypsynogen (3)	A-K-L-F-L-F-L-A-F-L-L-A-Y-V-A-F-P-L-D-	↓
preprokarboksypeptydaza (3)	A-K-L-F-L-L-L-A-F-L-L-A-Y-V-A-F-	↓
preproinsulina (34)	X-L-K-M-X-F-L-F-L-K-L-L-X-L-X-X-X-X-X-X-X-X-X-F-V-K-	↓
	prepeptyd	białko

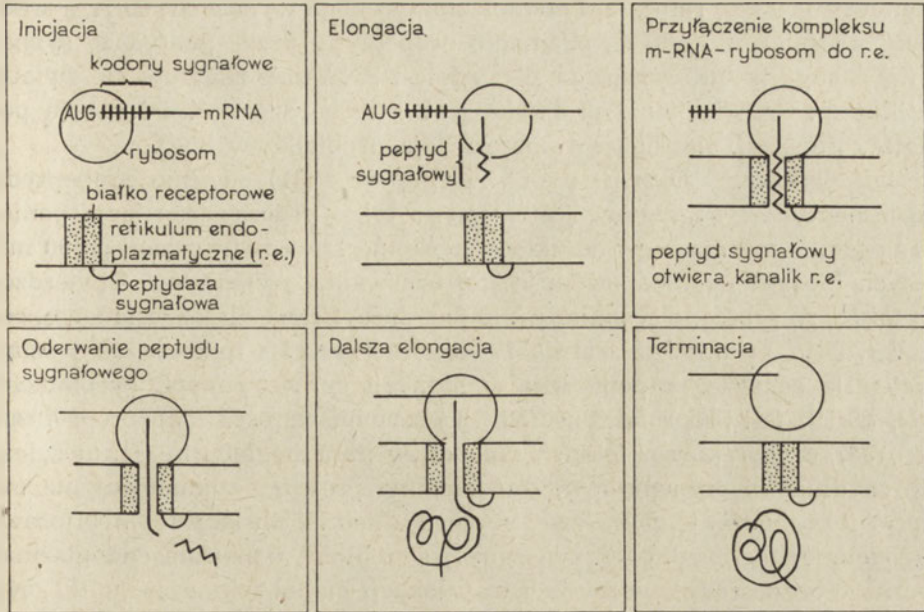
Porównując sekwencję aminokwasów prepeptydów prebiałek wyizolowanych z tej samej tkanki stwierdza się często homologię tych sekwencji, tak jak ma to miejsce w pretrypsynogenie i preprokarboksypeptydazie z trzustki psa, lub w prelizozymie i preowomukoidzie z jajowodu kury (Tabela 1). Nie zaobserwowano natomiast żadnej homologii sekwencji aminokwasów prepeptydów w prebiałkach wyizolowanych ze zwierząt różnych gatunków, chociaż zbyt mała ilość znanych sekwencji prepeptydów uniemożliwia stwierdzenie tego z całą pewnością.

Białka sekrecyjne powstają tylko wówczas w komórce, gdy układ translacji, a więc m-RNA wraz z rybosomami są związane z błoną retikulum endoplazmatycznego. Ponieważ powstający na początku translacji prepeptyd ma właściwości silnie lipofilne można przypuszczać, że właśnie on jest niezbędny w procesie wiązania rybosomu do retikulum endoplazmatycznego.

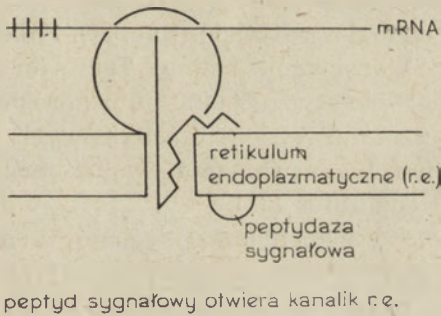
IV. Hipoteza sygnałowa

Odkrycie pierwszych prebiałek skłoniło Blobela i Dobbertsteina (1) do sformułowania przypuszczalnej roli prepeptydów, wyrażonej w postaci tzw. hipotezy sygnałowej. Według niej informacyjny kwas rybonukleinowy odpowiedni dla syntezy białka sekrecyjnego zawiera bezpośrednio za kodonem inicjującym grupę kodonów sygnałowych, które podczas translacji zostają odczytane jako sekwencja sygnałowa czyli prepeptyd. Jest on sygnałem, dzięki któremu powstaje kompleks układu translacji z retikulum endoplazmatycznym, równocześnie pozwala to na otwarcie się kanalika w błonie retikulum, przez który przechodzi syntetyzowane białko do światła retikulum endoplazmatycznego. Zgodnie z powyższym translacja rozpoczyna się na dowolnym rybosomie, który jeszcze podczas syntezy prepeptydu zostaje związany z retikulum (Ryc. 5a i 5b) i jedynie to przyłączenie umożliwia dalszą translację białka i jego przejście przez błonę (Ryc. 5c).

Mechanizm wiązania prepeptydu z retikulum, jak i mechanizm jego przejścia przez błonę nie są znane. Blobel i Dobbertstein przyjęli, że w błonie występuje specjalny receptor wiązania prepeptydu i w tym właśnie miejscu otwiera się kanalik, przez który przechodzi najpierw część prepeptydowa łańcucha polipeptydowego a następnie całe białko. Inny mechanizm transportu proponuje Inouye ze współpracownikami (50) w przypadku prelipoproteidu błony zewnętrznej bakterii. Według tych autorów powstający podczas translacji początkowy odcinek prepeptydu tworzy wiązanie jonowe z resztami fosforanowymi błony retikulum w dowolnym miejscu tej błony, dzięki obecności aminokwasów zasadowych blisko N-końca prepeptydu. Dalsza translacja powoduje wnikięcie reszty prepeptydu w błonę i pociągnięcie za sobą syntetyzowanego białka (Ryc. 6).



Ryc. 5. Model objaśniający syntezę i transport przez błonę retikulum białek sekrecyjnych, oparty na hipotezie sygnałowej Blobela i Dobbersteina (1).



Ryc. 6. Inny niż na rycinie 5 sposób przyłączania kompleksu translacyjnego m-RNA-rybosom do błony retikulum endoplazmatycznego i otwierania kanałika (51).

Według obu przedstawionych hipotez, aby białko po przejściu przez błonę mogło przyjąć naturalną konformację, prepeptyd zostaje odcięty działaniem specjalnej peptydazy sygnałowej (1, 3) (Ryc. 5d). Zastosowanie promieniotwórczych aminokwasów do translacji prelizozymu równocześnie z izolacją polirybosomów w różnych momentach tej biosyntezy, pozwoliło na ustalenie przybliżonego momentu odrywania prepeptydu od prebiałka (5). Otóż następuje to wtedy, gdy utworzony łańcuch polipeptydowy ma długość około 57 aminokwasów. Przyjmując, że powstający łańcuch polipeptydowy jest w konformacji całkowicie rozwiniętej, będzie on miał długość ok. 200 Å, w tym długość prepeptydu wynosi 67 Å.

Ponieważ grubość retikulum endoplazmatycznego wynosi ok. 60 Å, a średnica rybosomu ok. 100 Å, odcinanie prepeptydu przez peptydazę sygnałową następuje tak daleko od peptydylo-t-RNA jak znajduje się światło retikulum. Czas istnienia prebiałka jest więc bardzo krótki i już na początku translacji następuje transformacja prebiałka w białko.

Jak wykazali Dorner i Kemper (51) odcięcie prepeptydu przez peptydazę sygnałową jest możliwe tylko podczas translacji, ponieważ dodanie mikrosomów do układu bezkomórkowego translacji po 90 minutach biosyntezy nie powoduje już oderwania prepeptydu. Stwierdzono także, że proteaza sygnałowa nie jest specyficzna dla określonego prebiałka, gdyż w układzie translacji bezkomórkowej z mikrosomami psimi następuje odcięcie prepeptydów w różnych syntezowanych prebiałkach (51), takich jak preprolaktyna (52), prehormon wzrostu (52), preproinsulina (53), czy prekursor lekkich łańcuchów immunoglobulin (1), niezależnie od długości prepeptydów. Na działanie proteazy sygnałowej nie ma wpływu pochodzenie gatunkowe użytego układu translacji (51). Najprawdopodobniej też enzym ten związany jest z błoną retikulum endoplazmatycznego bezpośrednio w miejscu translokacji białka sekrecyjnego (51, 54).

Translokacja łańcucha polipeptydowego przez błonę zachodzi być może dzięki energii wyzwanej podczas translacji, bądź dzięki tworzeniu się struktury trzeciorzędowej białka (Ryc. 5e). Tak więc powstające białko sekrecyjne uzyskuje właściwą mu naturalną konformację po przejściu przez retikulum endoplazmatyczne (Ryc. 5f). Zabezpiecza to też przed procesem odwrotnej translokacji białka. Ten sam sposób translokacji białek sekrecyjnych wykryty u eukariontów różnych gatunków, jak również sposób umieszczania białek transbłonowych prokariontów wskazują na znaczny stopień konserwatywności ewolucyjnego tego procesu, oraz na jego uniwersalny charakter (32).

Opublikowana w 1975 roku hipoteza sygnałowa Blobela i Dobbersteina (1) tłumaczy wiele poznanych później faktów dotyczących białek sekrecyjnych i właściwie można już uważać ją dziś za teorię, a nie hipotezę. Szczególnie prosto teoria ta tłumaczy fakt tak późnego wykrycia prebiałek, twórców istniejących bardzo krótko, bo tylko w początkowej fazie translacji. Jej ogólne znaczenie potwierdzono w wielu przykładach biosyntezy białek, między innymi białek sekrecyjnych o różnym charakterze biologicznym. Można się spodziewać, że konsekwencją teorii będzie wykrycie w przyszłości dalszych prebiałek a także nie poznanych dotychczas proteaz sygnałowych oraz rozpoznanie mechanizmu samej translokacji przez retikulum endoplazmatyczne.

PIŚMIENICTWO

1. Blobel G., Dobberstein B. J., (1975), *J. Cell. Biol.*, **67**, 835—851.
2. Palade G., (1975), *Science*, **189**, 347—358.
3. Devillers-Thiery A., Kindt T., Scheele G., Blobel G., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 5016—5020.
4. Palmiter R. D., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6450—6458.
5. Palmiter R. D., Gagon J., Ericsson L. H., Walsh K. A., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6386—6393.
6. Bielińska M., Boime I., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 1768—1772.
7. Hirashima A., Wang S., Inouye M., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, **71**, 4149—4153.
8. Halegoua S., Hirashima A., Sekizawa J., Inouye M., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **69**, 163—167.
9. Halegoua S., Sekizawa J., Inouye M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2324—2330.
10. Lingappa V. R., Lingappa J. R., Prasad R., Ebner K. E., Blobel G., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 2338—2342.
11. Edman P., Begg G., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80—91.
12. Burstein Y., Kantor F., Schechter I., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **73**, 2604—2608.
13. Gross E., Witkop B., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 1856.
14. Palmiter R. D., (1974), *Biochemistry* **13**, 3606—3615.
15. Krytosek A., Cawthon M. L., Kabat D., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6077—6084.
16. Palmiter R. D., Smith L. T., (1973), *Mol. Biol. Rep.*, **1**, 129—134.
17. Palmiter R. D., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2095—2106.
18. Palmiter R. D., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6779—6787.
19. Edman P., (1950), *Acta Chim. Scand.*, **4**, 283—290.
20. Edman P., (1950), *Acta Chim. Scand.*, **4**, 277—282.
21. Edman P., Begg G., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80—91.
22. Bollet C., Cande M., (1976), **121**, 323.
23. Bridgen P. J., Cross G. A. M., Bridgen J., (1976), *Nature*, **263**, 613, 614.
24. Pisano J. J., van den Heuvel W. J. A., Horning E. C., (1962), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 82.
25. Smithies O., Gibson D., Fanning E. M., Goodfliesh R. M., Gilman J. C., Ballantyne D. L., (1971), *Biochemistry* **10**, 4912—4921.
26. Birken S., Fetherston J., Desmond J., Canfield R., Boime I., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1247—1253.
27. Thibodeau S. N., Gagnou J., Balmiter R. D., (1977), *Fed. Proc.*, **36**, 656.
28. Thibodeau S. N., Palmiter R. D., Walsh K. A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 9018—9023.
29. Thibodeau S. N., Lee D. C., Palmiter R. D., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3771—3774.
30. Malsky M. L., Bullock D. W., Willard J. I., Ward D. N., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1580—1585.
31. Gorecki M., Zeelon E. P., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 525—529.
32. Lingappa V. R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8667—8670.
33. Kreil G., Suchanek G., Kaschnitz R., Kindas-Mugge I., (1978), 11-th Meeting of Federation of European Biochemical Societies, Copenhagen 1979, Pergamon Press, Oxford, New York, Magnusson S., ed., t. 47, 79—88.

34. Chan S. J., Keim P., Steiner D. F., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1964—1968.
35. Kemper B., Habener J. F., Ernst M. D., Potts J. T. Jr., Rich A., (1976), *Biochemistry*, **15**, 15—19.
36. Strauss A. W., Bennett C. D., Donohue A. M., Rodkey J. A., Alberts A. W., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6846—6855.
37. Maurer R. A., Górski J., McKean D. J., (1977), *Biochem. J.*, **161**, 189.
38. Birken S., Smith D. L., Canfield R. E., Boime I., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 106—112.
39. Maurer R. A., Stone R., Górski J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2801.
40. McKean D. J., Maurer R. A., (1978), *Biochemistry*, **17**, 5215—5219.
41. Palmiter R. D., Davidson J. M., Gagnon J., Rowe D. W., Bornstein P., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1433—1436.
42. Haralson M. A., Fairfield S. J., Nicholson W. E., Harrison R. W., Orth D. N., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2172—2175.
43. Landefeld T., McWilliams D., Boime I., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 381—390.
44. Ries C., Hundt E., Kadenbach B., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **91**, 179—191.
45. Burstein Y., Schechter I., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 716.
46. Schechter I., Burstein Y., Zemell R., (1977), *Immunol. Rev.*, **36**, 3—28.
47. Schechter I., Burstein Y., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3273—3277.
48. Inouye S., Wang S., Sekizawa J., Halegoua S., Inouye M., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1004—1008.
49. Inouye H., Beckwith J., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1440—1444.
50. DiRienzo J. M., Nakamura K., Inouye M., (1978), *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 481—532.
51. Dorner A. J., Kemper B., (1978), *Biochemistry*, **17**, 5550—5555.
52. Langappa V. R., Devilliers-Thiery A., Blobel G., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2432—2436.
53. Schields D., Blobel G., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2059—2063.
54. Jackson R. C., Blobel G., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5598—5602.

ANNA KRÓWCZYŃSKA *)

Charakterystyczne sekwencje nukleotydowe w heterogennym jądrowym RNA

Specific Nucleotide Sequences in Heterogeneous Nuclear RNA

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Modyfikacje końca 5' hnRNA
- III. Modyfikacje końca 3' hnRNA
- IV. Transkrybowane sekwencje oligonukleotydowe
- IV-1. Odcinki oligo (A)
- IV-2. Odcinki oligo (U)
- V. Struktura drugorzędowa hnRNA
- V-1. Odcinki dwuniciowego RNA
- V-2. Pochodzenie odcinków dwuniciowego RNA
- V-3. Biologiczna rola dwuniciowego RNA

Contents

- I. Introduction
- II. 5' terminal modification of hnRNA
- III. 3' terminal modification of hnRNA
- IV. Transcribed oligonucleotide sequences
- IV-1. Oligo (A) sequences
- IV-2. Oligo (U) sequences
- V. Regions of secondary structure in hnRNA

*) Mgr Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: RNA — kwas rybonukleinowy, hnRNA — heterogenny jądrowy RNA, mRNA — informacyjny RNA, rRNA — rybosomalny RNA, pre — (mRNA lub rRNA) — prekursorowy mRNA lub rRNA, dsRNA — dwuniciowy RNA, poli(A)⁺mRNA — hnRNA zawierający odcinki poli(A), nRNP — jądrowe kompleksy rybonukleoproteinowe, RNazy — rybonukleazy, A — adenina, U — uracyl, G — guanina, oligo (A lub U) — oligonukleotydy zawierające zasadę A lub U, poli(A) — kwas poliadenylowy, AMP — adenylozynomonofosforan, GMP — guanozynomonofosforan, GTP — guanozynotrójfosforan, m⁶A — N⁶ metyloadenozyna, dA — dezoksyadenina, dT — dezoksytymidyna, DNA — kwas dezoksyrybonukleinowy.

V-1. Double stranded structure in hnRNA**V-2. Origin of double stranded structure in hnRNA****V-3. Biological role of double stranded sequences in hnRNA****I. Wstęp**

Pierwszym etapem ekspresji genu jest transkrypcja, czyli synteza łańcucha polirybonukleotydowego o sekwencji komplementarnej z jedną z dwóch nici fragmentu DNA służącego jako matryca. W komórce eukariotycznej dojrzałe, funkcjonalne cząsteczki RNA powstają w wyniku szeregu modyfikacji jakim poddawane są pierwotne produkty transkrypcji. W nukleoplazmie występuje zatem polidispersyjna populacja RNA, w skład której wchodzi krótko żyjące pierwotne transkrypty obok form pośrednich i dojrzałego RNA. Nierybosomowa część tej populacji kwasów rybonukleinowych nazywana jest heterogennym jądrowym RNA (hnRNA). Jako cechy charakterystyczne hnRNA wymienia się zwykle:

- a) jądrowe występowanie,
- b) heterogenność co do wielkości (5.000 do 50.000 nukleotydów (1—8, 18),
- c) szybkie wyznakowanie radioaktywnymi prekursorami,
- d) obecność zarówno powtarzalnych sekwencji nukleotydowych, jak i też sekwencji unikalnych charakterystycznych dla genów struktury.

Badania losów informacyjnego RNA od momentu transkrypcji w jądrze, aż do translacji na polirybosomach, a zwłaszcza poszukiwania (metodą hybrydyzacji) analogii pomiędzy pierwszorzędową strukturą DNA. RNA jądrowych i cytoplazmatycznych mRNA nasunęły przypuszczenie o pochodzeniu mRNA z hnRNA.

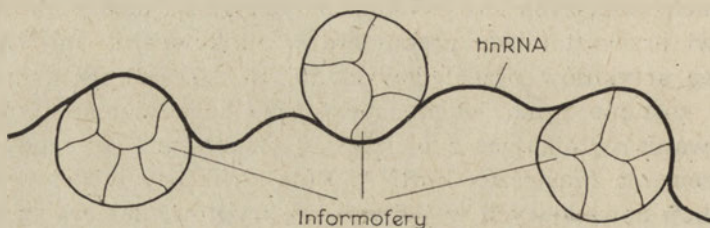
W stosunku do populacji mRNA liczących od 4.000 nukleotydów cząsteczki stanowiące populację hnRNA są co najmniej 10-krotnie większe (11, 25). Wielkość prekursorowych mRNA (pre-mRNA) jest jednak przedmiotem kontrowersji. Niektórzy badacze (9—11, 12, 13—15, 30) uważają, że wielkość cząsteczkowe transkrypty tworzące hnRNA są prekursorami funkcjonalnych mRNA, zaś inni (16) są odmiennego zdania i sądzą, że rozmiary pre-mRNA i mRNA są zbliżone. Przebieg hybrydyzacji hnRNA z komplementarnymi DNA (cDNA) otrzymanymi przy użyciu rewertazy z transkrypcji mRNA wskazuje, że globinowy mRNA posiada wielkość cząsteczkowy prekursor (151), podczas gdy pre-mRNA owoalbuminy jest niewiele większy od funkcjonalnego mRNA (152). Wydaje się, że wielkość prekursora jest swoista dla danego mRNA i wynika zapewne z odmiennego przebiegu dojrzewania mRNA. Można też sądzić, że istnieje w tej mierze swoistość gatunkowa: w komórkach HeLa (32) wysokocząsteczkowe prekursorów informacyjnych RNA, a niskocząsteczkowe u *Dictyostelium discoideum* (63). Może to odzwierciedlać różne sposoby regulacji syntezy mRNA.

Szereg danych potwierdza, że hnRNA jest prekursorem mRNA. Należą do nich między innymi wspólna obecność sekwencji poli(A) przy końcach 3' w cząsteczkach hnRNA i mRNA (10), analogia sekwencji nukleotydowych występujących w obu rodzajach RNA (20, 22, 23), wspomniane już wyniki badań hybrydyzacji hnRNA i cDNA (21), translacja *in vitro* hnRNA (144, 145), obecność zablokowanego, zmetylowanego końca 5' w hnRNA i mRNA (30), a także wyniki doświadczeń nad komórkami transformowanymi wirusami SV40 i adenowirusem — 2 potwierdzające transkrypcję sekwencji wirusowych w formie wysokocząsteczkowych hnRNA o rozmiarach większych niż cytoplazmatyczny, wirusowy mRNA (142). Problemowi przekształcania prekursora w funkcjonalny mRNA poświęcono szereg artykułów przeglądowych (9, 10, 24—30). W tym artykule poruszony zostanie tylko jeden aspekt tego zagadnienia, a mianowicie uwarunkowania wynikające z pierwotnej struktury i jej modyfikacji w toku dojrzewania cząsteczek hnRNA. Rola struktury w determinowaniu losu i funkcji powstających w jądrze transkryptów, nabiera szczególnego znaczenia, jeśli zważyć, że większość cząsteczek hnRNA ulega szybkiej degradacji wewnątrz jądra, a tylko niewielka ich część odnajdywana jest w cytoplazmie (5, 8, 17). Zaledwie 10—20% całego hnRNA można uważać za potencjalne prekursory mRNA (29), rola natomiast pozostałej, przeważającej części tej populacji jądrowego RNA jest nieznana (19, 20, 31, 32).

Cząsteczka hnRNA ulega licznym potranskrypcyjnym modyfikacjom, których przebiegu wprawdzie jeszcze dokładnie nie znamy, lecz których pewne etapy już opisano. Należą do nich między innymi: podział prekursora na mniejsze cząsteczki pod działaniem nukleaz, oraz usuwanie z niego pewnych sekwencji, a także przyłączanie do transkryptu nowych charakterystycznych sekwencji. Nowe sekwencje dołączane są do obydwu końców łańcucha polirybonukleotydowego nazywanych końcami 3' i 5'. Nazwa pochodzi od obecności odpowiednio przy 3' lub 5' węgla rybozy skrajnego nukleotydu wolnej grupy OH (nie biorącej udziału w wiązaniu między nukleotydowym). Ponieważ w pierwotnym produkcie transkrypcji grupa OH końca 5' jest zestryfikowana trójfosforanem, a grupa OH końca 3' pozostaje wolna, modyfikacje obu końców mają odmienny charakter. Sekwencje przyłączane do 3' końca są to odcinki poli(A) o długości 100—200 nukleotydów, natomiast zmiany końca 5' są bardziej złożone i prowadzą do przyłączenia nowej reszty nukleotydowej, najczęściej 7-metyloguanylowej.

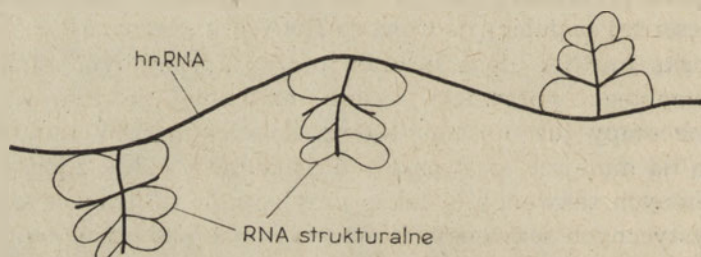
W jądrze komórkowym hnRNA tworzy zapewne kompleksy z białkami. Kompleksy takie zwane są rybonukleinoproteinami jądrowymi (nRNP). Z oczyszczonych jąder wyodrębnia się hnRNA w postaci nRNP stosując ekstrakcję izotonicznym buforem o pH 8 w obecności inhibitora nukleaz (33) lub sonifikację w 0.35 M roztworze sacharozy, a następnie wirowanie w gradiencie sacharozy (34). Doniesienia na temat ilości i wielkości białek połączonych z kwasami nukleinowymi w nRNP (patrz prace

przeładowe 35, 36) są często rozbieżne, co zapewne wynika z różnic w przebiegu izolowania nRNP, a także z zanieczyszczeń cytoplazmatycznych, których nie można uniknąć posługując się znanymi dotąd metodami. Trudno zatem określić, jak wiele białek związanych z RNA występuje w nRNP *in vivo*, a ile przyłączyło się w trakcie izolowania. W wyniku bowiem elektrostatycznych oddziaływań bardziej lub mniej zasadowe białka mogą łączyć się z RNA jako heteropolianionem. Większość badaczy opisuje występowanie w nRNP różnych białek o ciężarze cząsteczko-



Ryc. 1. Model struktury nRNP wg Samariny i współ. (33)

Informofery — cząsteczki białka o wielkości 30 S składające się z 20—40 identycznych polipeptydów każdy o masie 40.000 D. HnRNA zlokalizowane jest na powierzchni białek.



Ryc. 2. Model struktury nRNP wg Sekerisa i Niessinga (38)

Wewnątrz kompleksów białkowych znajduje się niskocząsteczkowe, długożyjące RNA, które zapewne pełni rolę strukturalną w formowaniu monocząsteczki. Monocząsteczki połączone są w większą strukturę za pomocą hnRNA.

wym od 22.000 do 150.000. Pomimo znacznych różnic w ciężarze cząsteczkowym białek zaznacza się przewaga składnika około 40.000. Zaproponowano też kilka modeli struktur nRNP. Pierwszy model przedstawiony przez Samarinę i współ. (33) postuluje występowanie cząsteczek białka o wielkości 30 S zwanych informoferami na powierzchni których znajduje się hnRNA. Stevenin i Jacob (37) zaproponowali model pofałdowanego pasma rybonukleoproteinowego (ang. *folded ribonucleoprotein strand*), według którego część łańcucha RNA osłaniana jest przez cząsteczki białkowe o bardzo różnej wielkości. Następnie Sekeris i Niessing (38) zaproponowali budowę nRNP przedstawioną na rycinie 2. Badacze ci znaleźli w nRNP oprócz szybkoznakującego się RNA o dużym ciężarze cząsteczkowym również długo żyjący RNA niskoczą-

steczkowy. Przypuszczają oni, że ten ostatni znajduje się wewnątrz mono-cząsteczek białkowych połączonych w większą strukturę przez przycepi-
one do ich powierzchni długie hnRNA. Obszernie o strukturze i funkcji
nRNP mówią artykuły przeglądowe (35, 36).

Dla zrozumienia roli, jaką pełni hnRNA, jak i dokładnego poznania
przebiegu potranskrypcyjnych przekształceń tej populacji cząsteczek
istotne jest poznanie ich zarówno pierwszo-, jak i drugorzędowej struk-
tury. Różnorodność i wybiórczość przemian transkryptu pierwotnego,
a także jego oddziaływanie z białkami nasuwa przypuszczenie, że jego
cząsteczka posiada szereg charakterystycznych sekwencji nukleotydo-
wych pełniących rolę sygnałów informacyjnych, które określają jej losy
i funkcje. Dlatego też szczególnie wiele uwagi poświęca się nie tylko
sekwencjom informacyjnym przekazywanym do cytoplazmy jako mRNA,
lecz również strukturze hnRNA. Stąd wynika zainteresowanie wewnątrz-
cząsteczkowymi sekwencjami typu oligo (A) i oligo (U) transkrybowan-
ym z matrycy DNA, potranskrypcyjnymi modyfikacjami końców 3' i 5'
oraz komplementarnymi odcinkami RNA, które tworząc odcinki dwuni-
ciowe utrzymują strukturę drugorzędową cząsteczek. Wymienione wyżej
szczegóły budowy i modyfikacje hnRNA są głównym przedmiotem tego
artykułu.

II. Modyfikacje 5' końca hnRNA

Substratami w syntezie RNA są nukleozydotrójfosforany, a ponieważ
przebiega ona począwszy od końca 5' to grupa OH 5' końca pierwotnego
transkryptu jest zestryfikowana trójfosforanem. Modyfikacje jakim ulega
5' koniec hnRNA polegają na utworzeniu nukleozydodwufosforanu ppNp...
na początku łańcucha polirybonukleotydowego i przyłączeniu w sposób
przeciwny do kierunku transkrypcji nowej reszty nukleozydowej GMP.
Tak powstały zablokowany koniec GpppBp... ulega metylacji w wyniku
czego powstaje struktura m⁷GpppNp... nazywana kapturkiem (ang. cap).

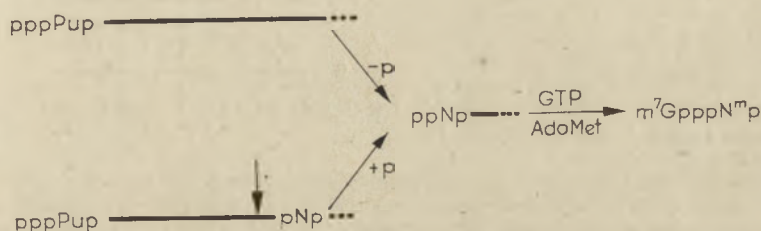
Grupy metylowe w hnRNA występują w dwóch typach struktur: tak
zwanym kapturku, to jest w zablokowanym końcu 5' oraz wewnątrz łań-
cucha RNA, głównie w postaci N⁶ — metyloadenozyiny.

W zablokowanym zmetylowanym 5' końcu 7-metyloguanozyna (m⁷G)
połączona jest z resztą cząsteczki RNA mostkiem trójfosforanowym po-
przez grupy 5' OH rybozy. Sąsiadujące z m⁷G nukleozydy mogą być rów-
nież zmetylowane (najczęściej w pozycji 2' rybozy). W przypadku 2'-O-
metylacji tylko pierwszego nukleozydu struktura taka (m⁷GpppN^mp...)
nosi nazwę kapturek I, natomiast gdy metylacji ulegną dwa początkowe
nukleozydy — kapturek II (m⁷GpppN^mpN^mp...). W hnRNA występuje tyl-
ko struktura kapturek I (81). Metylacja sąsiedniego, drugiego nukleozy-
du jest modyfikacją jakiej ulega mRNA po przejściu do cytoplazmy (85).

Występowanie zmetylowanych nukleozydów w mRNA po raz pierwszy stwierdzili Perry i Kelley (82) w mysich komórkach L. Metylacja nukleozydów eukariotycznego mRNA okazała się zjawiskiem powszechnym (83, 84). Tworzenie zablokowanego, zmetylowanego końca 5' i N⁶ metylacja wewnątrzłańcuchowych reszt adenylowych zachodzące podczas przekształcania hnRNA są również zjawiskami szeroko rozpowszechnionymi w komórkach eukariotycznych (86). Modyfikacje te są interesujące nie tylko z punktu widzenia ich znaczenia dla funkcjonowania cząsteczek hnRNA, lecz ich badania są istotne także dla lepszego zrozumienia zależności pomiędzy hnRNA i mRNA. Duże cząsteczki hnRNA zawierają kilkakrotnie więcej N⁶-metyloadenozyn niż zablokowanych, zmetylowanych 5' końców, co sugeruje obecność kilku zmodyfikowanych adenozyn w jednej cząsteczce RNA. Natomiast w małych cząsteczkach hnRNA zawierających poli(A) na jedną cząsteczkę zakończoną kapturkiem przypada 1—2 zmetylowanych adenozyn podobnie jak w cytoplazmatycznym mRNA (87).

Modyfikacje 5' końca hnRNA mogą zachodzić jeszcze w trakcie trwania transkrypcji lub też po jej zakończeniu (86) jednakże prawdopodobnie przed przyłączeniem odcinka poli(A) do końca 3' (87). Z prac Schiblera i Perryego (88) wynika, że modyfikacjom może ulegać nie tylko pierwotny transkrypt, lecz również krótsze odcinki powstałe na skutek cięcia hnRNA w trakcie jego dojrzewania. Badacze ci analizując fosforylowane 5' końce hnRNA mysich komórek L znaleźli cztery typy zakończeń: pppNp..., ppNp..., pNp... oraz m⁷GpppN^mp... Ponieważ tylko pppNp... reprezentuje 5' koniec pierwotnego transkryptu pozostałe typy zakończeń pochodzą zatem z cząstek, które uległy już modyfikacjom. W zakończeniu typu pppNp... przeważały pppGp... i pppAp..., w zakończeniu pNp... pUp..., podczas gdy w zakończeniu ppNp... wszystkie cztery nukleotydy występują w ilościach podobnych jak w zmetylowanych nukleotydach (N^m) w kapturku. Wynika stąd, że na początku pierwotnego transkryptu występują nukleozydy purynowe. W przypadku pojawienia się na 5' końcu hnRNA pirymidyn z dużą dozą prawdopodobieństwa można przypuszczać, że cząsteczka ta powstała na skutek pocięcia dużego, pierwotnego transkryptu. Schibler i Perry (88) zaproponowali model, wg którego cząsteczki hnRNA zakończone na 5' końcu strukturą ppNp... pochodzą z dwóch źródeł: defosforylacji pierwotnego transkryptu oraz cięcia i fosforylacji powstałego fragmentu. Do końca ppNp... tak nowo powstałej cząsteczki dołączany jest GMP, którego donorem jest GTP, a reakcję katalizuje enzym guanylotransferaza. Powstały w ten sposób zablokowany koniec o strukturze GpppNpNp... jest metylowany kolejno w pozycjach N⁷ guanozyny oraz 2' rybozy drugiego nukleozydu. Donorem grup metylowych jest S-adenozylometionina (AdoMet). Mechanizm ten jest identyczny z mechanizmem dołączania guanozyny i metylacją 5' końcowych nukleozydów w mRNA wirusów *Reo* i *Vaccina* (147).

Podobieństwo budowy 5' zablokowanego zmetylowanego końca w hnRNA i mRNA (81) pozwoliło na wysunięcie przypuszczenia o konserwatywnym przekazywaniu informacyjnemu RNA kapturka z cząsteczki hnRNA. Logiczną konsekwencją tej hipotezy jest obecność sekwencji mRNA przy 5' końcu cząsteczki prekursora. Szereg danych eksperymentalnych, jak np. zachowanie pulsowo znakowanych w grupie metylowej kapturków po usunięciu źródła znakowania (ang. *pulse chase*) (85), potwierdza to przypuszczenie. Przemawia za nim również fakt, że częstość występowania poszczególnych nukleotydów w pozycji sąsiadującej z m⁷G w kapturkach mRNA i hnRNA jest podobna. Np. około 20% 5' zablokowanego, zmetylowanego końca w obu typach RNA ma budowę

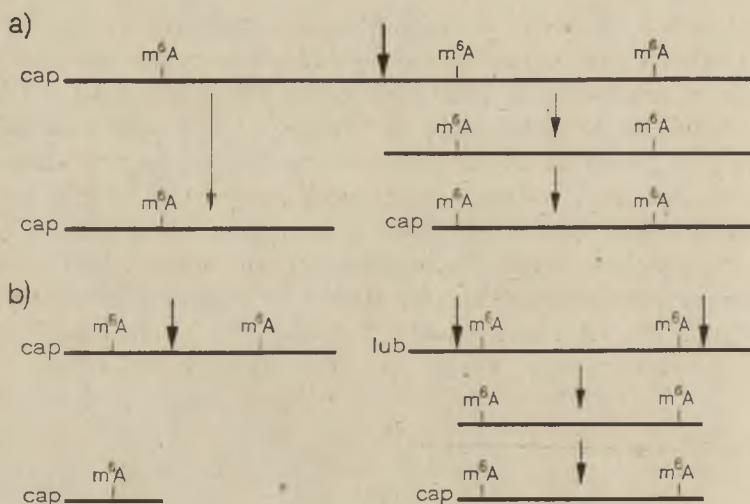


Ryc. 3. Schemat cięcia i modyfikacji cząsteczek hnRNA wg Schiblera i Perrego (88). Objaśnienie schematu w tekście. Pu oznacza purynę, a strzałka — miejsce cięcia prekursora.

m⁷GpppA^mpNp..., podczas gdy mniej niż 1% ma postać m⁷GpppU^mpNp... (89), przy czym w obu strukturach nukleozyd N jest adeniną. Natomiast w przypadku drugiego, sąsiadującego z m⁷G nukleozydu N, który w mRNA może być również zmetylowany, częstość występowania poszczególnych zasad w kapturkach hnRNA i mRNA jest różna i wynosi odpowiednio 29% G, 20% A i 51% pirymidyn w kapturku I hnRNA i 8% G^m, 11% A^m, 81% zmetylowanych pirymidyn w kapturku II mRNA. Wyniki te sugerują, że drugi nukleozyd może również zostać zmetylowany tylko w mRNA pochodzącym z pewnej podklasy hnRNA.

Wewnątrzłańcuchowe N⁶ metyloadenozyny w hnRNA i mRNA występują w podobnych sekwencjach typu N₁p_A^Gm⁶ ApCpN₂p, przy czym guanozyna występuje trzy razy częściej niż adenozyzna. W 90% cząsteczek N₁ jest puryną, podczas gdy N₂ może być zarówno pirymidyną, jak i puryną, z tym że rzadko bywa guanozyna. Te same sekwencje występują w dużych > 50 S jak i mniejszych 14—50 S cząsteczkach hnRNA (89). Obserwacje te sugerują, że wewnątrzcząsteczkowe m⁶A podobnie jak struktura kapturka mogą być zachowane w niezmienionej formie podczas przemian, jakim ulega pre-mRNA zanim powstanie dojrzałe mRNA.

Schibler i współ. (89) podali dwa możliwe modele przemian pre-mRNA podczas których wszystkie metylowane nukleotydy zostają zachowane. Jeden model (a) dotyczy dużego policistronowego prekursora,



Ryc. 4. Schemat przemian pre-mRNA wg Schiblera i współ. (89)

A) Cząsteczka prekursora policystronowego

B) Cząsteczka prekursora monocystronowego

Autorzy zakładają konserwatywne przekazywanie zmetylowanych nukleozydów na drodze prekursor — dojrzałe mRNA. Ponieważ wewnątrzcząsteczkowa pozycja m⁶A jest nieznaną na rysunku zaznaczono ich położenie w sposób przypadkowy. Czarna strzałka oznacza miejsce cięcia cząsteczek prekursora. Schemat objaśniono dokładnie w tekście.

w którym prawie wszystkie wewnątrzcząsteczkowe reszty adeninowe są zmetylowane. W wyniku pocięcia cząsteczki prekursora powstają krótsze odcinki, z których jedne mają strukturę kapturka na 5' końcu, inne zaś, znajdujące się poprzednio w środku łańcucha, są jej pozbawione. Do ich 5' końca dołączany jest następnie kapturek. Drugi model (b) dotyczy monocystronowych prekursorów, którymi mogą być zarówno duże cząsteczki pozbawione kapturka i zawierające sekwencje mRNA w środku łańcucha, jak i też inne posiadające zmetylowany, zablokowany 5' koniec, w pobliżu którego znajdują się sekwencje mRNA. Obydwa rodzaje cząsteczek ulegają pocięciu, a w przypadku wyciętych ze środka prekursora sekwencji mRNA do ich 5' końca zostaje dołączony kapturek.

III. Modyfikacje 3' końca hnRNA

Obecność wolnej grupy OH na 3' końcu umożliwia przedłużanie łańcucha w sposób zgodny z kierunkiem transkrypcji przez polimerazy nie wymagające matrycy. Sekwencje dodawane do 3' końca łańcuchów RNA składają się wyłącznie z reszt adenylowych tworzących odcinek poli(A) o długości około 100 do 200 nukleotydów (55—62). Kinetyka znakowania segmentów poli(A) i skutki hamowania syntezy hnRNA przez aktynomycynę D (65, 66) potwierdzają potranskrypcyjne wydłużanie łańcucha poli(A) za pomocą kolejnego dodawania reszt AMP (67). Mechanizm taki potwierdza też obecność w jądrze i cytoplazmie enzymów dołącza-

jących reszty adenyłowe do RNA (80). Ponadto z badań sekwencji pirymidynowych w DNA komórek mysich i ludzkich wynika, że nie ma odcinków dA:dT, z których mogłoby być transkrybowane poli(A) (68, 69).

Dotychczas poczynione obserwacje nie pozwalają założyć jednolitego schematu poliadenylacji hnRNA. Wykazano bowiem, że dołączanie odcinka poli(A) może zachodzić bezpośrednio po ukończeniu transkrypcji, lub też w różnych momentach potranskrypcyjnych modyfikacji, takich jak cięcie prekursora, jego metylacja, czy też dołączanie struktury kapturka (29).

Szereg obserwacji potwierdza obecność również w cytoplazmie niezależnego systemu pozwalającego na dołączanie reszt adenyłowych. W embrionie jeżowca morskiego zaobserwowano poliadenylację preegzystującego mRNA przechowywanego w cytoplazmie (77, 78). Nie wiadomo jednak, czy jest to elongacja utworzonych wcześniej sekwencji oligo (A), czy też formowanie sekwencji poli(A) *de novo*. Długość odcinków poli(A) jest taka sama w hnRNA, jak i mRNA w momencie pojawienia się go w cytoplazmie (55). Po przetransportowaniu do cytoplazmy odcinek poli(A) w miarę starzenia się mRNA skracany jest prawdopodobnie do około 50 nukleotydów w *steady state* (56, 57, 64). Zjawisko to może być związane ze zmianami stabilności mRNA. Zaobserwowano, że mRNA posiadający 30 nukleotydowy fragment poli(A) jest odporny na degradację na równi z natywnym mRNA zawierającym segment poli(A) o długości 150 nukleotydów. Jednakże skracanie odcinka poli(A) poniżej 30 nukleotydów obniżało drastycznie stabilność mRNA (149). Problem sekwencji poli(A) w mRNA omawiają obszernie prace przeglądowe (61, 26, 74—76).

W izolowanych cząsteczkach nRNP poli(A) jest częściowo związane z białkami. Z jąder mysich komórek raka wysiękowego wyodrębniono dwa rodzaje kompleksów poli(A)-białko o wielkości 15 i 17 S. W skład kompleksu 17 S wchodzi 6 białek o ciężarze cząsteczkowym 17.000—30.000, zaś kompleks 15 S składa się z 4 białek o wyższym ciężarze cząsteczkowym z przewagą białka o ciężarze 80.000 (58, 50). Również w ludzkich komórkach HeLa (60) opisano białko o ciężarze 74.000 związane z odcinkami poli(A) zarówno w hnRNA jak i mRNA. Obecność białek nie przeszkadza w wiązaniu się odcinka poliadenylowego RNP np. z oligo(dT) celulozą czy kolumną poli(U) *Sephrose*, co sugeruje częściowe tylko osłonięcie sekwencji adenyłowych białkami. Również w mRNA stwierdzono występowanie białek przyłączonych specyficznie do sekwencji poli(A) (71, 72). Nie zostało dotychczas rozstrzygnięte, czy takie cząsteczki nukleoproteinowe występują *in vivo*. Jednakże niewielka ilość białek oraz stabilność kompleksu poli(A)-białko w obecności stosunkowo wysokich stężeń soli (73) przemawiają za ich specyficznością.

Wspólna obecność odcinków poli(A) w cząsteczkach hnRNA i mRNA sugerowała obecność sekwencji informacyjnych w pobliżu końca 3' czą-

steczki prekursora. Doświadczenia z pulsowym znakowaniem ^3H adenyzną komórek HeLa wykazały wbudowywanie się radioaktywnego prekursora głównie w poli(A)⁺hnRNA, a następnie przechodzenie piętna do cytoplazmy (79), co potwierdzało zależność typu prekursor — produkt pomiędzy poli(A)⁺hnRNA i poli(A)⁺mRNA. Istnienie takiej prostej zależności budzi jednak wątpliwości, ponieważ są dane, że około 90% sekwencji poli(A) ulega rozpadowi w jądrze, przy czym szybkość jego syntezy nie jest wystarczająca dla pojawienia się w cytoplazmie obserwowanej ilości poli(A)⁺mRNA (65). Z badań nad włączaniem radioaktywności do końca łańcucha poli(A) wynika, że jej akumulacja w cytoplazmie jest wolniejsza w porównaniu z akumulacją w jądrze (150). Można to tłumaczyć albo różnymi mechanizmami dodawania reszt adenyłowych, szybszym w jądrze i wolniejszym w cytoplazmie, albo też czynnym w cytoplazmie mechanizmem usuwania końcowych adenozyń, skutecznie konkurującym z ich przyłączeniem. Wydaje się zatem, że pomiary kinetyki syntezy i rozpadu poli(A) nie stanowią podstawy do oceny prekursorowej roli hnRNA.

Doświadczenia z hamowaniem syntezy poli(A) kordycepiną (3' — deoksyadenozyną) sugerują natomiast związek pomiędzy poliadenylacją i transportem mRNA do cytoplazmy. Działanie kordycepiny powoduje bowiem nie tylko pozbawienie nowo zsyntetyzowanego hnRNA segmentu poli(A), lecz również znaczny spadek ilości mRNA w postaci polirybosomów (26, 61).

Przemiany, jakim ulega odcinek poli(A) w hnRNA i mRNA polegają zapewne na serii syntez i degradacji łańcucha adenyłowego. Przyłączenie reszt adenyłowych, jak już o tym wspomniano, może zachodzić zarówno w jądrze jak i w cytoplazmie, przy czym synteza *de novo* długiego odcinka poli(A) liczącego około 200 nukleotydów zachodzi, jak się wydaje, tylko w jądrze. Ponieważ w obecności kordycepiny hamującej syntezę poli(A), mRNA z krótszym odcinkiem poliadenyłowym nie pojawia się w cytoplazmie, wnioskować można, że do cytoplazmy transportowany jest mRNA z długim, około 200 nukleotydowym odcinkiem poli(A).

Jak dotychczas biologiczne znaczenie opisanych tutaj przemian pozostaje niejasne. Wyniki sugerują, że poliadenylacja ma znaczenie w procesie dojrzewania mRNA jednakże rola poli(A) w hnRNA nie została dostatecznie wyjaśniona.

IV. Transkrybowane sekwencje oligonukleotydowe

IV-1. Odcinki oligo(A)

Sekwencje adenyłowe występują w hnRNA nie tylko w postaci odcinków poli(A) na końcu 3', lecz również jako wewnętrzcząsteczkowe oli-

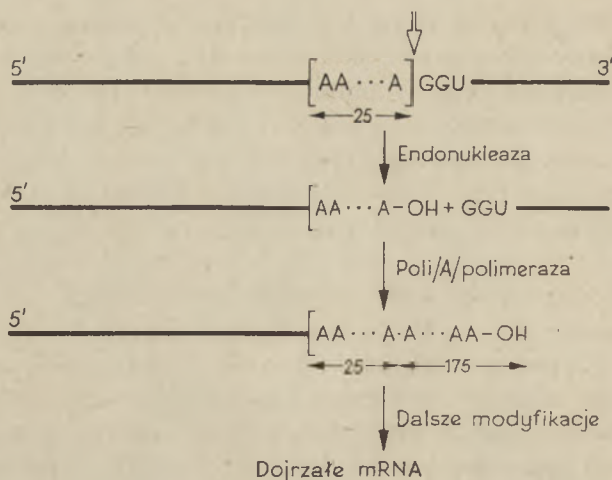
go(A). Z hnRNA komórek HeLa wyizolowano cząsteczki jądrowego RNA zawierające sekwencje oligo(A), składające się z jednolitego odcinka około 25 reszt adenyłowych (43). W embrionie jeżowca morskiego zaobserwowano występowanie trzech klas hnRNA: cząsteczek zawierających odcinki oligo(A), cząsteczek zawierających odcinki poli(A) i hnRNA nie posiadającego obu tego typu sekwencji (39), przy czym okazało się, że ilość RNA w mRNA każdej z tych klas zmienia się w trakcie rozwoju embrionalnego (40).

Sekwencje oligo(A) w komórkach HeLa występują w cząsteczkach hnRNA nie posiadających długich odcinków poli(A) (41). Sekwencje te znajdują się w pewnej odległości od końca 3' łańcuchów hnRNA. Jeśli bowiem utleniać nadjodanem skrajne nukleotydy w cząsteczkach hnRNA, a następnie zredukować je znakowanym borowodorkiem sodu, to radioaktywne piętno pojawia się w sekwencjach poli(A), a nie ma go w sekwencjach oligo(A) (42).

Obserwacja (43), że aktynomycyna D w stężeniach hamujących syntezę hnRNA, nie wpływa na poliadenylację już zsyntetyzowanego RNA, natomiast 3' dezoksyadenozyna, która hamuje dołączanie reszt adenyłowych do końca 3', nie wpływa na powstawanie cząsteczek hnRNA zawierających oligo(A) potwierdza przypuszczenie o różnym pochodzeniu obu typów sekwencji. Wewnątrzcząsteczkowe odcinki oligo(A) są transkrybowane z matrycy DNA, zaś 3' końcowe poli(A) powstaje w wyniku potranskrypcyjnych modyfikacji. Do końca 3' odcinka oligo(A) zwykle przylegają sekwencje GGU, zaś sąsiedztwo końca 5' odcinka oligo(A) ma wprawdzie skład bardziej heterogeny, przeważnie jednak występują tu dwie pirymidyny i guanozyna (41).

Fakt, że transkrybowane odcinki oligo(A) i 3' końcowe poli(A) nie występują jednocześnie w tej samej cząsteczce hnRNA z komórek HeLa oraz brak oligo(A) w cytoplazmatycznym mRNA, jak również powtarzający się skład trzech nukleotydów sąsiadujących z 3' końcem sekwencji oligo(A), skłonił Edmonds i współ. (44) do zaproponowania schematu przemian, w wyniku których 3' koniec oligo(A) jest miejscem startowym w syntezie odcinka poli(A). Postulowany tok wydarzeń jest następujący: cząsteczka hnRNA posiadająca wewnątrzcząsteczkowe odcinki oligo(A) zostaje rozcięta w pobliżu 3' końca odcinka oligonukleotydowego. Powstała w ten sposób na końcowym AMP grupa 3' OH jest miejscem dołączania przez polimerazę poli(A) nowych AMP. Po serii potranskrypcyjnych modyfikacji RNA zawierające odcinek poli(A) jest transportowane do cytoplazmy jako dojrzały mRNA.

Proponowany schemat wymaga doświadczalnego potwierdzenia. Dotychczas nie zbadano sekwencji nukleotydowych poprzedzających odcinek poli(A) w hnRNA i mRNA, jak i również nie sprawdzono doświadczalnie założenia o pochodzeniu krótkich fragmentów reszt adenyłowych na 5' końcu sekwencji poli(A) z transkrypcji, a nie z potranskrypcyjnej



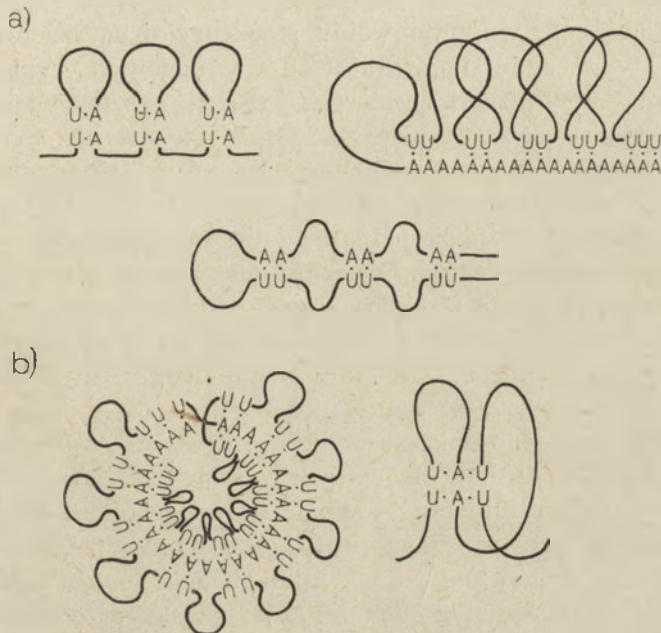
Ryc. 5. Schemat przedstawiający cięcie odcinków hnRNA zawierających oligo(A) i dalsze losy cząsteczki, aż do powstania dojrzałego mRNA. Biała strzałka oznacza miejsce cięcia prekursora przez RNazy.

poliadenylacji. Brak jest także danych o strukturze sekwencji otaczających oligo(A), a mających służyć jako miejsce specyficznie rozpoznawane przez endonukleazę, o której nie mamy również żadnych informacji. Przeciwno uniwersalności tego modelu świadczy obserwacja, że w *Dictyostelium discoideum* krótkie oligo(A) występują zarówno w hnRNA, jak i mRNA oraz, że są oddzielone kilkoma zaledwie nukleotydami od 3' końcowego poli(A) (63, 96).

IV-2. Odcinki oligo(U)

Występowanie w hnRNA krótkich liczących około 30 nukleotydów odcinków oligo(U) po raz pierwszy opisali Mollay i współ. (45) oraz Burdon i Shenkin (46). W komórkach HeLa w przeciwieństwie do odcinków oligo(A) odcinki oligo(U) odnajdywane są zarówno w zawierających poli(A), jak i też pozbawionych go cząsteczkach hnRNA oraz w mRNA (47). HnRNA zawiera 3-4 odcinków oligo(U) w cząsteczce, przy czym większość ich znajduje się w cząsteczkach pozbawionych odcinków poli(A). W hnRNA komórek HeLa zawierającym poli(A) oligo(U) występuje w pobliżu 5' końca (45, 11). Wniosek ten oparto na badaniach zawartości oligo(U) we fragmentach pochodzących z 3' końca cząsteczek hnRNA poddanych ograniczonej hydrolizie zasadowej. 90% odcinków oligo(U) znajdowano w odległości ponad 12.000 nukleotydów od 3' poli(A) końca, a więc poza prawdopodobnym obszarem sekwencji należących do mRNA (nie brano tutaj pod uwagę możliwości występowania genów podzielonych, do problemu których wrócę pod koniec rozdziału).

Sprawa lokalizacji fragmentów oligo(U) jest nadal przedmiotem dyskusji ze względu na występowanie 20-25% całkowitej ich ilości w cytoplazmatycznym RNA (44, 47), jak również z uwagi na występowanie w hnRNA dupleksów oligo(U): poli(A) (48). Dubroff (49), który opisał występowanie oligo(U) w hnRNA jeżowca morskiego zaobserwował, że ilość oligo(U) ulega zmianie we wczesnych stadiach rozwoju embrional-



Ryc. 6. Modele kompleksów A:U i A:U₂ w cząsteczkach hnRNA wg Dubroffa (49).

Kompleksy A:U (rys a) mogą tworzyć się pomiędzy odcinkami oligo(A): oligo(U) rys z lewej strony i u dołu, jak również pomiędzy poli(A) i oligo(U) rys z prawej strony.

W przypadku tripleksów (rys b) mogą się łączyć ze sobą odcinki poli(A) i oligo(U) rys z lewej strony, jak i oligo(A) oligo(U) rys z prawej strony.

nego. Zaproponował on model struktury drugorzędowej hnRNA, w którym odcinki oligo(U) tworzą dupleksy lub tripleksy z oligo(A) lub poli(A) powodując tym określone upakowanie cząsteczek RNA. Struktury dwuniciowego RNA mogą ułatwiać odnajdywanie i wycinanie sekwencji mRNA z cząsteczki prekursorowej, lub też pełnić inne role regulatorowe w trakcie przemian, jakim ulega hnRNA. Występowanie oligo(U) w postaci kompleksu z poli(A) zaobserwowano też w nRNP (48, 50). Nie można wykluczyć, że dupleksy oligo(U):poli(A) mogą stanowić artefakty powstałe w trakcie izolacji hnRNA. Wskazywały na to doświadczenia, w których dodanie syntetycznego poli(A) lub poli(U) podczas ekstrakcji nRNP z wysiękowego raka wątroby *Tapera* (50) powodowało wzrost ilości kompleksów oligo(U):poli(A). Wyniki te nie wykluczają jednak obecności takich kompleksów w natywnej cząsteczce nRNP. I tak *Kish* i *Pederson* (48) wykazali natywność kompleksów oligo(U): poli(A) w

komórkach HeLa izolując je w obecności oligo (dT), który blokuje wolne sekwencje poli(A) i zapobiega ich asocjacji z oligo(U). Przypuszcza się, że kompleksy oligo(U):poli(A) są związane z białkami, które stabilizują dwuniciową strukturę RNA.

Odcinki oligo(U) odnajdywano również w cząsteczkach różnych mRNA w sąsiedztwie tak końca 3', jak i 5' (47, 49, 51-53). Wiązania wodorowe pomiędzy adeniną i uracyłem odcinków poli(A) i oligo(U) mogą odgrywać decydującą rolę w powstawaniu struktury drugorzędowej mRNA. Przejściowo tworzącym się strukturom dwuniciowym typu A:U (49), prowadzącym do cyklizacji cząsteczek mRNA, przypisywana jest rola czynnika kontrolującego translację (51, 54). Występowanie odcinka poli(A) na 3' końcu niektórych cząsteczek hnRNA i mRNA skłania wielu badaczy do lokalizowania sekwencji informacyjnych w pobliżu końca 3' cząsteczki prekursora. Wydaje się jednak, że nie wszystkie sekwencje mRNA występują zgodnie z tą regułą. Obecność odcinków oligo(U), jak i zablokowanego, zmetylowanego 5' końca w cząsteczkach hnRNA i mRNA, nie pozwalają wykluczyć obecności sekwencji mRNA również na końcu 5' cząsteczki prekursora (81). Odmienny metabolizm różnych mRNA, jak i też różnorodność sposobów regulacji syntezy hnRNA mogą być wynikiem różnorodnego położenia sekwencji mRNA w cząsteczce hnRNA. Obecność sekwencji mRNA zarówno przy końcu 5', jak i 3' cząsteczki prekursora można wytłumaczyć również występowaniem genów podzielonych. Mechanizm ich transkrypcji nie został wprawdzie jeszcze dokładnie poznany, zaproponowano jednak kilka modeli powstawania funkcjonalnego RNA (153). Jeden z nich zakłada transkrypcję całego odcinka DNA, a więc zarówno regionów kodujących, jak i sekwencji interweniujących, a następnie usuwanie intronów i łączenie fragmentów informacyjnego RNA w dojrzałą cząsteczkę mRNA. W ten sposób w jednej tej samej cząsteczce zarówno sekwencja poli(A) na 3' końcu, jak i strukturą kapturka na 5' końcu może być konserwatywnie zachowana na drodze od hnRNA do polisomalnego mRNA.

V. Struktura drugorzędowa hnRNA

Wielkocząsteczkowy pierwotny transkrypt nie jest liniową cząsteczką. Po raz pierwszy Holmes i Bonner (90) wykazali, że ponad 50% hnRNA z komórek raka wysiękowego szczura posiada strukturę drugorzędową. Wskazywały na to profile topnienia i reakcja z formaldehydem. Reagujący z wolnymi grupami aminowymi zasad formaldehyd jest dogodnym odczynnikiem do pomiaru ilości wiązań wodorowych w RNA. Struktura drugorzędowa tworzy się głównie dzięki występowaniu sparowanych odcinków RNA tworzących zarówno wewnątrz- jak międzycząsteczkowe dupleksy. W obrazie z mikroskopu elektronowego hnRNA ma

postać wielocząsteczkowego kompleksu przypominającego sieć, w której jednociowe cząsteczki RNA połączone są sparowanymi odcinkami o długości około 300 nukleotydów (94).

Jak dotąd mamy niewiele informacji na temat budowy przestrzennej hnRNA. Składa się na to wiele przyczyn, z których kilka zostanie tutaj po krótko przedstawionych.

Już na pierwszym etapie izolacji RNA z jądra komórkowego i oczyszczeniu preparatu zachodzą w nim daleko idące zmiany, różniące go od struktur występujących *in vivo*. Powszechnie stosowana do ekstrakcji RNA metoda fenolowa może być źródłem artefaktów. Wykazano bowiem, że dwufazowy układ fenol-woda powoduje parowanie (ang. *annealing*) komplementarnych sekwencji (91). Istnieją dobrze udokumentowane tego przykłady np. 28 rRNA i pre-RNA z kultur tkankowych *Xenopus laevis* podczas ekstrakcji fenolowej tworzy trwałe dupleksy (92). Podobne zjawisko ma miejsce podczas izolacji form replikacyjnych RNA bakteriofagów (93). W przypadku hnRNA sytuacja wydaje się jeszcze bardziej skomplikowana, ponieważ stosując różne metody izolacji RNA przy pomocy fenolu otrzymano preparaty różniące się ilością występujących w nich struktur dwuniciowych (94). Tworzenie agregatów pod wpływem fenolu nie tłumaczy jednak różnic w profilach sedymentacji niezdenaturowanego hnRNA pochodzącego z tego samego rodzaju tkanek (14, 70, 95).

Trudnością w badaniach nad drugorzędową strukturą hnRNA jest również udział białek w kształtowaniu przestrzennej formy łańcucha polinukleotydowego. Ostatnio ukazały się prace sugerujące, że hnRNA przyłączony jest do tak zwanego „szkieletu jądrowego” (96). Tak więc odbiałczanie preparatu hnRNA prowadzi zapewne do zmiany natywnej konformacji łańcucha.

Uzasadnione nadzieje budził zastosowanie do badań struktury hnRNA metod *in situ*, a więc nie wymagających ekstrakcji i odbiałczania. Stollar i współ. (98) stosując metodę pośredniej immunofluorescencji z przeciwciałem, które w specyficzny sposób reaguje z dwuniciowym RNA wykazali *in situ* obecność takich struktur w komórkach małpich Vero i komara *Aedes albopictus*. Metoda serologiczna nie pozwala jednak na ilościowe oznaczanie struktur dwuniciowych ze względu na ich niedostępność dla przeciwciał w przypadku asocjacji z białkami. Calvet i Pederson (99) w badaniach struktury drugorzędowej hnRNA w komórkach HeLa zastosowali pochodną psoralenu AMT (4 — aminometylo — 4,5,8 — trójmetylopsoralen). Jest to środek interkalujący, który wnika do komórki i pod wpływem naświetlania promieniami UV (365 nm) tworzy wiązania krzyżowe pomiędzy pirymidynami w obu niciach struktur dwuniciowych. Pochodne psoralenu stosowano w badaniach drugorzędowej struktury segmentów palindromowych (ang. *inverted repeat*) w DNA (100), a jego przydatność do badań *in vivo* odkryto badając strukturę chromatyny (101).

Mimo, że większość wyodrębnionych struktur dwuniciowych może być artefaktami powstałymi na skutek asocjacji komplementarnych odcinków w obrębie cząsteczek RNA podczas odbiałczania lub tworzeniu międzycząsteczkowych dupleksów pomiędzy komplementarnymi odcinkami różnych cząsteczek hnRNA (94, 102) to jednak badania te mają walor informacyjny, ponieważ świadczą o obecności w hnRNA sekwencji komplementarnych. Uzyskane wyniki są przydatne z jednej strony dla lepszego poznania budowy i przemian jakim ulega pierwotny transkrypt oraz dalszych losów przeważającej części hnRNA o nieznanym dotychczas funkcji, która nigdy nie dociera do cytoplazmy, a z drugiej zaś jako informacja o rodzajach sekwencji genomu ulegających ekspresji.

V-1. Odcinki dwuniciowego RNA

W 1968 Montagnier (103) wyizolował z RNA wątroby szczurzej frakcję odporną na trawienie rybonukleazami A i T_1 , posiadającą strukturę dwuniciową (dsRNA). Po zdenaturowaniu około 20% dsRNA hybrydyzowało z komórkowym DNA, co świadczyło, że sekwencje tworzące struktury dwuniciowe są produktem transkrypcji genomu (104). Od tego czasu dwuniciowe odcinki RNA były obiektem zainteresowania wielu badaczy (97, 105—120, 143, 146).

Odcinki dwuniciowe izoluje się dzięki ich odporności na trawienie nukleazami: A (trzustkowa) i T_1 , które w buforze o wysokim stężeniu soli (0.3—0.5 M) stabilizującym strukturę dwuniciową działają specyficznie na jednoniciowe RNA. Z niestrawionej pozostałości wyodrębnia się fragmenty dsRNA stosując najczęściej kolumnę celulozową Franklina (121). Dwuniciowe RNA pozostaje związane z celulozą podczas przemycania jej buforami o malejącym stężeniu etanolu, a wymywa się buforem pozbawionym alkoholu. Niektórzy autorzy używali w tym celu również Sephadeksu G-75 (106) lub hydroksyapatytu (105, 112).

Dla potwierdzenia dwuniciowego charakteru wyizolowanej frakcji RNA stosuje się szereg kryteriów. Robertson i Hunter (122) zaproponowali trzy metody identyfikacji dsRNA: chromatografię na celulozie Whatman CF-11 (kolumna Franklina), trawienie RNazą III z *E. coli* specyficzną dla dwuniciowego RNA oraz hamowanie syntezy globiny *in vitro* w lizacie z retikulocytów królika. Dwuniciowy charakter RNA potwierdzają również swoiste reakcje immunologiczne (108, 123), analiza profili topnienia (109), badanie szybkości reasocjacji po denaturacji oraz gęstość w gradiencie Cs_2SO_4 (113), symetryczny skład zasad (112), i utrata oporności na trawienie nukleazami A+ T_1 po termicznej denaturacji (112). Niektóre własności dsRNA izolowanego z różnego typu komórek zebrano w Tabeli 1. Trwały, odporny na działanie RNaz dwuniciowy RNA izolowany jest głównie z hnRNA (105, 106, 110) natomiast w cytoplazma-

Tabela 1

Właściwości odcinków dwuniciowych izolowanych z różnych komórek

Rodzaj komórki	wielkość odcinka dsRNA	% jaki stanowi dsRNA w stos. do hnRNA	cechy charakterystyczne dsRNA	odnośnik
ludzkie hemocyto-blasty białaczki	4 S	1		107
limfocyty ludzkie	—	1,55		111
wątroba szczura	4—5 S	0,5	symetryczny skład zasad	108
szczurze: wątroba				
nerka	3—4 S	—		97
śledziona				
sarkoma-180	dwa typy 4—13 S oraz 20 S	3,8	dokładne sparowanie zasad	109
rak wysiękowy Erlicha	4—13 S	18	tylko częściowe sparowanie zasad	109
mysię L	4—13 S	13	" "	109
rak wysiękowy Erlicha	dwa typy 4 S i dłuższe dzielące się na 5—6 S i 7—11 S	2—3 1,2	bogate w pary G+C bogate w pary A+U	106
HeLa	4 S	2—3	symetryczny skład zasad	105, 113
	—	1	odporne na trawienie RNazami A+T ₁ w o. 13M buforze	124
HeLa	—	1,5—2	odporne na trawienie RNazami A+T ₁ w 0.63M buforze	124
limfoma Burkitta	3—4 S	—	—	97
fibroblasty kurze	3—4 S	—	—	97
embrion jeżowca morskigo	4—6 S	0,2	dupleksy RNA połączone z sekwencjami adenylowymi	110
liście tytoniu	6 S	0,06	symetryczny skład zasad	154
BHK — 21	12 S		reaguje z przeciwciałem specyficznym dla dsRNA	155
nerka królika	7 S	—	} indukują interferon	156
embrion kurzy	9 S	—		
HeLa	11 S	—		
HeLa	5 S	—	hamuje biosyntezę białka	157
retikulocyty kurze	4—11 S	—	zawiera nukleotydy komplementarne do miejsca wiążącego rybosom w globinowym mRNA	158

tycznym mRNA nie znajdowano w ogóle dsRNA (105, 108, 109) lub wykrywano niewielkie ilości sięgające 0,3% (119). Wykazano jednakże w cząsteczce mRNA obecność identycznych sekwencji jak w jednej z dwóch nici dsRNA pochodzącego z hnRNA (115, 117—119). Sugeruje to, że obszar dwuniciowy hnRNA może ulegać enzymatycznej degradacji, w wyniku której jedna z dwóch nici struktury dwuniciowej zostaje w mRNA zachowana.

Ilość dsRNA izolowanego z hnRNA różnych komórek waha się od kilku do kilkunastu procent. W dużym stopniu zależy to od zastosowanej metody izolacji RNA i może być związane z niecałkowitą ekstrakcją jądrowego RNA (120), lub też z wpływem stosowanych podczas procedury warunków na powstawanie struktur dwuniciowych. Jeżeli hnRNA przed trawieniem mieszaniną nukleaz znajdzie się w warunkach sprzyjających parowaniu się sekwencji RNA (ang. *self annealing*) to ilość materiału opornego na trawienie znacznie wzrasta i osiąga np. w komórkach raka wąsłkowego Erlicha 20% (102), a w komórkach HeLa 15% (94) lub nawet 25% (115). Wydaje się jednak, że wszystkie komplementarne sekwencje mogące tworzyć obszary sparowane — niezależnie od tego, czy występują w cząsteczce od razu w postaci struktur dwuniciowych, czy też powstają dopiero wskutek parowania się — są transkrybowane z tych samych sekwencji DNA. Przemawia za tym podobny skład nukleotydu obu typów struktur uzyskany przez trawienie RNazą T₁ i badanie powstałych oligonukleotydów techniką *fingerprinting* (115).

Badania immunologiczne (98) i powstawanie krzyżowych wiązań w RNA pod wpływem psoralenu (99) potwierdzają obecność dwuniciowego RNA w żywej komórce. Również w natywnej rybonukleoproteinowej formie hnRNA komórek HeLa stwierdzono obecność dsRNA (113), niezależnie od powstających podczas odbiałczania wewnątrzcząsteczkowych dupleksów spowodowanych łączeniem się komplementarnych sekwencji (124). Nie możemy więc jeszcze dokładnie określić ilości hnRNA występującej w postaci dwuniciowej. Możemy natomiast stwierdzić, że znaczna część hnRNA składa się z komplementarnych sekwencji nukleotydu, które mogą szybciej lub wolniej tworzyć mniej lub bardziej trwałe, różnej długości dsRNA.

V-2. Pochodzenie dsRNA

Zdenaturowane odcinki dwuniciowego RNA szybko i wydajnie hybridują z DNA (105, 112), co świadczy, że są one transkrybowane z sekwencji DNA powtarzających się wielokrotnie w genomie. Ponieważ DNA wszystkich klas gęstości mogą tworzyć hybrydy ze zdenaturowanymi odcinkami dwuniciowego RNA, zatem występowanie powtarzających się sekwencji nie ogranicza się do obszarów satelitarnego DNA (wg Brit-

tena i Kohna (125) satelitarne DNA są to bloki prostych, wielokrotnie powtarzających się sekwencji, które podczas wirowania w gradiencie CsCl tworzą dobrze określone pasma). Sekwencje DNA komplementarne z dsRNA są dosyć regularnie porozrzucane wewnątrz genomu i wydają się należeć do frakcji średnio powtarzalnego DNA (ang. *intermediate repeat*) (16).

Ponieważ w DNA sekwencje powtarzające się są rozproszone wśród unikalnych wydaje się oczywistym, że cząsteczka hnRNA, która jest transkrybowana z długiego odcinka genomu również zawiera sekwencje powtarzające się i unikalne ułożone na przemian. W DNA *Eukaryota* zaobserwowano występowanie sekwencji odwróconych (palindromowych) typu 5' abcdxyzd'c'b'a' 3' gdzie abcd i a'b'c'd' są to sekwencje komplementarne, a odcinek xyz, który może być różnej długości reprezentuje niesparowany obszar pomiędzy komplementarnymi sekwencjami (127). Transkrypt sekwencji palindromowej może tworzyć dwuniciowy odcinek RNA. W celu sprawdzenia tego przypuszczenia dsRNA z komórek HeLa poddano analizie metodą fingerprinting i znaleziono sześć dużych nukleotydów o określonej prostej sekwencji (116). Następnie transkrybowano *in vitro* frakcję palindromowego DNA i w powstałym produkcie znaleziono analogiczne oligonukleotydy jak w dsRNA izolowanym z hnRNA (114). W ten sposób zbadano również frakcję hnRNA szybko hybrydującą z komórkowym DNA oraz sekwencje, które parując ze sobą zwiększają ilość RNA odpornego na trawienie nukleazami (115). Obrazy otrzymane podczas rozdziálu oligonukleotydów były we wszystkich przypadkach prawie nierozróżnialne. Stąd można przypuszczać, że sekwencje palindromowego DNA należą do klasy sekwencji średnio powtarzających się. Skład zasad różnych palindromów jest zasadniczo taki sam i tylko niewielkie różnice obserwuje się w zależności od położenia sekwencji palindromowej w genomie.

Komplementarne odcinki sekwencji palindromowego DNA mogą sąsiadować bezpośrednio, lub też mogą być oddzielone od siebie sekwencjami niekomplementarnymi o różnej długości. W pierwotnym transkrypcie komplementarne sekwencje leżące blisko siebie ulegają łatwo sparowaniu i tworzą odcinki dsRNA lub struktury typu szpilki (ang. *hairpin like structure*). Sekwencje komplementarne znacznie od siebie oddalone asocjują trudniej i to ich obecność powoduje, że w sprzyjających warunkach obserwuje się wysoki udział struktur dwuniciowych w hnRNA.

V-3. Biologiczna rola odcinków dsRNA

Rola odcinków dwuniciowych RNA jest nieznaną. Wyniki badań przeprowadzonych na komórkach różnych typów, jak i fakt pochodzenia sekwencji odcinków dwuniciowych z fragmentów palindromowych DNA

świadczą o powszechności występowania części eukariotycznego hnRNA w formie dwuniciowej.

Proponowane przez różnych autorów role sekwencji pochodzących z fragmentów dsRNA mieszczą się pomiędzy dwiema krańcowymi możliwościami: odcinki dwuniciowe albo są jedynie odbiciem struktury genu i nie odgrywają żadnej roli w gotowym transkrypcie, albo też odcinki takie pełnią autonomiczną rolę w metabolizmie hnRNA. Można przyjąć, że sekwencje palindromowe z DNA, z transkrypcji których pochodzą sekwencje komplementarne w odcinkach dsRNA, mogą służyć jako miejsca wiążące białka regulatorowe, strukturalne lub polimerazę RNA, lub też mogą odgrywać rolę w upakowaniu DNA w chromosomie, co tylko pośrednio wiąże je z losami transkryptów. Większość autorów jest jednak zdania, że sekwencje dwuniciowego RNA są sygnałami w procesie przetwarzania hnRNA w funkcjonalny mRNA. Za taką koncepcją przemawia szereg obserwacji:

- Odcinki dwuniciowe są rozproszone pomiędzy długimi obszarami sekwencji jednoniciowych (128).
- Cytoplazmatyczny RNA nie zawiera dsRNA lub zawiera je tylko w ilościach śladowych (105, 112), jakkolwiek obecność w mRNA sekwencji analogicznych z sekwencjami dsRNA jądrowego (115, 117—119) nasuwa przypuszczenie, że obszar dwuniciowy w hnRNA mógł podlegać enzymatycznemu cięciu prowadzącemu do pozostania w mRNA fragmentów jednej nici dsRNA.
- Wg Robertsona (137) występowanie enzymów o specyficzności RNazy III z *E. coli*, swoistej dla odcinków dwuniciowych, i działanie tego enzymu *in vitro* na dsRNA, izolowane z hnRNA komórek HeLa, potwierdza hipotezę o roli struktur dwuniciowych w przekształceniu hnRNA. Jak dotąd nie udało się jednak zdobyć bezspornych dowodów na obecność w komórkach ssaków enzymu działającego jak RNaza III (129). Zostało wprawdzie opublikowane doniesienie o aktywności rybonukleazowej preferującej dsRNA w komórkach HeLa, brak jest jednak przekonujących danych na jej jądrowe pochodzenie (130). Szereg zaś dsRNaz z różnych źródeł wykazuje lokalizację cytoplazmatyczną. W supernatancie z homogenatu komórek raka wąsików Krebsa II znaleziono aktywność rybonukleazową związaną prawdopodobnie z rybosomami, a preferującą dsRNA, co potwierdziły badania na dsRNA i jednoniciowym RNA fagów f2 i f1 oraz na poli(G): poli(C) (131). Podobne aktywności dsRNazowe opisano w komórkach KB (132), tkance płucnej, śledzionie i komórkach niektórych makrofagów (133). Również podczas frakcjonowania RNazy H z grasicy cielej wyizolowano aktywność dsRNazową (134). Ostatnio doniesiono o identyfikacji w hnRNP komórek HeLa aktywności dsRNazowej (135) bardzo podobnej do rybonukleazy D wyizolowanej z komórek Krebsa (136). (Obserwacja ta wymaga jeszcze jednak szeregu dalszych badań). Nie ma jednak

wystarczających danych, które by wskazywały na obecność enzymu atakującego specyficznie dwuniciowe struktury RNA w jądrze. Natomiast doniesienia o występowaniu takiej aktywności enzymatycznej w cytoplazmie zachęcają do poszukiwania odcinków dwuniciowych poza jądrem komórkowym.

- Analogicznie do występowania w RNA *E. coli* fragmentów pełniących rolę sygnałów w procesie przekształcania tego RNA w trakcie jego dojrzewania (137) jądrowe dsRNA eukarionotów zawiera specyficzne sekwencje i ma strukturę, która potencjalnie może pełnić taką samą rolę w hnRNA (137, 138).
- Istnieje również możliwość, że odcinki dsRNA lub ich fragmenty pozostając w jądrze mogą tam pełnić różne inne funkcje regulatorowe na poziomie transkrypcji lub replikacji (128, 139). Nie można też wykluczyć, że sygnały zakodowane w charakterystycznych oligonukleotydach w dsRNA mogą na przykład działać w dojrzałym mRNA podczas wiązania rybosomów lub też w czasie dołączania kapturka czy odcinków poli(A). Możliwość zupełnie innej strukturalnej roli odcinków dwuniciowych może wynikać z faktu, że rybonukleoproteidowe cząsteczki zawierające hnRNA są mocno związane z niektórymi składnikami struktury jądrowej tak, że ich uwolnienie powoduje częściową degradację RNA (140). Sugeruje się też przyłączenie nRNP do tzw. szkieletu jądrowego (96). W obu wypadkach w wiązaniu mogą być zaangażowane obszary dwuniciowe RNA (141).

W obecnej chwili trudno jest jednak przypisać dsRNA określoną rolę. Wydaje się raczej, że mogą one mieć różnego rodzaju znaczenie metaboliczne w zależności od miejsca występowania, długości i charakterystyki tworzących je sekwencji nukleotydowych.

Zaakceptowano do druku 30.08.1980.

PIŚMIENNICTWO

1. Scherrer K., Darnell J. E. Jr. (1962), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 486—490.
2. Scherrer K., Latham H., Darnell J. E., (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **49**, 240—248.
3. Georgiev G. P., Samarina O. P., Lerman M. I., Smirnov M. N., Severitzowa A. N., (1963), *Nature*, **200**, 1921—1924.
4. Ellem K. A. O., Sheridan J. W., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 505—510.
5. Scherrer K., Marcaud L., (1965), *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**, 1697—1700.
6. Haussais J. F., Attardi G., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **56**, 616—623.
7. Yoshikawa-Fukada M., Fukada T., Kawade, (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **103**, 383—398.
8. Soeiro R., Birnboim H. C., Darnell J. E., Jr., (1966), *J. Mol. Biol.* **19**, 362—372.

9. Darnell J. E., Jr., (1975), w *Harvey Lectures 1973—1975* str. 1—47 Academic Press New York, San Francisco, London.
10. Darnell J. E., Jelinek W. R., Molloy G. R., (1973), *Science*, **181**, 1215—1221.
11. Molloy G. R., Jelinek W., Salditt M., Darnell J. E., (1974), *Cell*, **1**, 43—53.
12. Scherrer K., (1973) w *Protein Synthesis in Reproductive Tissue*, red. Diczfalusy, str. 95—125, Karolinska Institutet Stockholm.
13. Georgiev G. P., (1969), *J. theor. Biol.*, **25**, 473—490.
14. Georgiev G. P., Ryskov A. P., Coutelle C., Mantieva V. L., Avakyan E. R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta.*, **259**, 259—283.
15. Georgiev G. P., Varshawsky A. J., Ryskov A. P., Church R. B., (1973). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **38**, 864—884.
16. Davidson E. H., Britten R. J., (1973), *Quart. Rev. Biol.*, **48**, 565—613.
17. Scherrer K., Spohr G., Grandoulan N., Morel C., Grossclaude J. Chizzi C., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **35**, 539—554.
18. Olszańska B., Grąbczewska E., Lassota Z., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **42**, 367—376.
19. Lewin B., (1975), *Cell.*, **4**, 11—20.
20. Lewin B., (1975), *Cell*, **4**, 77—93.
21. Stein J. L., Thrall C. L., Park W. D., Maus R. J., Stein G. S., (1975), *Science*, **189**, 557—558.
22. Lindberg U., Darnell J. E., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **65**, 1089.
23. Imaizumi T., Diggelman H., Scherrer K., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1122—1126.
24. Mathews M. B., (1973) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Dickens F., t. 9, str. 59—60, Academic Press New York, London.
25. Weinberg R. A., (1973), *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 329—354.
26. Brawerman G., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 621—642.
27. Burdon R. H., (1976) w *RNA Biosynthesis*, str. 216. Chapman and Hall, London.
28. Molloy G., Puckett L., (1976), *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **31**, 1—38.
29. Perry R. P., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 605—629.
30. Perry R. P., Bard E., Hames B. D., Kelley D. E., Schibler U., (1976), *Prog. Nucleic Acid., Res. Mol. Biol.*, **19**, 275—292.
31. Lengyel J., Penman S., (1975), *Cell*, **5**, 281—290.
32. Price R. P., Ransom L., Penman S., (1974), *Cell*, **2**, 253—258.
33. Samarina O. P., Lukanidin E. M., Molnar J., Georgiev G. P., (1968), *J. Mol. Biol.*, **33**, 251—263.
34. Parsons J. T., McCarty K. S., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5377—5384.
35. Heinrich P. C., Gross V., Northemann W., Sheurlen M., (1978), *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **81**, 101—134.
36. Van Ventenoy W., Janssen D. B., (1978), *Mol. Biol. Rep.*, **4**, 3—8.
37. Stevenin J., Jacob N., (1974), *Europ. J. Biochem.*, **47**, 129—137.
38. Sekeris L. E., Niessing J., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 642—650.
39. Dubroff L. M., Nemer M., (1975), *J. Mol. Biol.*, **95**, 455—476.
40. Nemer M., Surrey S., (1976), *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.*, **19**, 119—122.
41. Venkatesan S., Nakazato H., Kopp D. W., Edmonds M., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 1097—1110.
42. Nakazato H., Kopp D. W., Edmonds M., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1472—1476.

43. Nakazato H., Edmonds M., Kopp D. W., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 200—204.
44. Edmonds M., Nakazato H., Korwek E. L., Venkatesan S., (1976), *Prog. Nucleic Res. Mol. Biol.*, **10**, 99—112.
45. Molloy G. R., Thomas W. L., Darnell J. E., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3684—3688.
46. Burdon R. H., Shenkin A., (1972), *FEBS Letters*, **24**, 11—14.
47. Korwek E. L., Nakazato H., Venkatesan S., Edmonds M., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4643—4649.
48. Kish V. M., Pederson T., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 1426—1430.
49. Dubroff L. M., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 2217—2221.
50. Quinlan T. J., Kinniburgh A. J., Martin T. E., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1156—1161.
51. Bester A. J., Kennedy D. S., Heywood S. M., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1523—1527.
52. Burdon R. H., Shenkin A., Douglas J. T., Smille E. J., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **474**, 254—267.
53. Lee N., Carbon J., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 49—53.
54. Heywood S. M., Kennedy D. S., (1976), *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.*, **19**, 477—489.
55. Greenberg J. R., Perry R. P., (1972), *J. Mol. Biol.*, **72**, 91—98.
56. Sheiness D., Darnell J. E., (1973), *Nature New Biol.*, **241**, 265—268.
57. Darnell J. E., Wall R., Tuschinsky R. J., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 1321—1325.
58. Quinlan T. J., Billings P. B., Martin T. E., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 2632—2636.
59. Firtel R. A., Pederson T., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 301—305.
60. Kish V. M., Pederson T., (1975), *J. Mol. Biol.*, **95**, 227—238.
61. Greenberg J. R., (1975), *J. Cell. Biol.*, **64**, 269—288.
62. Drews J., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **9**, 263—274.
63. Jacobson A., Firtel R., Lodish H. F., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1607—1611.
64. Brawerman G., (1973), *Mol. Biol. Rep.*, **1**, 7—13.
65. Perry R. P., Kelley D. E., LaTorre J., (1974), *J. Mol. Biol.*, **82**, 315—332.
66. Darnell J. E., Philipson L., Wall R., Adesnik M., (1971), *Science*, **174**, 507—510.
67. Rose K. M., Jacob S. T., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **67**, 11—21.
68. Birnboim H. C., Mitchel R. E. J., Straus N. A., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2189—2192.
69. Harbers K., Spencer J. H., (1974), *Biochemistry*, **13**, 1094—1100.
70. Derman E., Darnell J. E., (1974), *Cell*, **3**, 255—264.
71. Blobel G., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 924—938.
72. Kwan S., Brawerman G., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3247—3250.
73. Kumar A., Lindberg V., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 681—685.
74. Carlin R. K., (1978), *J. theor. Biol.*, **71**, 323—338.
75. Darnell J. E., Jelinek W. R., Molloy G. R., (1973), *Science*, **181**, 1215—1221.
76. Brysch B., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 377—391.
77. Slater I., Gillespie D., Slater D. W., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 406—411.

78. Wilt F. H., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2345—2349.
79. Jelinek W., Adesnik M., Salditt M., Sheiness D., Wall R., Molloy G., Philipson L., Darnell J. E., (1973), *J. Mol. Biol.*, **75**, 515—532.
80. Edmons M., Winters M. A., (1976), *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, **17**, 149—176.
81. Perry R. P., Kelley D. E., Friderici K., Rottman F., (1975), *Cell*, **6**, 13—19.
82. Perry R. P., Kelley D. E., (1974), *Cell*, **1**, 37—42.
83. Filipowicz W., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 21—61.
84. Filipowicz W., (1978), *FEBS Letters*, **96**, 1—11.
85. Perry R. P., Kelley D. E., (1976), *Cell*, **8**, 433—442.
86. Shatkin A. J., (1976), *Cell*, **9**, 645—657.
87. Salditt-Georgieff M., Jelinek W., Darnell J. E., Furuichi Y., Morgan M., Shatkin A., (1976), *Cell*, **7**, 227—237.
88. Schibler U., Perry R. P., (1976), *Cell*, **9**, 121—130.
89. Schibler U., Kelley D. E., Perry R. P., (1977), *J. Mol. Biol.*, **115**, 695—714.
90. Holmes D. S., Bonner J., (1973), *Biochemistry*, **12**, 2330—2338.
91. Kohne D., Levison S., Byers M., (1977), *Biochemistry*, **16**, 5329—5341.
92. Hagenbuchle O., Schibler U., Wyler T., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **60**, 73—82.
93. Weissman C., Feix G., Slor H., (1968), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **33**, 83—100.
94. Fedoroff N., Wellauer P. K., Wall R., (1977), *Cell*, **10**, 597—610.
95. Morrison W., Busch H., (1973), *Physiol. Chem. Phys.*, **5**, 403—422.
96. Miller T. E., Huang C. Y., Pogo A. O., (1978), *J. Cell. Biol.*, **76**, 675—691.
97. Stern R., Friedman R. M., (1970), *Nature*, **226**, 612—616.
98. Stollar B. D., Koo R., Stollar V., (1978), *Science*, **200**, 1381—1383.
99. Calvet J. P., Pederson T., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 755—759.
100. Shen C. K., Hearst J. E., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 1363—1367.
101. Wieschalm G. P., Hyde J. E., Hearst J. E., (1977), *Biochemistry*, **16**, 925—932.
102. Ryskov A. P., Yenikopolov G. N., Limborska S. A., (1974), *FEBS Letters*, **47**, 98—102.
103. Montagnier L., (1968), *CR Acad. Sci D*, **267**, 1417—1420.
104. Harel L., Montagnier L., (1971), *Nature New Biol.*, **229**, 106—108.
105. Jelinek W., Darnell J. E., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 2537—2541.
106. Ryskov A. P., Farashyan V. R., Georgiev G. P., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 568—572.
107. Torelli U., Torelli G., Cadossi R., Ferrari S., (1974), *Haematologica*, **59**, 393—400.
108. Moncton R. P., Naora H., (1974), *Biochem. Biophys. Acta*, **335**, 139—154.
109. Patnaik R., Tylor M. W., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1990—1995.
110. Kronenberg L. H., Humphreys T., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2020—2025.
111. Torelli U., Torelli G., Cadossi R., (1974), *Exp. Cell. Res.*, **88**, 188—192.
112. Ryskov A. P., Saunders G. F., Farashyan V. R., Georgiev G. P., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **312**, 152—164.
113. Calvet J. P., Pederson T., (1978), *J. Mol. Biol.*, **122**, 361—378.

114. Jelinek W., (1977), *J. Mol. Biol.*, **115**, 591—601.
115. Jelinek W., Evans R., Wilson R., Salditt-Georgieff M., Darnell J. E., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2776—2783.
116. Robertson H. D., Dickson E., Jelinek W., (1977), *J. Mol. Biol.*, **115**, 571—589.
117. Naora H., Whitelman J. M., (1975), *Nature*, **256**, 756—759.
118. Ryskov A. P., Kramerov D. A., Georgiev G. P., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **447**, 214—229.
119. Ryskov A. P., Tokarskaya O. V., Georgiev G. P., Coutelle C., Thiele B., (1976), *Nucleic Acid Res.*, **3**, 1487—1498.
120. Kramerov D. A., Ryskov A. P., Georgiev G. P., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **475**, 461—475.
121. Franklin R. M., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**, 1504—1511.
122. Robertson H. D., Hunter T., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 418—425.
123. Stollar B. D., (1975), w *The Antigens*, red. B. Sela., t. 1., str. 1—85, Academic Press, New York.
124. Celvet J. P., Pederson T., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 3705—3709.
125. Britten P. J., Kohne D. E., (1968), *Science*, **161**, 529—540.
126. Schmid C. W., Mammig J. E., Davidson N., (1975), *Cell*, **5**, 159—172.
127. Deninger D. L., Schmid C. W., (1976), *J. Mol. Biol.*, **106**, 773—790.
128. Robertson H. D., Dickson E., (1974), *Brookhaven Symp. Biol.*, **26**, 240—266.
129. Sierakowska H., Shugar D., (1977), *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, **20**, 59—130.
130. Birge C. H., Schlessinger D., (1974), *Fed. Proc.*, **33**, 1275.
131. Robertson H. D., Mathews M. B., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 225—229.
132. Bothwell A. L. M., Altman S., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1451—1459.
133. Stern R., Wilczek J., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 620.
134. Busen W., Hausen P., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **52**, 179—190.
135. Rech J., Brunel C., Jeanteur P., (1979), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 422—427.
136. Rech J., Cathala G., Jeanteur P., (1976), *Nucleic Acid Res.*, **3**, 2055—2065.
137. Robertson H. D., (1977) w *Columbia P and S Symp. on Protein — Nucleic Acid Interactions*, red. Vogel H., str. 549—568, Academic Press New York.
138. Robertson H. D., Dickson E., Dunn J. J., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 822—826.
139. Dickson E., Robertson H. D., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 3387—3393.
140. Lukanidin E. M., Zalmanzon E. S., Komaromi L., Samarina O. P., Georgiev G. P., (1972), *Nature New Biol.*, **238**, 193—197.
141. Herman R., Zieve G., Williams J., Lenk R., Penman S., (1976), *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **19**, 379—401.
142. Darnell Y. E., (1975), *Harvey Lect.*, **69**, 1—47.
143. Stern R., Friedman R. M., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3635—3645.
144. Ruiz-Carrillo A., Beato M., Schutz G., Feigelson P., Allfrey V. G., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 3641—3645.
145. Knochel W., Tiedemann H., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **378**, 383—393.

146. Jelinek W., Molloy G., Fernandez-Munoz R., Salditt M., Darnell J. E., (1974), *J. Mol. Biol.*, **82**, 361—370.
147. Furuichi Y., Muthukrishnan S., Tomasz J., Shatkin A. J., (1976), *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, **19**, 3—20.
148. Penman S., Rosbach M., Penman M., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 1878—1885.
149. Littauer U. Z., Marboix G., Huez G., LeClercq M., Hubert E., Chantrenne H., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **64**, 115—121.
150. Sawicki S. G., Jelinek W., Darnell J. E., (1977), *J. Mol. Biol.*, **113**, 219—235.
151. Spohr G., Imazumi T., Scherrer K., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 5009—5013.
152. McKnight G. S., Schimke R. T., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4327—4331.
153. Williamson B., (1977), *Nature*, **270**, 295—297.
154. Ikegami M., Fraenkel-Conrat H., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 3637—3640.
155. Stollar V., Stollar B. D., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **65**, 993—1000.
156. Kimball P. C., Duesberg P. H., (1971), *J. Virol.*, **7**, 697—703.
157. Bases R., Kaplan B. H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta.*, **312**, 574—580.
158. Fry K. E., Deacon N. J., Naora H., (1978), w przygotowaniu do druku.

ALINA GRZELIŃSKA *)

Poinfekcyjne zmiany w procesie regulacji genetycznej u roślin

Post-infectious Changes of Genetic Regulation Process in Plants

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Transkrypcja i procesy potranskrypcyjne u roślin zdrowych**
 - II-1. Aktywacja chromatyny**
 - II-2. Specyficzność transkrypcyjna polimeraz RNA**
 - II-3. Potranskrypcyjne przekształcenia prekursorów RNA**
- III. Transkrypcja i procesy potranskrypcyjne u roślin chorych**
 - III-1. Zmiany w aktywności chromatyny**
 - III-2. Zmiany w specyficzności polimeraz RNA**
 - III-3. Zmiany w procesie dojrzewania RNA**
 - III-3-1. Rybonukleazy**
 - III-3-2. Metylazy**
- IV. Wnioski końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. Transcription and post-transcriptional processing in healthy plants**
 - II-1. Activation of chromatin**
 - II-2. Transcriptive specificity of RNA polymerases**
 - II-3. Post-transcriptional processing of RNA precursors**
- III. Transcription and post-transcriptional processing in diseased plants**
 - III-1. Changes of chromatin activity**
 - III-2. Changes of specificity of RNA polymerases**
 - III-3. Changes of maturation process of RNA**
 - III-3-1. Ribonucleases**
 - III-3-2. Methylases**
- IV. Concluding remarks**

I. Wstęp

Odporność lub wrażliwość rośliny na choroby infekcyjne jest końcowym efektem wielu skomplikowanych zdarzeń wywołanych przez wza-

* dr, Zakład Biochemii SGGW-AR, 02-528 Warszawa, ul. Rakowiecka 26/30.

jemne oddziaływanie metabolitów dwóch wchodzących ze sobą w kontakt organizmów. Skutkiem tego oddziaływania jest derepresja nowych genów w komórkach żywiciela i zapoczątkowanie różnokierunkowych procesów zmierzających do ograniczenia rozwoju patogenu. Obecnie można rozróżnić dwa zasadnicze kierunki tych zmian (1):

- procesy niespecyficzne, w których indukowana synteza RNA i białka prowadzi do produkcji fitoaleksyn wykorzystywanych do lokalizacji patogenu,
- zmiany o charakterze specyficznym, które przypuszczalnie odgrywają decydującą rolę w rozwoju choroby.

Indukowana biosynteza fitoaleksyn i rola tych związków w rozwoju patogenezы była przedmiotem wielu artykułów przeglądowych (2, 3, 4, 5, 6) i prac oryginalnych (np. 7, 8, 9). Szczegółowe badania zmian specyficznych rozpoczęły się stosunkowo niedawno na podstawie nowych osiągnięć w dziedzinie mechanizmu ekspresji genów u eukariontów. Przesłankę do rozpoczęcia tego typu badań stanowiły także doniesienia świadczące, że infekcja roślin powiązana jest najczęściej z syntezą oraz nagromadzeniem RNA (10, 11), nowych białek enzymatycznych (12, 13, 14) oraz izoenzymów o zmienionych proporcjach ilościowych (15, 16).

W artykule zostaną omówione jedynie te etapy ekspresji i regulacji genetycznej, które są bezpośrednio związane ze stabilizacją wzajemnych stosunków metabolicznych w układzie żywiciel — patogen. Analiza poinfekcyjnych zmian zostanie przeprowadzona na tle procesów normalnie przebiegających w zdrowych komórkach eukariontów.

II. Transkrypcja i procesy potranskrypcyjne u roślin zdrowych

Proces ekspresji genów, a także mechanizmy regulacji tego procesu u eukariontów są znacznie bardziej skomplikowane niż u prokariotów (17, 18, 19) i działają na etapach aktywacji chromatyny, specyficzności transkrypcyjnej polimeraz RNA oraz potranskrypcyjnych przekształceń prekursorów RNA.

II-1. Aktywacja chromatyny

Chromatyna eukariontów zbudowana jest z podjednostek zwanych nukleosomami, oddzielonych od siebie włóknami chromatynowymi (20, 21, 22). Rdzeń nukleosomu zbudowany jest z dwóch tetramerów, z których każdy zawiera cztery różne białka histonowe H_{2a} , H_{2b} , H_3 i H_4 . Wokół rdzenia białkowego utworzonego z histonów nawinięty jest łańcuch

DNA zbudowany z 200 par zasad. Między nukleosomami, które stanowią struktury kuliste, występują łączące je włókna chromatyny, gdzie trzeciorzędowa struktura DNA jest zdeterminowana obecnością jednego białka histonowego H_1 i heterogennej grupy białek niehistonowych. Struktura chromatyny przypomina zatem sznurek z nawiniętymi koralikami.

Ustalono, że jednostką transkrypcyjną chromatyny kodującą dużą prekursorową cząsteczkę mRNA, syntetyzowaną przez polimerazę II RNA jest kilka nukleosomów i włókna chromatyny zawarte między nimi. Jednostka transkrypcyjna podczas derepresji genów podlega zmianom allosterycznym z formy zamkniętej do formy otwartej, a proces ten nie jest związany z przemieszczeniem białek histonowych w nukleosomach (23, 24). Wykazano jednak, że zasadniczym czynnikiem regulującym aktywność genów jest współdziałanie DNA chromatyny z białkami niehistonowymi (23, 25, 26, 27). Wiadomo jednakże, że i histony w nukleosomach ulegających transkrypcji podlegają modyfikacjom poprzez metylowanie lub fosforylację (28).

Wyizolowane białka histonowe nukleosomów mają skłonność do spontanicznej tetrameryzacji *in vitro*, podczas której monomery łączą się w sposób przypadkowy (22).

II-2. Specyficzność transkrypcyjna polimeraz RNA

Organizmy prokariotyczne mają tylko jeden rodzaj polimerazy RNA (nukleotydylotransferaza RNA:nukleozydotrójfosforan) zbudowany z rdzenia katalitycznego i jednostek regulatorowych (29). Rdzeń zawiera cztery podjednostki ($\alpha_2\beta\beta'$) i katalizuje syntezę wiązań fosfodwuestrowych, jednostki regulatorowe są odpowiedzialne za inicjację i terminację transkrypcji. Każda zmiana struktury podjednostek wpływa na właściwości katalityczne enzymu (30, 31). Ustalono, że nawet bardzo subtelne modyfikacje monomerów enzymów oligomerycznych, jakim jest polimeraza RNA, prowadzą do całkowitej zmiany ich funkcji biologicznych.

Polimerazy RNA wyizolowano z wielu roślin wyższych (32, 33, 34) i grzybów (35, 36). Okazało się, że podobnie jak w innych organizmach eukariotycznych występuje tu wiele molekularnych form polimeraz RNA, a każda z nich zbudowana jest z dużej liczby podjednostek. Na ogół są to kompleksy multimeryczne zawierające dwie podjednostki wysokocząsteczkowe i kilka mniejszych łańcuchów polipeptydowych.

Stwierdzono, że w tej samej komórce polimerazy RNA z różnych organeli mają identyczny rdzeń katalityczny, a różnią się jednostkami regulatorowymi (37). Stąd można wnioskować, że specyficzność transkrypcyjna tych enzymów jest funkcją struktury i składu ich podjednostek regulatorowych.

Polimerazy RNA eukariontów podzielono na trzy klasy w zależności

od miejsca ich występowania i rodzaju prekursorowego RNA, jaki syntetyzują. Są to: polimeraza I odpowiedzialna za syntezę prekursorowego rRNA, polimeraza II katalizująca biosyntezę prekursorowego mRNA i polimeraza III syntetyzująca prekursorowy tRNA i 5S rRNA.

Każda z tych klas enzymów występuje w wielu formach molekularnych, a każda z tych form ma specyficzną funkcję i katalizuje syntezę RNA w różnych częściach genomu (36). Często zdarza się, że enzymy z różnych klas polimeraz mają niektóre podjednostki identyczne i wykazują wyraźną skłonność do wzajemnych przekształceń *in vitro* (38).

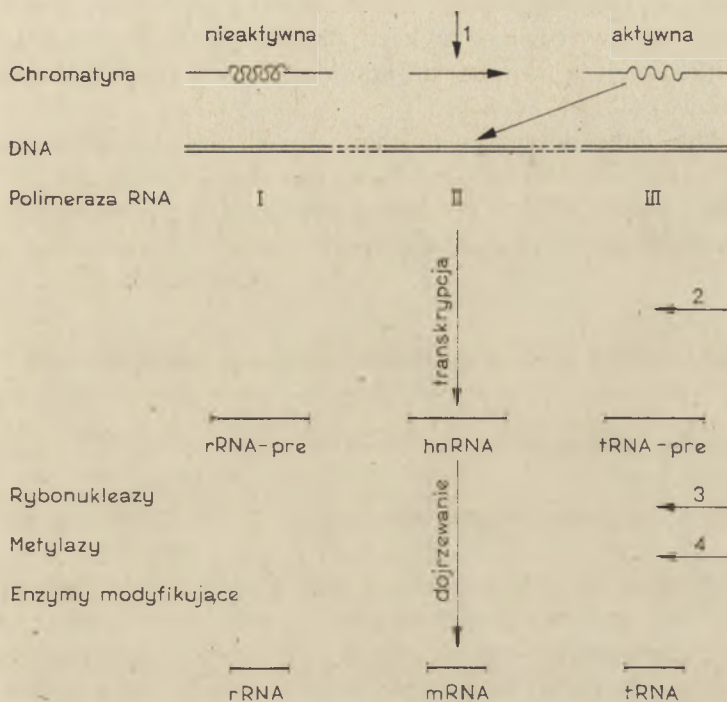
II-3. Potranskrypcyjne przekształcenia prekursorów RNA

Ekspresja genów u eukariontów prowadzi do syntezy prekursorowych cząsteczek RNA, które już podczas transkrypcji ulegają połączeniu z białkami tworząc kompleksy zwane rybonukleinowymi cząstkami jądrowymi RNP (39). Organizacja wewnętrzna tych cząstek może być porównywana do organizacji nukleosomu, a ich funkcja sprowadza się do stabilizacji strukturalnej i chemicznej transkryptu oraz do ułatwienia transportu RNA z jądra do cytoplazmy (40). Cząstki takie podlegają wieloetapowym przekształceniom potranskrypcyjnym w biologicznie aktywny mRNA, rRNA, i tRNA (18, 32, 41, 42). I jakkolwiek na każdym z tych etapów przekształceniu podlegają kompleksy RNP to w niniejszej pracy omówione zostaną jedynie przemiany cząsteczek RNA wchodzące w skład tych kompleksów. Procesy dojrzewania wszystkich trzech klas RNA znacznie się od siebie różnią ale elementem wspólnym jest tu udział takich enzymów jak rybonukleazy (nukleotydo-2'-transferazy rybonuleinianu) i metylazy (metylotransferazy).

W komórkach roślin wyższych dojrzewanie prekursorowych cząsteczek mRNA jest regulowane w podobny sposób jak w komórkach ssaków (43, 44). Proces dojrzewania jest kilkuetapowy, w którym pierwotny transkrypt, zwany heterogennym jądrowym RNA (hnRNA) podlega skomplikowanym przekształceniom poprzedzającym jego transport do cytoplazmy. Etapy te to poliadenylacja, która następuje wkrótce po ukończeniu transkrypcji i polega na dołączeniu do końca 3'-OH około 100—200 reszt adenylowych. Wycinanie przez rybonukleazy i odrzucenie sekwencji niekodujących, w wyniku czego „odsłania się” koniec 5' cząsteczki. A wreszcie skutkiem kilku kolejnych reakcji katalizowanych głównie przez fosfohydrolazy i metylazy dochodzi do „oczapeczkowania” końca 5', który przyjmuje następującą strukturę: m⁷GpppAmpGpUpC (45). Dotychczas nie ustalono, czy syntetyzowany hnRNA jest mono czy policistronowy.

Geny kodujące rRNA znajdują się w jąderkowym DNA i transkrybowane są jako pojedyncze cząsteczki prekursorowe 45S. Cząsteczki takie

obejmują sekwencje nukleotydów 28S rRNA, 18S rRNA i dodatkowe sekwencje nierybosomalne (46). Bezpośrednio po zakończeniu transkrypcji cząsteczki ulegają rozległej metylacji, a następnie kolejnym procesom rozszczepiania przy udziale rybonukleaz (47). W wyniku działania rybonukleaz eliminacji i hydrolizie podlegają odcinki niemetylowane, których sekwencja zasad jest typu nierybosomalnego.



Ryc. 1. Mechanizm ekspresji genów w komórkach eukariontów. Strzałki z numerami wskazują punkty regulacji tego procesu, których zmiany po infekcji patogenów omówione są w rozdziale III.

Proces dojrzewania prekursorowych cząsteczek tRNA obejmuje także etap przycinania ich na obu końcach przez rybonukleazy. Następne dwa etapy są już jednak charakterystyczne tylko dla tej klasy RNA i obejmują przyłączenie na końcu 3' cząsteczek trójnukleotydu CCA oraz modyfikację zasad przez enzymy modyfikujące (48, 49, 50).

Mechanizm ekspresji genów w komórkach eukariontów ze wskazaniem punktów regulacji tego procesu omawianych w następnym rozdziale przedstawia Ryc. 1 (51). Z danych zamieszczonych w tym schemacie wynika wyraźnie, że zdecydowaną rolę w regulacji procesu ekspresji genów odgrywa specyficzność działania takich enzymów, jak polimerazy RNA, rybonukleazy i metylazy.

Z drugiej strony wiadomo powszechnie, że większość enzymów komórkowych ma charakter oligomeryczny o różnej liczbie podjednostek. Podjednostki te można rozdzielać różnymi metodami, można także w określonych warunkach łączyć rozdzielone monomery. W ten sposób można uzyskiwać hybrydy międzykankowe, międzygatunkowe, a nawet międzyrodzajowe (52, 53). Ustalono przy tym, że nawet niewielkie zmiany w strukturze, czy składzie podjednostek wywołują radykalne zmiany we właściwościach katalitycznych i regulacyjnych enzymów. Przedstawione w schemacie enzymy również wykazują strukturę oligomeryczną, w której podjednostki asocjują na zasadzie komplementacji śródcistronowej i międzycistronowej (33, 44, 54, 55).

Omówione dane dotyczące mechanizmu ekspresji genów u eukariontów oraz roli w regulacji tego procesu niektórych enzymów i białek posłużyły jako punkt wyjścia do badań nad kierunkiem zmian tych procesów na różnych etapach patogenezy roślin.

III. Transkrypcja i procesy potranskrypcyjne u roślin chorych

III-1. Zmiany w aktywności chromatyny

Wydajność transkrypcyjna chromatyny z liści pszenicy porażonych rdzą jest znacznie wyższa niż chromatyny z liści zdrowych (56, 57), niezależnie od tego czy w badaniach *in vitro* stosowano endogenną polimerazę RNA czy polimerazę uzyskaną z *E. coli*. Jako efekt zwiększonej aktywności chromatyny obserwuje się po infekcji syntezę i nagromadzenie znacznych ilości RNA, a w następnej kolejności białek (58, 59, 60, 61, 62, 63). W jądrach komórek przylegających bezpośrednio do komórek porażonych wzrasta zawartość RNA i białek niehistonowych następuje już w 4 godziny po inokulacji (59, 64, 65). Zwiększony poziom białek, w tym również białek niehistonowych, może wpływać na aktywację reprimowanych trwale lub okresowo cistronów i umożliwiać proces transkrypcji. Następstwem tego jest zwiększenie tempa biosyntezy wszystkich klas RNA — mRNA, rRNA i tRNA (66, 67, 68). Analiza składu zasad nowo syntetyzowanego RNA wykazała, że obok normalnie produkowanych form komórkowego RNA pojawiają się formy o strukturze unikalnej, nietypowej. Na przykład we wstępnych etapach interakcji żywiciel-patogen obserwuje się preferencję syntezy RNA, w którym stosunek zasad A+U/G+C jest bardzo wysoki (64). Flynn i współpr. stosując w pozakomórkowych układach syntetyzujących chromatynę z pszenicy zdrowej i porażonej rdzą żdźbłową stwierdzili, że w wyniku infekcji pojawiają się cząsteczki RNA o niezwykłych rozmiarach, niespotykane ani w komórkach żywiciela ani patogenu. Wykazano w ten sposób,

że nowe formy strukturalne RNA pojawiające się po infekcji roślin są produkowane drogą ekspresji genów żywiciela wskutek zmienionej aktywności chromatyny (56).

III-2. Zmiany w specyficzności polimeraz RNA

Wszelkie zmiany metabolizmu komórki niezależnie od wywołującego je bodźca są poprzedzane zmianami w ilości i wzajemnych proporcjach różnych klas polimeraz RNA (69, 70). Zjawiska te występują wyraźnie także podczas zmiany metabolizmu komórki pod wpływem infekcji patogenami obligatoryjnymi. Ustalono, że patogeny wpływają nie tylko na zmiany ilościowe polimeraz RNA, ale zmieniają także ich specyficzność transkrypcyjną (56). Na przykład polimerazy RNA I i II wyizolowane z liści pszenicy porażonej rdzą wykazują znaczne zmiany w wyborze matrycy w porównaniu z enzymami z roślin zdrowych; zmieniają się także właściwości kinetyczne i katalityczne tych enzymów. Badając mechanizm zjawiska zmiany specyficzności transkrypcyjnej i aktywności polimeraz RNA po infekcji stwierdzono, że polimerazy roślinne są bardzo wrażliwe na działanie stymulatorów polipeptydowych (44). Stymulatory te wielokrotnie zwiększają zarówno częstotliwość inicjacji, jak i szybkość elongacji łańcuchów RNA. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że funkcję stymulatorów polimeraz RNA w roślinach porażonych spełniają polipeptydy uwalniane przez mikroorganizmy (1). Polimerazy RNA mogą również zmieniać właściwości katalityczne wskutek zmian struktury wynikających z uczestnictwa w tworzeniu formy multimerycznej podjednostek regulatorowych produkowanych przez patogeny. Po asocjacji powstają wówczas hybrydy monomerów żywiciela i patogenu.

III-3. Zmiany w procesie dojrzewania RNA

Potranskrypcyjne przekształcenia prekursorowych cząsteczek RNA są katalizowane głównie przez rybonukleazy, metylazy i enzymy modyfikujące. Stąd poinfekcyjne zmiany w strukturze tych enzymów będą rzutowały na ich aktywność i specyficzność katalityczną, a w konsekwencji na strukturę i poziom różnych populacji dojrzających cząsteczek RNA.

III-3-1. Rybonukleazy

Wzrost aktywności rybonukleaz jest zjawiskiem, które powszechnie towarzyszy procesowi starzenia się tkanek, zranieniom mechanicznym, a także stresom wywołanym przez szok termiczny czy suszę (71). Znaczne zmiany w aktywności tych enzymów występują także wskutek stresu wy-

wołanego infekcją przez mikroorganizmy chorobotwórcze (63, 72, 73, 74, 75, 76). Dotychczas interpretacja tego zjawiska była jednoznaczna: zwiększoną aktywność rybonukleaz wiązano z możliwością degradacji RNA w komórkach porażonych przez enzymy uwalniane przez mikroorganizmy.

Obecnie wyniki analizy poinfekcyjnych zmian ilościowych rybonukleaz, a także zmian we właściwościach katalitycznych i strukturalnych tych enzymów skłoniły Chakraborty i Shaw do uwypuklenia ich roli w potranskrypcyjnym procesie dojrzewania RNA (51).

Rozpatrując poinfekcyjne zmiany ilościowe zauważono, że wzrost aktywności rybonukleaz u roślin wrażliwych i odpornych jest zróżnicowany (77). U roślin wrażliwych aktywność tych enzymów wzrasta w dwóch fazach choroby: wczesnej i późnej, u odpornych tylko w fazie wczesnej. Wzrost aktywności po infekcji jest skorelowany z pojawieniem się w komórce porażonej nowych cząsteczek rybonukleaz o właściwościach kinetycznych i katalitycznych zupełnie różnych od rybonukleaz z roślin zdrowych i organizmów patogenicznych (74, 75, 78, 79). Jednakże wielkość tych zmian nie jest funkcją ilości grzybni rozwijającej się w tkankach żywiciela (77). Nie można także wykluczyć możliwości, że występowanie poważnych zmian jakościowych we właściwościach katalitycznych rybonukleaz po infekcji przebiega bez widocznych zmian w ilości tego enzymu.

Po wyizolowaniu i oczyszczeniu rybonukleazy ze zdrowych i porażonych liścienu oznaczono jej ciężar cząsteczkowy, specyficzność substratową oraz wpływ różnych czynników na aktywność tego enzymu (80). Na podstawie wyników tych badań ustalono, że rybonukleaza z liścienu roślin zdrowych jest zbudowana z monomerów stanowiących dwa różne typy. Natomiast enzymy z roślin porażonych zbudowane są przynajmniej z monomerów trzech różnych typów, z których jednego w ogóle nie zawierają rybonukleazy roślin zdrowych. Wysunięto przypuszczenie, że nowy składnik rybonukleaz, który pojawia się po infekcji jest polipeptydem syntetyzowanym w komórkach żywiciela wskutek indukcji przez mikroorganizmy. Wyniki tych badań zostały potwierdzone w stosunku do innych układów żywiciel-patogen (74, 75, 76). Rybonukleazy zatem, podobnie jak omówione wcześniej polimerazy RNA, wykazują ścisłą zależność funkcji od struktury i składu podjednostek, a zmiany struktury spowodowane ingerencją czynników chorobotwórczych w metabolizm komórki wywołują zmiany właściwości katalitycznych tych enzymów.

Ponieważ poinfekcyjny wzrost aktywności rybonukleaz zbiega się z okresem intensywnego gromadzenia różnych frakcji RNA Chakraborty i współpr. (80) sugerują, że rybonukleazy mogą „przycinać” prekursorowe cząsteczki na różnych etapach potranskrypcyjnego przekształcania RNA. W ten sposób enzym ten odgrywa niewątpliwie jedną z najważniejszych ról w zmianie regulacji procesu ekspresji genów podczas rozwoju choroby.

Rybonukleaza syntetyzowana po infekcji lnu rdzą zbudowana jest z podjednostek zarówno w typie patogenu, jak i w typie żywiciela (73, 78). Analizując te dane pod kątem mechanizmu poinfekcyjnej biosyntezy enzymu można przypuszczać, że powstaje on albo drogą komplementacji międzycystronowej polipeptydów indukowanych pod wpływem metabolitów patogenu albo jako heterologiczna hybryda zbudowana z monomerów produkowanych przez żywiciela i patogena.

III-3-2. Metylazy

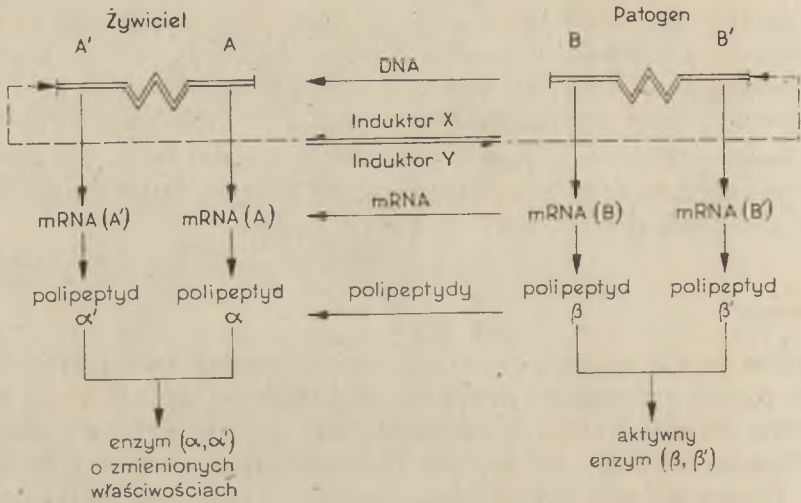
Analiza poinfekcyjnych zmian w składzie różnych frakcji RNA wykazała, że rośliny jęczmienia porażonego mączniakiem nie zawierają wogóle 18S rRNA, chociaż frakcja ta normalnie występuje w roślinach zdrowych (82). Zarówno rośliny zdrowe, jak i porażone natomiast zawierają 28S rRNA. Ponieważ 18S i 28S rRNA są syntetyzowane razem w postaci jednej dużej cząsteczki prekursorowej zanik frakcji 18S rRNA u roślin porażonych musi wynikać z defektu w potranskrypcyjnym przekształcaniu prekursorowego rRNA. Defekt ten prawdopodobnie polega na zniekształceniu struktury metylaz, a co za tym idzie i ich funkcji. Nieprecyzyjne zmetylowanie cząsteczki prekursora prowadzi do wycięcia przez rybonukleazę i zhydrolizowania niezmetrylowanych odcinków pre-rRNA.

Jeżeli zatem we wczesnej fazie interakcji żywiciel-patogen dojdzie do indukowanej przez patogena zmiany choćby tylko w jednej populacji enzymów dojrzewania, to zmiana ta zapoczątkuje cały ciąg zdarzeń zakłócający mechanizm ekspresji genów w komórce żywiciela.

VI. Uwagi końcowe

Na podstawie danych uzyskanych w toku dotychczasowych badań nad kierunkami zmian w procesie regulacji metabolicznej przez patogeny obligatoryjne Chakravorty i Shaw (1) opracowali schemat obrazujący przypuszczalny łańcuch poinfekcyjnych zdarzeń w komórkach żywiciela i patogenu (Ryc. 2). Schemat ten opiera się na hipotezie „gen-nagen” ustalonej metodami genetyki klasycznej (82, 84, 85). Według tej hipotezy każdemu genowi determinującemu odporność w komórkach żywiciela odpowiada ściśle określony gen determinujący wirulencję w komórkach patogenu. Innymi słowy w tych dwóch wchodzących ze sobą w kontakt organizmach istnieją pary genów, których produkty mogą wzajemnie na siebie oddziaływać. Efektem tego wzajemnego oddziaływania jest ustalenie się między tymi organizmami określonej zależności, co manifestuje się bądź reakcją odporną, bądź wrażliwą żywiciela.

Zasadnicze stadium interakcji żywiciel-patogen rozpoczyna się od momentu kiedy trwale reprimowany gen A' żywiciela ulega derepresji pod



Ryc. 2. Hipotetyczny schemat metabolicznej interakcji żywiciela-patogenu.

wpływem induktora X uwalnianego przez patogen. Jednocześnie w tej samej komórce ulega ekspresji gen A funkcjonujący normalnie w komórkach zdrowych. Jako efekt ekspresji tych dwóch genów rozpoczyna się synteza dwóch rodzajów mRNA, a następnie dwóch rodzajów polipeptydów. Między tymi polipeptydami może dojść do asocjacji skutkiem czego będzie utworzenie enzymu o składzie podjednostek α_n , α'_n . Właściwości katalityczne takiego enzymu będą oczywiście różne od enzymu α_n z roślin zdrowych. Stanowi to przykład zmienionej komplementacji międzycistronowej enzymów żywiciela wywołanej wskutek translokacji produkowanych przez patogen specyficznych induktorów.

Podobny ciąg zdarzeń może zostać zainicjowany w komórce patogenu przez induktory uwalniane przez żywiciela. I tak induktor Y uwalniany przez żywiciela może indukować ekspresję cistronu B' e patogenu; w następstwie tego pojawiają się polipeptydy β' , które drogą komplementacji międzycistronowej utworzą z produktem cistronu B aktywną formę enzymu β , β' . Enzymy tego typu mogą katalizować reakcję wspierającą wzrost patogenu w tkankach rośliny.

Niezależnie od tych zmian w „pionowej” regulacji ekspresji genów w kombinacji żywiciel-patogen możliwe jest wzajemne przenikanie metabolitów na różnych poziomach procesu przekazywania informacji genetycznej: na poziomie DNA na zasadzie transdukcji (86, 87), podczas translokacji induktorów, na poziomie mRNA oraz polipeptydowych składników enzymów oligo- i multimerycznych. Jeżeli enzymy, które podlegają zmianie struktury wskutek komplementacji międzycistronowej czy nawet międzyrodzajowej podjednostek katalizują procesy ekspresji genów, np. transkrypcję (polimerazy RNA) lub przekształcenia potranskrypcyjne (rybonukleazy, metylazy) to jako nieuchronna konieczność pojawiają

się nowe enzymy o właściwościach niespotykanych ani w komórkach żywiciela ani patogenu. Zmiana struktury tych enzymów rzutując na ich funkcję zapoczątkuje całą lawinę procesów prowadzących albo do ustalenia określonej równowagi w układzie żywiciel-patogen albo do całkowitego rozkojarzenia metabolizmu żywiciela i swobodnego rozwoju choroby.

Zaakceptowano do druku 9.09.1980.

PIŚMIENNICTWO

1. Chakravorty A. K., Shaw M., (1977), *Biol. Rev.*, **52**, 147—179.
2. Grzelińska A., (1976), *Post. Bioch.*, **22**, 53—64.
3. Cruickshank I. A. M., (1963), *Ann. Rev. Phytopath.*, **1**, 351—374.
4. Deverall B. J., (1976), *Ann. Proc. Phytochem. Soc.*, **13**, 208—224.
5. Kuć J., Currier W. W., Shih M. J., (1976), *Ann. Proc. Phytochem. Soc.*, **13**, 225—237.
6. Vanetten H. D., Pueppke S. G., (1976), *Ann. Proc. Phytochem. Soc.* **13**, 239—289.
7. Bailey J. A., Burden R. S., (1973), *Physiol. Plant Pathol.*, **3**, 171—177.
8. Sato N., Tomiyama K., Katsui N., Masamune T., (1968), *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **34**, 344—345.
9. Cruickshank I. A. M., Perrin D. R., (1971), *Phytopath. Z.*, **70**, 209—229.
10. Heitefuss R., (1966), *Ann. Rev. Phytopath.*, **4**, 221—244.
11. Shaw M., (1967), *J. Bot.*, **45**, 1205—1220.
12. Staples R. C., Stahmann M. A., (1963), *Science*, **140**, 1320—1321.
13. Sako N., Stahmann M. A., (1972), *Physiol. Plant Pathol.*, **2**, 217—226.
14. Staples R. C., Stahmann M. A., (1964), *Phytopathology*, **54**, 760—764.
15. Grzelińska A., (1970), *Phytopath. Z.*, **69**, 212—222.
16. Sridhar R., (1978), *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.*, **13**, 161—164.
17. Carpenter G., Sells B. H., (1975), *Int. Rev. Cytology*, **41**, 29—58.
18. Darnell J. E., (1975), *The Eucaryote Chromosome*, str. 185—198; National University, Canberra, Australia.
19. Mazuś B., (1979), *Post. Bioch.*, **25**, 501—531.
20. Crick F. H. C., (1971), *Nature*, **234**, 25—27.
21. Kornberg R. D., (1974), *Science*, **184**, 868—871.
22. Kornberg R. D., Thomas J. O., (1974), *Science*, **184**, 865—868.
23. Paul J., (1972), *Nature*, **238**, 444—446.
24. Gottesfield J. M., Murphy R. F., Bonner J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 4404—4408.
25. Reeves R., Jones A., (1976), *Nature*, **260**, 495—500.
26. Stein G., Spelsberg T. C., Kleinsmith L. J., (1974), *Science*, **183**, 817—824.
27. Kostraba N. C., Montagna R. A., Wang T. Y., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1548—1555.
28. Ruiz-Carrillo A., Wang L. J., Allrey V. G., (1975), *Science*, **190**, 117—127.
29. Lewin B., (1970), *Nature*, **227**, 1009—1013.
30. Travers A. A., (1970), *Nature*, **225**, 1009—1012.
31. Leighton T. J., Doi R. H., Warren R. A., Kell R. A., (1973), *J. Molec. Biol.*, **76**, 103—122.

32. Duda C. T., (1976), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **27**, 119—132.
33. Smith H. J., Bogorad L., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4839—4842.
34. Link G., Richter G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **395**, 337—346.
35. Gong C. S., Vanetten J. L., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **272**, 44—52.
36. Buhler J. M., Iborra F., Sentenac A., Tromageot P., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1712—1717.
37. Polya G. M., Jagendorf A. T., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 649—657.
38. Valenzuela P., Hager G., Wienberg F., Rutter W. J., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1024—1028.
39. Van Venrooij W. J., Jansen D. B., (1978), *Molec. Biol. Rep.*, **4**, 3—8.
40. Samarina O. P., Lukauidin E. M., Molnar J., Georgiev G. P., (1968), *J. Mol. Biol.*, **33**, 251—263.
41. Robertson H. D., Dunn J. J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3050—3056.
42. Sahano H., Shimura Y., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3369—3373.
43. Darnell J. E., Jelinek W. R., Molloy G. R., (1973), *Science*, **181**, 1215—1221.
44. Biswas B. B., Ganguly A., Das A., (1975), *Prog. Nucleic Acid res. Mol. Biol.*, **15**, 145—184.
45. Shimotohno K., Miura K., (1976), *FEBS Lett.*, **64**, 204—208.
46. Cecchini J. P., Miassod R., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **418**, 104—116.
47. Kuriyama Y., Luch D. J. L., (1974), *J. Mol. Biol.*, **83**, 253—266.
48. Chen G. S., Siddiqui M. A., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2610—2613.
49. Lamform H., Sarabhai A., Nierlich D. P., Abelson J., (1973), *Nature*, **246**, 913—914.
50. Sahano H., Shimura Y., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3369—3373.
51. Chakravorty A. K., Shaw M., (1977), *Ann. Rev. Phytopath.*, **15**, 135—151.
52. Li J. J., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 812—814.
53. O'Donovan G. A., Holoubek H., Gerhart J. C., (1972), *Nature*, **238**, 264—266.
54. Libonati M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 440—445.
55. Crestfield A. M., Fruchter R. G., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 3279—3284.
56. Flynn J. H., Chakravorty A. K., Scott K. J., (1976), *Proc. Aust. Biochem. Soc.*, **9**, 44.
57. Scott K. J., Chakravorty A. K., Flynn F. G., (1976), *Austr. Plant Pathol. Soc.*, **5**, 9.
58. Pure G. A., Chakravorty A. K., Scott K. J., (1979), *Physiol. Plant Pathol.*, **15**, 201—209.
59. Yoshikawa M., Masago H., (1977), *Physiol. Plant Pathol.*, **10**, 125—138.
60. Sułtanow U., Aksenowa W. A., (1978), *Biol. Nauki (mosc)*, **11**, 99—104.
61. Aszirowa Z. K., Plechanow L. S., Ibragimow A. R., (1978), *Uzb. Biol. Z. H.*, **2**, 79—81.
62. Callow J. A., (1976), *Ann. Proc. Phytochem. Soc.*, **13**, 305—330.
63. Grzelińska A., (1969), *Phytopath. Z.*, **66**, 374—380.
64. Chakravorty A. K., Shaw M., (1971), *Biochem. J.*, **123**, 551—557.
65. Broembsen S., Hadweger L. A., (1972), *Phytopathology*, **62**, 1106—1112.
66. Wolf G., (1968), *Neth. J. Plant Pathol.*, **74**, 19—23.

67. Tani T., Yoshikawa M., Naito N., (1971), *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **37**, 43—51.
68. Tani T., Yoshikawa M., Naito N., (1973), *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **39**, 7—13.
69. Rizzo P. J., Cherry J. H., (1975), *Plant Physiol.*, **55**, 574—577.
70. Sebastian J., Takano I., Halvorson H. O., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 769—773.
71. Wyen N. V., Erdei S., Farkas G. L., (1971), *Biochem. Biophys. Acta*, **232**, 472—483.
72. Rohringer H. D., Samborski D. J., (1961), *Can. J. Bot.*, **39**, 775—784.
73. Scrubb L. A., Chakravorty A. K., Shaw M., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 73—79.
74. Charavorty A. K., Scott K. J., (1979), *Physiol. Plant Pathol.*, **14**, 85—97.
75. Chakravorty A. K., Scott K. J., (1979), *Phytopathology*, **69**, 369—371.
76. Simpson R. S., Chakravorty A. K., Scott K. J., (1979), *Physiol. Plant Pathol.*, **14**, 245—258.
77. Chakravorty A. K., Shaw M., Scrubb L. A., (1974), *Nature*, **247**, 577—580.
78. Chakravorty A. K., Shaw M., Scrubb L. A., (1974), *Physiol. Plant Pathol.*, **4**, 313—334.
79. Harvey A. E., Chakravorty A. K., Shaw M., Scrubb L. A., (1974), *Physiol. Plant Pathol.*, **4**, 359—371.
80. Chakravorty A. K., Shaw M., Scrubb L. A., (1974), *Physiol. Plant Pathol.*, **4**, 335—358.
81. Hamilton W. E., MA Thesis Univ. Saskatchewan, Saskatoon, Canada.
82. Bennett J., Scott K. J., (1971), *FEBS Lett.*, **16**, 93—95.
83. Day P. R., (1974), *Genetics of Host-Parasite Interaction*, Freeman, San Francisco.
84. Flor H. H., (1971), *Ann. Rev. Phytopath.*, **9**, 275—296.
85. Person C. O., (1967), *Can. J. Bot.*, **45**, 1193—1204.
86. Yamamoto M., Matsou K., (1976), *Nature*, **259**, 63—65.
87. Mc Intyre J. K., Kuć J., Williams E. B., (1975), *Physiol. Plant Pathol.*, **7**, 153—170.

CZESŁAW S. CIERNIEWSKI *), TADEUSZ KRAJEWSKI **)

Interakcje osoczowych czynników krzepnięcia krwi

Interactions of Blood Coagulation Factors

Spis treści

- I. Wprowadzenie**
- II. Wewnątrzpochodny układ krzepnięcia krwi**
 - II-1. Reakcje zachodzące na aktywnej powierzchni**
 - II-2. Dalsze reakcje układu wewnątrzpochodnego**
- III. Zewnątrzpochodny układ krzepnięcia krwi**
- IV. Reakcje wspólne dla obu układów**
 - IV-1. Aktywacja czynnika X**
 - IV-2. Budowa protrombiny i jej konwersja do trombiny**
 - IV-3. Rola trombiny w końcowych etapach krzepnięcia krwi**
 - IV-4. Znaczenie witaminy K**
- V. Regulacja procesu krzepnięcia krwi**

Contents

- I. Introduction**
- II. Intrinsic pathway of blood coagulation**
 - II-1. Surface-mediated reactions**
 - II-2. Other reactions of intrinsic pathway**
- III. Extrinsic pathway of blood coagulation**
- IV. Common pathway**
 - IV-1. Activation of Factor X**
 - IV-2. Structure of prothrombin and its conversion to thrombin**
 - IV-3. Role of thrombin in final steps of blood coagulation**
 - IV-4. Role of vitamin K**
- V. Regulation of blood coagulation**

I. Wprowadzenie

U podstaw zjawiska krzepnięcia krwi leży interakcja płytek krwi i niektórych białkowych składników osoczowych z kolagenem ścian na-

*) Dr hab., **) Prof. dr hab., Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12/16, 90-237 Łódź.

czynń krwionośnych z jednej strony, a aktywacja określonych czynników krzepnięcia przez uwolniony z uszkodzonych komórek czynnik tkankowy z drugiej. We wstępnej fazie krzepnięcia pojawia się czop płytkowy, który jest bardzo luźno związany z włóknami kolagenowymi ściany naczyń i jeżeli proces ten nie postępuje dalej, łatwo odrywa się pod wpływem działania strumienia przepływającej krwi. Dla zapewnienia trwałości powstałego skrzepu musi być uruchomiony tzw. kaskadowy system osoczowych czynników krzepnięcia krwi. Ich lawinowa przemiana prowadzi do pojawienia się trombiny, która przekształca fibrynogen w monomery włóknika, osadzające się na agregatach płytkowych. Luźny skrzep ulega stabilizacji, retrakcji i w efekcie tworzy się zwarty czop hemostatyczny, tamujący krwawienie.

Większość osoczowych czynników krzepnięcia krwi ma charakter proenzymów. Ich przejście w formę aktywną jest wynikiem bardzo ograniczonej proteolizy cząsteczki obejmującej najczęściej hydrolizę tylko jednego lub dwóch wiązań peptydowych. Towarzyszą temu znaczne przekształcenia konformacyjne, które powodują odsłonięcie centrum enzymatycznego cząsteczki. W ten sposób z odpowiednich proenzymów powstają niezwykle specyficzne proteazy serynowe, jak np. czynniki: IIa, IXa, Xa, XIa i XIIa oraz kallikreina. Do proteaz serynowych układu krzepnięcia krwi należy również czynnik VII, który aktywuje się po skompleksowaniu z lipoproteinami uwalnianymi z uszkodzonych tkanek. Naturalnymi substratami tych proteaz serynowych są cząsteczki kolejnych czynników kaskadowego układu krzepnięcia krwi (1). W podobny sposób aktywują się cząsteczki czynnika XIII, które po przejściu w formę XIIIa charakteryzują się aktywnością transglutaminazową.

Oprócz czynników o naturze enzymatycznej, w reakcjach krzepnięcia krwi biorą udział białka pełniące funkcję regulatorową (czynniki V, VIII, wyskokcząsteczkowy kininogen). Niektóre z nich, np. czynnik V, a być może i VIII, również wymagają aktywacji, polegającej na częściowej hydrolizie cząsteczki. Pełnią one funkcję kofaktorów przyspieszających przebieg określonych etapów krzepnięcia krwi. Do prawidłowego przebiegu niektórych etapów tego procesu wymagana jest ponadto obecność kilku niebiałkowych czynników, np. jonów Ca^{+2} , fosfolipidów oraz pośrednio witaminy K. Ta ostatnia nie bierze bezpośrednio udziału w reakcjach krzepnięcia krwi, jest natomiast niezbędna do syntezy cząsteczek czynników zawierających miejsca wiążące jony Ca^{+2} (czynniki II, VII, IX i X). Nazwy oraz niektóre właściwości czynników krzepnięcia krwi zestawione są w Tabeli 1.

Ponad sto lat temu Lister (2) zaobserwował, że krew wynaczyniona po kontakcie ze szkłem dość szybko krzepnie. Dzisiaj wiadomo, że za inicjację krzepnięcia w takich warunkach odpowiedzialne jest białko, określone jako czynnik XII, które aktywuje się pod wpływem ujemnie naładowanych powierzchni (3). Pojawienie się skrzepu w takich warunkach

Tabela 1

Ogólne właściwości czynników krzepnięcia krwi

Czynniki krzepnięcia							
Nazwa właściwa	Skrót	Nazwa powszechna	Cząsteczka rodzinna	Cząsteczka zredukowana	Wewnątrz-pochodny	Zewnątrz-pochodny	Oдноśnik
Czynnik I	cz I	Fibrinogen	340 000	64 000	+	+	144
Czynnik II	cz II	Protrombina	70 000	56 000			
Czynnik III	cz III	Czynnik tkankowy, trombo-plastyka		48 000			
Czynnik IV	cz IV	Jony Ca ⁺²		70 000	+	+	109
Czynnik V	cz V	Proakceleryna	1 200 000	220 000			29
				300 000	+	+	
Czynnik VII	cz VII	Prokonwertyna	45 500	290 000			
Czynnik VIII	cz VIII	Antyhemofilowy czynnik A	600 000—20 000 000	200 000	+	+	102
				45 500			62
Czynnik IX	cz IX	Czynnik Christmasy	55 400	55 400	+	+	43,92
Czynnik X	cz X	Czynnik Stuarta	58 000	35 000	+	+	92
				17 000			
Czynnik XI	cz XI	Plasma thromboplastin antecedent	120 000	60 000	+	+	42
Czynnik XII	cz XII	Czynnik Hagemana	80 000	80 000	+	+	7—8
Czynnik XIII	cz XIII	Czynnik Stabilizujący włóknik	300 000	88 000	+	+	114
HMW kininogen		Czynnik Fitzgeralda	197 000	197 000	+	+	12
Prekallikreina		Czynnik Fletchera	105 000—127 000	105 000—127 000	+	+	15—16

jest wynikiem reakcji zachodzących wyłącznie pomiędzy składnikami osocza. Wszystkie te reakcje tworzą tzw. wewnątrzpochodny układ krzepnięcia krwi. Alternatywny mechanizm inicjacji krzepnięcia krwi polega na kontakcie innego składnika osocznego, tj. czynnika VII z substancjami uwalnianymi z uszkodzonych komórek. Ten mechanizm wymaga więc obecności dodatkowego, niesocznego składnika i dlatego określany jest jako zewnątrzpochodny układ krzepnięcia krwi.

In vitro, oba układy możemy badać oddzielnie. Po wstępnych zasadniczo odmiennych reakcjach, oba układy prowadzą do aktywacji czynnika X. Kolejne fazy krzepnięcia krwi, tj. przekształcenie protrombiny w trombinę, konwersja fibrynogenu we włóknik i ostateczne uformowanie czopu hemostatycznego przebiegają w taki sam sposób.

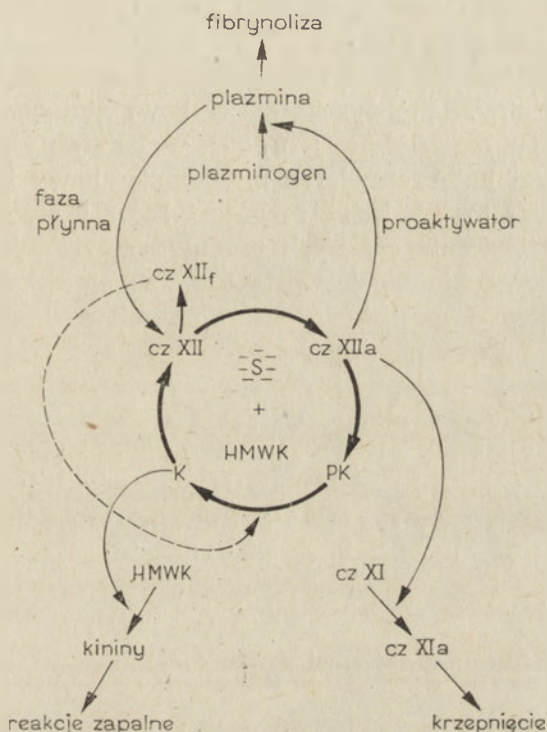
II. Wewnątrzpochodny układ krzepnięcia krwi

Budowa i własności cząsteczek czynnika XII, wysokocząsteczkowego kininogenu oraz prekallikreiny, które biorą udział w reakcjach rozpoczynających przemianę układu wewnątrzpochodnego, fibrynolizę oraz produkcję kinin (Rycina 1) zostały obszernie opisane w ostatnich artykułach przeglądowych (4, 5).

Mechanizm aktywacji czynnika XII nie jest jeszcze dokładnie poznany. Wiadomo, że reakcja ta może przebiegać w dwojaki sposób: a) w fazie stałej, po zaadsorbowaniu czynnika XII na ujemnie naładowanych powierzchniach, b) w fazie ciekłej, pod wpływem enzymów proteolitycznych, np. plazminy, kallikreiny czy tripsyny. Podczas aktywacji proteolitycznej jednołańcuchowa cząsteczka czynnika XII o masie cząsteczkowej 80 000 ulega rozpadowi (6, 7). W zależności od intensywności trawienia powstają produkty, które zawierają dwie lub trzy podjednostki peptydowe powiązane ze sobą mostkami dwusiarczkowymi. W pierwszym etapie hydrolyzy pojawiają się fragmenty o masie cząsteczkowej 52 000 i 28 000 daltonów. Dalsza hydroliza prowadzi do rozbicia dodatkowego wiązania peptydowego w większej podjednostce i powstania fragmentów o masie cząsteczkowej 40 000 i 12 000. Nieaktywny czynnik XII ma ukrytą reaktywną resztę serynową i włącza śladowe ilości diizopropylofluorofosforanu. Po aktywacji obserwuje się gwałtowny wzrost inkorporacji diizopropylofluorofosforanu, który wiąże się w równomolowych ilościach z podjednostką 28 000 daltonów. Wstępne analizy sekwencji aminokwasowej tego czynnika wykazały, że bezpośrednie sąsiedztwo reaktywnej seryny (Asp-Ser-Gly) jest bardzo podobne do tego, jakie występuje w cząsteczkach innych proteaz serynowych układu krzepnięcia krwi (8).

Zwykła adsorpcja jednołańcuchowej formy cząsteczek czynnika XII na celicie lub kaolinie nie wystarcza do odsłonięcia reaktywnej seryny. W takiej postaci czynnik XII włącza do cząsteczki tylko niewielkie ilości

diizopropylodifluorofosforanu, tj. 0.014 mola/mol białka (7). Obszary cząsteczki czynnika XIIa, odpowiedzialne za adsorpcję na ujemnie naładowanych powierzchniach, znajdują się na podjednostce 52 000 daltonów, a po jej dalszej hydrolizie, na fragmencie 40 000 daltonów (6). W tej interakcji pośredniczą ugrupowania guanidynowe reszt argininowych cząsteczki czynnika XIIa (9).



Rycina 1. Schemat obrazujący reakcje przebiegające na ujemnie naładowanych powierzchniach (S) po zaadsorbowaniu cząsteczek czynnika XII, wysokocząsteczkowego kinogenu (HMWK) i prekallikreiny (PK). Cz XII_f oznacza fragment czynnika XII o masie cząsteczkowej 28 000 powstający w wyniku enzymatycznej aktywacji czynnika XII. Aktywacja układu fibrynolitycznego przez czynnik XIIa odbywa się za pośrednictwem niezupełnie jeszcze określonego proaktywatora. Uważa się, że może być nim prekallikreina albo czynnik XI.

Kluczowe znaczenie dla rozwoju aktualnych koncepcji na temat mechanizmu reakcji przebiegających na ujemnie naładowanych powierzchniach miało stwierdzenie identyczności czynnika Fletchera (10) i prekallikreiny (11) oraz czynnika Fitzgeralda i wysokocząsteczkowego kinogenu (12). Klinicyści oraz badacze układu krzepnięcia krwi wiedzieli o ich występowaniu w osoczu. Obserwowano bowiem skazy krwotoczne wywołane ich brakiem, które były podobne, lecz niejednakowe z niedoborem czynnika XII (10, 11, 13, 14). Zidentyfikowanie tych czynników przyczy-

niło się do poznania związków między aktywacją krzepnięcia krwi, kininogenezą i fibrynolizą.

Cząsteczka ludzkiej prekallikreiny składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie cząsteczkowej 105 000—127 000 daltonów (15, 16). Pod wpływem enzymów trypsyny i plazminy (17, 18), a co najważniejsze, pod wpływem zaktywowanego czynnika XIIa jak i jego podjednostki 28 000 daltonów (19), prekallikreina ulega aktywacji do kallikreiny. Jako podstawowa kininogenaza w organizmie uwalnia ona kininy z wysokocząsteczkowego kininogenu. W osoczu występują dwa rodzaje kininogenów, różniące się masą cząsteczkową i wrażliwością na działanie osoczowej kallikreiny. Są to wysokocząsteczkowy kininogen (ang. — *HMW kininogen*) o masie cząsteczkowej 197 000, wrażliwy na działanie osoczowej i gruczołowej kallikreiny oraz niskocząsteczkowy kininogen (*LMW kininogen*) o masie 57 000, który reaguje tylko z gruczołową kallikreina (20). Wśród fizjologicznie czynnych produktów działania kallikreiny na wysokocząsteczkowy kininogen występuje 110 aminokwasowy polipeptyd, określany jako fragment-X. Może on zawierać boczny łańcuch cukrowy i wówczas oznaczany jest jako fragment 1, 2 (21, 22). W obu postaciach fragment-X hamuje aktywację czynnika XII najprawdopodobniej współzawodnicząc z nim w wiązaniu się z dostępną aktywną powierzchnią (23). Wiązanie wysokocząsteczkowego kininogenu a także jego fragmentu-X z ujemnie naładowanymi powierzchniami odbywa się poprzez bogato-histydynowy region zlokalizowany w środkowej części łańcucha polipeptydowego rodzimej cząsteczki.

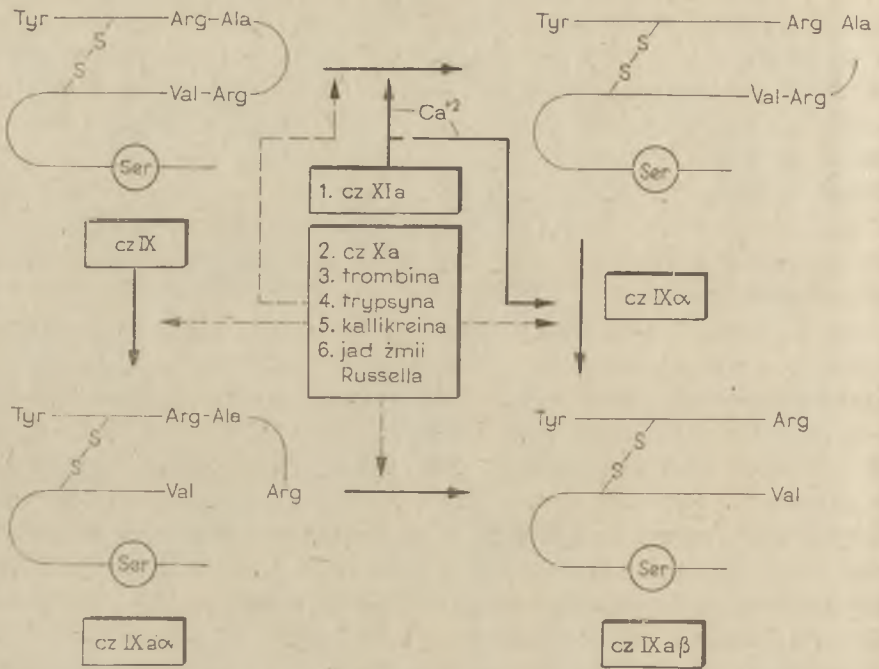
II-1. Reakcje zachodzące na „aktywnej powierzchni”

Nadal trudno wytłumaczyć katalizujący wpływ ujemnie naładowanych powierzchni na powstawanie aktywnego czynnika XIIa. Niektórzy badacze uważają, że cząsteczka czynnika XII kontaktując się z aktywną powierzchnią, ulega przekształceniom konformacyjnym, które prowadzą do odsłonięcia aktywnej reszty serynowej (24, 25). Czynniki XII zaadsorbowane na aktywnej powierzchni nie mają jednak aktywności proteolitycznej ani esterazowej i nie mogą samorzutnie się aktywować (7). Zgodnie z założeniami innej hipotezy, aktywacja kontaktowa czynnika XII przebiega w dwóch etapach (26—28). W pierwszym etapie czynniki XII, podobnie jak prekallikreina, wysokocząsteczkowy kininogen i czynniki XI, adsorbują się na ujemnie naładowanej powierzchni. W drugim, zaadsorbowany czynniki XII na sztywnej powierzchni ulega zmianom konformacyjnym i jego cząsteczka staje się bardziej podatna na proteolizę. Rola kaolinu, celitu i podobnych substancji ograniczałaby się więc tylko do wybiórczego zagęszczenia niektórych czynników krzepnięcia krwi na małej powierzchni i tym sposobem ułatwiałaby ich oddziaływanie (28). W dalszym

ciągu brakuje dowodów, który z czynników wchodzących w skład tzw. pętli kallikreinowej jest aktywowany jako pierwszy, a co za tym idzie, nie znamy mechanizmu inicjującego aktywację czynników wewnątrzpocho- chodnego układu krzepnięcia krwi. W układzie izolowanym kallikreina nie wykazuje pełnej zdolności do aktywacji czynnika XII (13). Wyma- gana do tego jest obecność wysokocząsteczkowego kininogenu (26). Nie- zbędność prekallikreiny dla prawidłowego przebiegu początkowych faz krzepnięcia krwi w warunkach fizjologicznych udokumentowały liczne doświadczenia, w których używano osocze pobrane od pacjentów pozba- wionych czynnika Fletchera (29—31). Wprowadzenie dodatkowych ilości aktywnego czynnika XII tylko częściowo naprawiało własności krzepliwe takiego osocza, podczas gdy dodanie czynnika XIa przywracało normal- ną krzepliwość (29, 30). Można więc sądzić, że kallikreina raczej przy- śpiesza tempo aktywacji czynnika XII, niż inicjuje tę reakcję. Bezpo- średnie pomiary stopnia aktywacji wyizolowanego czynnika XII, po adsorpcji na kaolinie, wykazały brak jakiegokolwiek włączania diizopro- pylofluorofosforanu do cząsteczki (28). Gwałtowny wzrost inkorporacji obserwuje się wówczas, gdy z kaolinem dodatkowo związane są — wyso- kocząsteczkowy kininogen i prekallikreina. Fragment peptydowy o ma- sie cząsteczkowej 28 000, powstający podczas aktywacji czynnika XII, ma tylko niewielką aktywność prokoagulacyjną. Zachowuje jednak w pełni zdolność do katalizowania konwersji prekallikreiny w kallikreinę (6, 32). Wynika z tego, że czynnik XII i prekallikreina mogą aktywować się wza- jemnie, a która z tych reakcji przeważa, pozostaje wciąż sprawą otwartą. Jest to przykład dodatniego sprzężenia zwrotnego, które potęguje inicja- cję procesu krzepnięcia krwi w układzie wewnątrzpocho- chodnym (27, 33). Również rola wysokocząsteczkowego kininogenu nie jest w pełni wyjaś- niona, a wyniki dotychczasowych badań nie są jednoznaczne co do miej- sca działania wysokocząsteczkowego kininogenu w kaskadzie krzepnięcia krwi (34—38). Istnieją dowody na to, że aktywność tego czynnika jest niezbędna już po inicjacji tego procesu, tj., po utworzeniu aktywnego czynnika XIIa i kallikreiny. Zaobserwowano bowiem, że wprowadzenie aktywnego czynnika XIIa i kallikreiny do osocza pacjenta, które nie za- wiera czynnika Fitzgeralda, nie naprawia zaburzenia krzepnięcia krwi (12, 39). Wysokocząsteczkowy kininogen również wydatnie przyspiesza kallikreinową aktywację czynnika XII zaadsorbowanego na kaolinie (35). Może to oznaczać, że wysokocząsteczkowy kininogen bezpośrednio od- działywuje na czynnik XII, powodując odsłonięcie regionów wrażliwych na działanie kallikreiny. Wysokocząsteczkowy kininogen przyspiesza rów- nież aktywację czynnika XI w mieszaninie zawierającej czynniki XI, czynniki XIIa i kaolin. Nie wpływa natomiast zupełnie na przebieg akty- wacji czynnika XI pod wpływem czynnika XII uczynnionego trypsyną (40). Ostatnie badania Griffina i Cochrane (41) wykazują nie- zbędność wysokocząsteczkowego kininogenu do aktywacji czynnika XI

Prekursorowa postać czynnika XI różni się ogólnym planem budowy od pozostałych proenzymów serynowych układu krzepnięcia krwi (42). Jest także glikoproteiną (11⁰% cukrów) a jego cząsteczka ma budowę dimeryczną i składa się z jednakowych podjednostek polipeptydowych połączonych mostkiem dwusiarczkowym. Jej masa cząsteczkowa wynosi 120 000 daltonów. W C-końcowym regionie obu podjednostek usytuowana jest zamaskowana reszta serynowa, która wchodzi w skład centrum enzymatycznego. Hydroliza pojedynczego wiązania peptydowego w obu podjednostkach czynnika XI przez czynnik XIIa odsłania centra i powstały czynnik XIa nabiera aktywności proteolitycznej. Do efektywnej aktywacji czynnika XI przez czynnik XIIa konieczna jest obecność dodatkowego czynnika białkowego (13), którym jak się okazało jest wysokocząsteczkowy kininogen (12). Konwersja czynnika XI w postać aktywną — XIa pod wpływem czynnika XIIa nie wymaga obecności jonów Ca^{+2} . Po aktywacji cząsteczka czynnika XIa zawiera dwa ciężkie i lekkie łańcuchy polipeptydowe związane ze sobą mostkami dwusiarczkowymi. Centrum enzymatyczne znajduje się na łańcuchu lekkim. Cząsteczki czynnego czynnika XIa charakteryzują się aktywnością endopeptydazową w kierunku swojego naturalnego substratu jakim jest czynnik IX oraz aktywnością esterazową. Rozczepiają ester etylowy benzoilo-argininy (BAEE). Czynnik XIa zamienia czynnik IX na formę czynną — IXa, jak to przedstawiono na Rycinie 3, w reakcji dwuetapowej (43).

Czynnik IX jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 55 400 daltonów, a jego cząsteczka jest utworzona z pojedynczego łańcucha zawierającego 416 aminokwasów, których sekwencja została ostatnio opublikowana przez K a t a y a m a i wsp. (44). Zawiera aż 26⁰% cukrów. Badania pierwszorzędowej struktury cząsteczki czynnika IX wykazały jej duże podobieństwo do protrombiny oraz lekkiego łańcucha czynnika X (8). W pierwszym etapie aktywacji czynnika IX obejmuje hydrolizę wiązania peptydowego Arg-Ala i rozpad łańcucha na dwa fragmenty — łańcuch lekki o masie cząsteczkowej 16 600 daltonów oraz ciężki o masie 35 000 daltonów powiązane mostkami dwusiarczkowymi. Ten pośredni produkt aktywacji czynnika IX, tzw. czynnik IX_a, nie ma jeszcze aktywności proteolitycznej. W drugim etapie, po hydrolizie wiązania Arg-Val, zostaje uwolniony glikopeptyd o masie cząsteczkowej 9 000 daltonów (8, 45). Równocześnie pojawia się aktywność enzymatyczna, jako wynik odsłonięcia reaktywnej reszty serynowej, znajdującej się w C-końcowym regionie łańcucha ciężkiego cząsteczki czynnika IX_a (rycina 3). O ile pierwszy etap aktywacji czynnika IX może przebiegać w nieobecności jonów Ca^{+2} , chociaż bardzo powoli, o tyle drugi bezwzględnie wymaga ich obecności. Warto zaznaczyć, że w odróżnieniu od innych czynników zależnych od witaminy K, konwersja czynnika IX w formę aktywną nie wymaga fosfolipidów. Czynnik IX ulega aktywacji również w obecności czynnika Xa, trombiny, tripsyny, kallikreiny i jadu żmii Russella (rycina 3). Inku-



Rycina 3. Przebieg aktywacji czynnika IX przez czynnik XIa, oraz przez czynnik Xa, trombinę, trypsynę, kallikreinę i jad żmii Russella.

Czynnik XIa aktywuje czynnik IX w reakcji dwuetapowej. Jako produkt pośredni powstaje czynnik IXa, a ostatecznym produktem tej reakcji jest czynnik IXa β . Pozostałe enzymy hydrolizują te same wiązania peptydowe w cząsteczce czynnika IX, ale w dowolnej kolejności. Na schemacie cząsteczki jest zaznaczona reszta serynowa wchodząca w skład centrum katalitycznego czynnika IX.

badania wyizolowanych cząsteczek czynnika IX z aktywną formą czynnika Xa oraz fosfolipidami i jonami Ca⁺², prowadzi do jego uczynnienia i pojawienia się aktywnych cząsteczek IXa β (46). Jest to kolejny przykład funkcjonowania mechanizmu potęgującego aktywację czynników krzepnięcia krwi na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego. W pracowni Seegersa (47) badano wpływ działania trombiny na cząsteczki czynnika IX. Okazało się, że trombina odczepia z ich C-końcowego regionu peptyd o masie cząsteczkowej 9 000 daltonów. Pozostałość cząsteczki nazywana czynnikiem IX β , charakteryzuje się aktywnością antykoagulacyjną i może być przekształcana przez czynnik XIa w obecności jonów Ca⁺² do formy IXa, wykazującej także aktywność prokoagulacyjną. Należy tu jednak zaznaczyć, że podobnego efektu nie zaobserwowano w innych badaniach (48). Czynnik IXa cechuje się aktywnością esterazową oraz endopeptydazową wyłącznie w kierunku czynnika X. W układzie izolowanym czynnik IXa tylko w niewielkim stopniu aktywuje cząsteczki czynnika X. Wystarczą jednak minimalne ilości czynnika VIII oraz fosfolipidów i jonów Ca⁺² aby tempo aktywacji wzrosło 20-krotnie (49). Tak więc, w następnym etapie układu wewnątrzpo pochodnego, cząsteczki czynnika IXa od-

działywują z makrocząsteczkami czynnika VIII formując kompleks, który aktywuje czynnik X (50). Reakcja ta przebiega wyłącznie w obecności jonów Ca^{+2} oraz fosfolipidów. Te ostatnie w warunkach fizjologicznych dostarczane są przez płytki krwi, w postaci uwolnionego czynnika płytkowego 3 (PF3) (51, 52).

Niedobór czynnika VIII jest przyczyną jednego z najcięższych zaburzeń krzepnięcia krwi, od wielu wieków znanego pod nazwą hemofilii. Z niedoborem tego czynnika wiąże się również inna skaza krwotoczna określana jako choroba von Willebranda. Oba typy zaburzeń dziedziczą się niezależnie, tzn. hemofilia jako cecha recesywna sprzężona z chromosomem X, natomiast choroba von Willebranda jako autosomalna cecha dominująca. To pozwala sądzić, że mechanizm powstawania obu skaz zasadniczo różni się od siebie. Ostatnie badania budowy i funkcji czynnika VIII potwierdziły te przypuszczenia. Preparaty czynnika VIII charakteryzują się dwiema aktywnościami biologicznymi: a) VIII:C, czyli aktywnością prokoagulacyjną, która wyraża się zdolnością do naprawy krzepnięcia krwi u chorych na hemofilię A (53, 54) oraz b) VIII/WF, tj. zdolnością do korekty czasu krwawienia w chorobie von Willebranda oraz agregacji płytek w obecności ristocetyny (55, 56). Obie aktywności są niezależne od siebie i mogą być selektywnie hamowane przez specyficzne przeciwciała (57, 58). Determinanty antygenowe czynnika VIII reagują zarówno z surowicami heterologicznymi, otrzymanymi po immunizacji królików lub kóz wysokooczyszczonymi preparatami czynnika VIII, jak i z surowicami homologicznymi, które pochodzą od chorych na hemofilię przyjmujących wielokrotnie preparaty tego czynnika. Ze względu na to, że surowice homologiczne hamują specyficznie aktywność prokoagulacyjną czynnika VIII, nazywa się je anty VIII:C. Nie tworzą one immunoprecypitatów, ani nie wiążą dopełniacza, dlatego nie nadają się do badań strukturalnych cząsteczki czynnika VIII (59). Wyizolowane z tych autoprzeciwciał i znakowane jodem fragmenty Fab' pozwalają na specyficzne oznaczenie tej części kompleksu czynnika VIII, która nosi aktywność prokoagulacyjną (60). Wykorzystywane są one do identyfikacji różnych typów zaburzeń krzepnięcia krwi związanych z niedoborem czynnika VIII (59). Przeciwciała heterologiczne rozpoznają z reguły te komponenty czynnika VIII, które biorą udział podczas agregacji płytek w obecności ristocetyny, dlatego określa się je jako anty VIII/WF/VIII R:Ag (61). Jak dotąd niewiele wiemy o budowie cząsteczki czynnika VIII. Badania za pomocą filtracji żelowej z zastosowaniem buforów o wysokiej sile jonowej sugerowały, że aktywność prokoagulacyjna (VIII:C) oraz aktywność czynnika von Willebranda (VIII/WF) są związane z odrębnymi cząsteczkami białkowymi, które pozostają silnie zasocjowane ze sobą (62—65). Według innej hipotezy (66) obie aktywności, VIII:C i VIII/WF, związane są z tą samą podjednostką białkową o masie 195 000

daltonów, a obserwowany ich podział wynika z częściowej degradacji proteolitycznej cząsteczek czynnika VIII. Badania nad wpływem inhibitorów proteaz na własności preparatów czynnika VIII nie wyjaśniły jednoznacznie, która z tych hipotez jest prawdziwa. Trasylol, inhibitor kallikreiny, hamował dysocjację VIII:C i VIII/WF (67), natomiast inne inhibitory, np. sojowy inhibitor trypsyny, epsilon aminokapronowy kwas, heparyna, hirudyna, nie wpływały na tę reakcję (68).

Ludzki czynnik VIII izoluje się najczęściej w postaci wysokocząsteczkowych kompleksów o masie od 600 000 do 20 000 000 daltonów (69, 70). Po redukcji wiązań dwusiarczkowych, niektórzy badacze otrzymywali pojedynczą podjednostkę o masie około 200 000 daltonów (67, 70—72), a inni również podjednostki o niższej masie cząsteczkowej (73—76). Pochodzenie niskocząsteczkowej podjednostki jest wciąż przedmiotem dyskusji. Jedni autorzy uważają, że są to prawdziwe podjednostki czynnika VIII (76—78), a inni, że powstają one w wyniku degradacji proteolitycznej (73—75).

Ostatnio wykazano, że aktywność prokoagulacyjna może być związana nie tylko z wysokocząsteczkowymi formami czynnika VIII ale również z niskocząsteczkową formą o masie 20 000 daltonów (79). W osoczu krwi pobranej na heparynę, wykryto aż 50% aktywności prokoagulacyjnej połączonej z niskocząsteczkową formą czynnika VIII. Co więcej, ta niskocząsteczkowa forma nie była związana z wysokocząsteczkowym komponentem (VIIIIR:Ag), który według Rock i wsp. (80) jest białkiem nośnikowym czynnika VIII:C. Zgodnie z hipotezą Rocka i wsp. (80) kompleks VIII:C-VIIIIR:Ag dysocjuje w obecności jonów Ca^{+2} . Uwolniony VIIIIR:Ag nie posiada aktywności prokoagulacyjnej.

Zgodne z tym są również wyniki analiz immunologicznych, w których stosowano surowice homologiczne (anty VIII:C) oraz heterologiczne (anty VIII/WF, VIII R:Ag). Przy ich pomocy stwierdzono, że podczas zamrażania osocza, do kryoprecypitatu ilościowo przechodziły wysokocząsteczkowe formy VIII/WF, podczas gdy w supernatancie pozostawały tylko niskocząsteczkowe formy czynnika VIII o aktywności prokoagulacyjnej (61).

Aktywność prokoagulacyjną wykazują również podjednostki o masie cząsteczkowej zbliżonej do 200 000, a powstające po dysocjacji kompleksów czynnika VIII w obecności $CaCl_2$ (81).

Istnieją kontrowersje na temat aktywującego działania trombiny na czynnik VIII:C. Uważa się, że małe ilości trombiny aktywują VIII:C, podczas gdy duże ilości tego enzymu oraz wydłużony czas inkubacji czynnika VIII z trombiną, inaktywują VIII:C (82, 83). Ostatnie badania z zastosowaniem trombiny związanej kowalencyjnie z Sepharozą, wykazały, że powoduje ona wyłącznie obniżenie aktywności prokoagulacyjnej czynnika VIII (84).

Badania kinetyczne interakcji czynnika IXa, czynnika VIII, fosfolipidów i jonów Ca^{+2} , wykazały, że aktywność czynnika IXa wzrasta 20-

krotnie już w obecności niewielkich ilości czynnika VIII (49). Wyliczono też, że w normalnym osoczu krwi, 1 mol czynnika XIa, poprzez aktywację kolejnych czynników, prowadzi do wykrzepienia 2×10^8 moli fibrynogenu. W modelowym układzie, w którym aktywność czynnika wynosiła mniej niż 1% normalnie spotykanej i który odpowiada ciężkiej hemofilii, A, ta sama ilość czynnika XIa indukuje wykrzepianie tylko 2.5×10^6 moli fibrynogenu (56). Zacytowany przykład częściowo tłumaczy rolę czynnika VIII w przebiegu krzepnięcia krwi, która polegałaby na potęgowaniu aktywacji czynnika X, a tym samym pośrednio i następnych czynników krzepnięcia krwi z trombiną włącznie.

III. Zewnątrzpochodny układ krzepnięcia krwi

W wielu tkankach wykryto lipoproteiny, które w obecności osoczowego czynnika VII aktywują czynnik X (85). Substancje te po oddysocjowaniu lipidów od ich części białkowej całkowicie tracą aktywność prokoagulacyjną. Część białkowa zbadanych lipoprotein zawiera dwa komponenty o masach cząsteczkowych 220 000 i 300 000 (29). Ich aktywność prokoagulacyjna może być w pełni odtworzona przez rekombinację składników z lipidami (85). Zmieszanie składników białkowych z lipidami syntetycznymi również prowadzi do odtworzenia aktywności (29). Warto tu wspomnieć, że bardzo dużą aktywność prokoagulacyjną czynnika tkankowego wykryto w komórkach endotelialnych ścian naczyń krwionośnych (86, 87). Czynniki tkankowe charakteryzuje się znaczną aktywnością peptydazową, która najprawdopodobniej nie ma nic wspólnego z aktywnością prokoagulacyjną. Krótkie eksponowanie osocza krwi na działanie czynnika tkankowego wywołuje gwałtowną aktywację czynnika X, w której pośredniczy osoczowy czynnik VII.

Czynnik VII, zbudowany z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie cząsteczkowej 45 500 daltonów, należy do białek zależnych od witaminy K (62, 88). Szczególną właściwością wołowego czynnika VII jest to, że występuje on w osoczu z odsłoniętą resztą serynową, wchodzącą w skład centrum enzymatycznego cząsteczki. Daje się ona zablokować diizopropylofluorofosforanem (89). Najprawdopodobniej cząsteczki czynnika VII nie mogą jednak wiązać swojego substratu — czynnika X, tak długo, aż nie skompleksują się z czynnikiem tkankowym (tromboplastyną). Odmiennie zachowuje się ludzki czynnik VII. Jego cząsteczki najpierw muszą skompleksować z czynnikiem tkankowym i jonami Ca^{+2} , a dopiero potem odsłania się ich reszta serynowa, dająca się zablokować diizopropylofluorofosforanem (90). Czynniki VII jest wrażliwy na działanie aktywnej formy czynnika Xa, który w obecności fosfolipidów i jonów Ca^{+2} hydrolizuje w jego cząsteczce dwa wiązania peptydowe (91). W pierwszym etapie, po hydrolizie wiązania peptydowego Arg-Ile, jednołańcu-

chowa cząsteczka czynnika VII przekształca się w dwułańcuchową VIIa α . Oba łańcuchy tej formy są powiązane mostkami dwusiarczkowymi. Konwersji tej towarzyszy przyrost aktywności prokoagulacyjnej co przejawia się tym, że produkt pośredni VIIa α aktywuje przejście czynnika X w formę aktywną Xa. W drugim etapie czynnik Xa odczepia peptyd o masie cząsteczkowej 12 000 daltonów z COOH-końcowego regionu ciężkiego łańcucha czynnika VIIa α . Uwolniony peptyd zawiera centrum katalityczne czynnika VII, dlatego ostateczny produkt tej konwersji, czynnik VII β , pozbawiony jest zupełnie aktywności prokoagulacyjnej (91). W podobny sposób również inne białka enzymatyczne aktywują czynnik VII, np. trombina, podjednostka 28 000 daltonów czynnika XIIa, czynnik IXa, kallikreina oraz plazmina. Tak więc i w tym przypadku działa mechanizm, który na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego potęguje aktywację czynnika X.

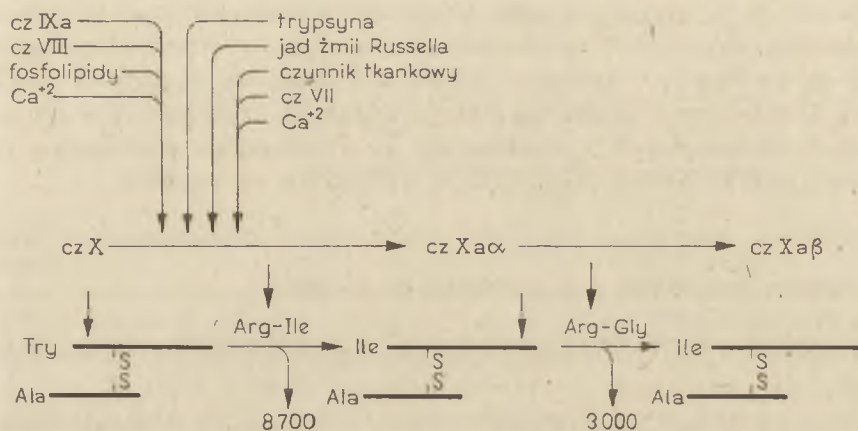
IV. Reakcje wspólne dla obu układów krzepnięcia krwi

IV-1. Aktywacja czynnika X

Ogniwem łączącym oba układy procesu krzepnięcia krwi jest pojawienie się aktywnego czynnika Xa (rycina 4). W obu przypadkach, tj. w układzie wewnątrzpochodnym i zewnątrzpochodnym, mechanizm aktywacji czynnika X jest taki sam i obejmuje hydrolizę dwóch wiązań peptydowych. W podobny sposób cząsteczkę tego czynnika aktywuje tripsyna i enzymy znajdujące się w jadzie żmii Russella (92—94).

Cząsteczka czynnika X o masie 58 000 daltonów składa się z dwóch podjednostek peptydowych, związanych mostkami dwusiarczkowymi. Cięższy z nich, o masie 35 000 daltonów zawiera cukry, a lżejszy ma masę cząsteczkową 17 000 daltonów (92). Cząsteczki czynnika X występują w dwóch odmianach, oznaczonych jako X₁ i X₂, które różnią się ładunkiem elektrostatycznym (95, 96). Bardziej kwaśny charakter cząsteczek czynnika X₂ spowodowany jest tym, iż zawierają one większe ilości reszt γ -kARBOKSY glutamylowych. Podobnie jak w cząsteczkach innych czynników zależnych od witaminy K, reszty te wiążą jony Ca⁺². W czynniku X zlokalizowane one są w łańcuchu lekkim (96). Struktura pierwszorzędowa obu podjednostek peptydowych czynnika X wykazuje duże podobieństwo do sekwencji spotykanych w NH₂-końcowym regionie cząsteczek czynników IX, VII i trombiny (97, 98). Sekwencja aminokwasowa cięższej podjednostki jest bardzo zbliżona do sekwencji chymotrypsyny. W pierwszym etapie aktywacji czynnika X w łańcuchu ciężkim ulega rozbięciu wiązanie peptydowe Arg₅₁-Ile₅₂ (Rycina 4). Uwalnia się glikopeptyd, który zawiera prawie wszystkie cukry rodzimej cząsteczki (99, 100). Powstały produkt, czynnik Xa α , o masie cząsteczkowej około 45 000

daltonów jest proteazą serynową i wykazuje aktywność prokoagulacyjną. Po dłuższej inkubacji w obecności fosfolipidów i jonów Ca^{+2} traci on drugi peptyd składający się z 17 aminokwasów, w wyniku hydrolizy wiązania peptydowego $\text{Arg}_{290}\text{-Gly}_{291}$ w łańcuchu ciężkim (101). Końcowy produkt tej konwersji, $\text{Xa}\beta$, ma taką samą aktywność prokoagulacyjną jak forma $\text{Xa}\alpha$. Zasadniczą funkcją fizjologiczną cząsteczek czynnika Xa jest katalizowanie przejścia protrombiny w trombinę. W normalnych warunkach proces ten wymaga obecności czynnika V, fosfolipidów oraz jonów Ca^{+2} .



Rycina 4. Przebieg aktywacji czynnika X w układzie wewnątrzpochodnym (cz IXa, cz VIII, fosfolipidy i jony Ca^{+2}), zewnątrzpochodnym (czynnik tkankowy, cz VII i jony Ca^{+2}) oraz przez trypsynę i jad żmii Russella.

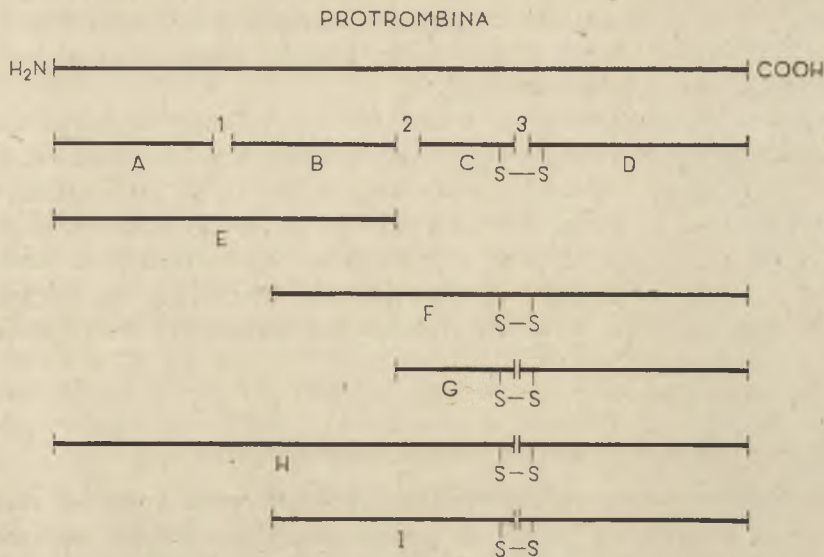
Czynnik V, który jest bardzo wrażliwy na działanie enzymów proteolitycznych, wyizolowany został w kilku pracowniach (102—108). Opisane preparaty zawierały różne podjednostki peptydowe. Rozbieżności w składzie peptydowym preparatów czynnika V spowodowane są różnym stopniem degradacji ich cząsteczek (105). W związku z tym w dalszym ciągu pozostaje nie wyjaśniona budowa cząsteczki czynnika V. Ostatnio z osocza ludzkiego wyizolowano i częściowo scharakteryzowano jednołańcuchową formę czynnika V o masie cząsteczkowej 296 000 (107). Wyjściowa aktywność właściwa opisanych preparatów równała się 14,5 jednostek/mg, a po inkubacji z trombiną wzrastała 8-krotnie. Znacznie wrażliwsza na działanie trombiny okazała się być jednołańcuchowa forma wołowego czynnika V, o masie cząsteczkowej 330 000 daltonów (108). W tym przypadku preparaty czynnika V o wyjściowej aktywności właściwej 15,6 jednostki/mg, po inkubacji z trombiną wykazywały aktywność 80-krotnie wyższą. Istnieją również dane, które popierają wielołańcuchową strukturę czynnika V (102). Zgodnie z nimi rodzima cząsteczka czynnika V ma masę 1 200 000 daltonów i składa się z dwóch identycznych monomerów, po-

wiązanych ze sobą niekowalencyjnie. Każdy monomer zawiera łańcuch ciężki o masie 290 000 daltonów oraz dwa łańcuchy lekkie, każdy o masie 200 000 daltonów. Podczas aktywacji trombiną wzrasta 14-krotnie aktywność właściwa, a towarzyszy temu odziespienie z obu łańcuchów ciężkich fragmentu peptydowego o masie 110 000 daltonów.

Czynnik V reguluje konwersję protrombiny w trombinę, sam nie zmienia swojej struktury podczas tej reakcji. Jego cząsteczki wiążą się swoimi hydrofobowymi obszarami z fosfolipidami, z którymi również zasocjowane są cząsteczki czynnika Xa i protrombiny. Te ostatnie oddziałują z micellami fosfolipidowymi za pośrednictwem jonów Ca^{+2} , które skompleksowane są z ugrupowaniami γ -karboksylglutamyłowymi. Uważa się, że cząsteczki czynnika V przez skompleksowanie z protrombiną utrzymują ją w konfiguracji najdogodniejszej dla działania cząsteczek czynnika Xa. Ostateczny produkt tej reakcji, trombina, traci powinowactwo do micelli fosfolipidowych i uwalnia się do otaczającego środowiska jako aktywny enzym, zdolny przekształcać fibrynogen we włóknik.

IV-2. Budowa protrombiny i jej konwersja do trombiny.

Protrombina, glikoproteina, o masie cząsteczkowej 70 000 daltonów, jest najlepiej poznanym czynnikiem krzepnięcia krwi (109). W jednołańcuchowej cząsteczce protrombiny można wyróżnić kilka charakterystycznych regionów (Rycina 5). Cały NH_2 -końcowy region, który tworzy tak zwany fragment 1, uwalniany jest z rodzimej cząsteczki protrombiny przez trombinę po hydrolizie wiązania peptydowego Arg_{156} - Ser_{157} . Zawiera on w pozycjach 7, 8, 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30 i 31 reszty kwasu glutaminowego, które zmodyfikowane są przyłączeniem dodatkowej grupy karboksylowej w położeniu γ . We fragmencie 1 znajdują się też dwa łańcuchy cukrowe powiązane z resztami asparaginy w pozycjach 77 i 101. Drugi odrębny region, tak zwany fragment 2, który obejmuje reszty aminokwasowe od Ser_{157} do Arg_{274} , uwalniany jest z cząsteczki protrombiny w pierwszym stadium aktywacji przez czynnik Xa. Wówczas to następuje hydroliza wiązania peptydowego Arg_{274} - Thr_{275} i odziespiena zostaje NH_2 -końcowa część cząsteczki, nazywana fragmentem 1,2. Warto tu wspomnieć, że liczne mostki dwusiarczkowe protrombiny tworzą wiele wewnątrzłańcuchowych pętli. Właśnie we fragmentach 1 i 2 występują podwójne pętle, bardzo zbliżone do siebie kształtem, przypominającym obwarzanki. Struktury te określane są jako „kringle” (109). W drugim stadium aktywacji protrombiny, czynnik Xa rozszczepia drugie wiązanie peptydowe Arg_{323} - Ile_{324} w produkcie pośrednim, określanym jako pretrombina 2. Dopiero na tym etapie powstaje aktywna cząsteczka trombiny zbudowana z dwóch łańcuchów peptydowych A i B, powiązanych mostkiem dwusiarczkowym Cys_{296} - Cys_{442} . Łańcuch B, znacznie dłuższy, zawiera trzy wewnątrzłańcu-



Rycina 5. Rozmieszczenie i pochodzenie określonych fragmentów cząsteczki protrombiny.

Cyframi 1, 2 i 3 oznaczone są wiązania peptydowe rozszczepiane podczas aktywacji protrombiny. Kolejno opisane są: A) fragment 1 protrombiny, B) fragment 2 protrombiny, C) łańcuch A trombiny, D) łańcuch B trombiny, E) fragment 1,2 protrombiny, F) pretrombina 1, G) pretrombina 2, H) mezotrombina, I) mezotrombina pozbawiona fragmentu 1.

chowe mostki dwusiarczkowe (Cys₃₅₁-Cys₃₆₇, Cys₄₉₆-Cys₅₁₀, Cys₅₂₄-Cys₅₅₄) i łańcuch cukrowy przyłączony do reszty Asn₃₇₆ a co najważniejsze, centrum katalityczne składające się z His₃₆₆, Asp₄₂₂ i Ser₅₂₈. Warto podkreślić, że oba regiony zawierające struktury „kringle” charakteryzują się dużym podobieństwem w sekwencji aminokwasowej. Żadne z pozostałych białek zależnych od witaminy K, nie wykazuje podobnych struktur.

Jak wynika z przytoczonych danych aktywacja protrombiny do trombiny może przebiegać w dwojaki sposób. W pierwszym przypadku jak podano wyżej, pod wpływem czynnika Xa zostaje rozbite wiązanie peptydowe Arg₂₇₄-Thr₂₇₅ i cząsteczka protrombiny rozpada się na dwie części, określane jako fragment 1,2 i pretrombina 2. Ta ostatnia stanowi w dalszym ciągu substrat dla czynnika Xa i pozostaje zasocjowana tak długo z fragmentem 1,2 aż nie zostanie zhydrolizowane kolejne wiązanie peptydowe Arg₃₂₃-Ile₃₂₄ (110). Ten szlak konwersji protrombiny w trombinę można wykazać *in vitro* tylko po zastosowaniu inhibitora specyficznego dla działania trombiny. Jeśli jednak utworzona trombina nie zostanie unieczynniona, zapoczątkowuje ona alternatywny szlak konwersji protrombiny. Polega on na rozbiciu w pierwszej kolejności wiązania peptydowego Arg₁₅₆-Ser₁₅₇ w cząsteczce protrombiny przez trombinę. Jako produkty powstają wówczas pretrombina 1 oraz uwolniony zostaje fragment 1. Pretrombina 1, ze względu na brak miejsc wiążących jony Ca⁺² a pośrednio i fosfolipidy oraz czynnik V, jest bardzo słabym substratem

dla aktywnego czynnika Xa. Fragment 1 odczepiany pod wpływem trombiny z fragmentu 1,2 lub protrombiny, hamuje kompetycyjnie konwersję protrombiny w trombinę (109).

Łańcuch polipeptydowy B trombiny ma budowę pierwszorzędową bardzo podobną do proteaz serynowych występujących w trzustce. Różni się od nich ilością wewnątrzłańcuchowych mostków dwusiarczkowych oraz zawartością bocznego łańcucha cukrowego. Drugi składnik cząsteczki, łańcuch A, nie ma swojego odpowiednika w znanych proteazach serynowych. Jest on najprawdopodobniej odpowiedzialny za wyjątkową specyficzność działania trombiny podczas przekształcania fibrynogeny we włóknik.

IV-3. Rola trombiny w końcowych etapach krzepnięcia krwi

Działanie trombiny na fibrynogen zapoczątkowuje końcowe stadium krzepnięcia krwi, które polega na polimeryzacji powstałych monomerów włóknika oraz stabilizacji żelu włóknika rozpuszczalnego. Budowa fibrynogeny i monomerów włóknika oraz specyficzne działanie trombiny na fibrynogen są opisane w ostatnich naszych artykułach przeglądowych (111—113). Jak wynika z nich, w końcowych etapach procesu krzepnięcia krwi, trombina aktywuje czynnik XIII, który odpowiedzialny jest za wytworzenie włóknika stabilizowanego. Cząsteczka czynnika XIII, zwanego czynnikiem stabilizującym włóknik (FSF), jest tetramerem i składa się z dwóch rodzajów podjednostek peptydowych (114).

Podjednostka A, o masie cząsteczkowej 88 000 daltonów, na której umieszczone jest centrum katalityczne, wyróżnia się zawartością 7 wolnych grup sulfhydrylowych. Podjednostka B, o masie 78 000 daltonów, charakteryzuje się występowaniem 16—17 wewnątrzłańcuchowych mostków dwusiarczkowych. Podczas aktywacji trombinowej, z podjednostki A czynnika XIII, po hydrolizie wiązania Agry-Gly uwalnia się 36—aminokwasowy peptyd. Reakcja proteolityczna nie wymaga obecności jonów Ca^{+2} (115). Są one natomiast niezbędne do przekształcenia tak zmodyfikowanych cząsteczek czynnika XIII w formę aktywną XIIIa. Również cząsteczki czynnika X są zdolne aktywować czynnik XIII (116). W tym przypadku cała reakcja przebiega wyłącznie w obecności jonów Ca^{+2} . Niezależnie od trombiny i czynnika Xa, cząsteczki czynnika XIII aktywują się pod wpływem wyższych stężeń jonów Ca^{+2} , tj. powyżej 50 mmoli (117). Cząsteczki czynnika XIIIa mają w centrum enzymatycznym resztę Cys i charakteryzują się aktywnością transglutaminazową. Wprowadzają poprzeczne wiązania izopeptydowe ϵ -(γ -glutamyl)-lizynowe łączące łańcuchy γ sąsiadujących monomerów włóknika w dimery γ - γ oraz łańcuchy α w polimery (α)_n. Tak otrzymany włóknik nie rozpuszcza się praktycznie w żadnym ze stosowanych powszechnie rozpuszczalników i jest trudniej katabolizowany przez plazminę.

IV-4. Znaczenie witaminy K

Witamina K bierze czynny udział w reakcji karboksylacji nowo syntetyzowanych cząsteczek czynników II, VII, IX oraz X (118, 119). Reakcja ta nie zależy od obecności biotyny ani ATP, wymaga natomiast występowania cząsteczek witaminy K w postaci zredukowanej, obecności atmosferycznego CO_2 oraz karboksylazy membranowej (120—122). Rola witaminy K najprawdopodobniej polega na ułatwianiu transportu atmosferycznego CO_2 z zewnątrz membrany do reszt kwasu glutaminowego, wchodzących w skład cząsteczek czynników krzepnięcia krwi zaadsorbowanych na membranie komórkowej. W efekcie powstają reszty kwasu glutaminowego dodatkowo karboksylowane w pozycji γ , które w czynnikach zależnych od witaminy K mają duże powinowactwo do jonów Ca^{+2} (123). Są one zgrupowane w NH_2 -końcowym regionie cząsteczek czynników — II, VII, i IX, a w przypadku czynnika X, w NH_2 -końcowym regionie jego łańcucha lekkiego (109, 124). Podawanie analogów strukturalnych tej witaminy, np. dwukumarolu, nie wpływa na ogólny plan budowy produkowanych czynników krzepnięcia. Ze względu na brak miejsc akceptorowych dla jonów Ca^{+2} , nie mogą one jednak kompleksować z micellami fosfolipidowymi i bardzo wolno przechodzą w formy enzymatycznie aktywne (125).

V. Regulacja procesu krzepnięcia krwi

Niekontrolowana aktywacja protrombiny, np. w pobliżu uszkodzenia naczyń krwionośnych, teoretycznie mogłaby doprowadzić do wykrzepienia całej objętości krwi. W 15 ml krwi znajdują się bowiem wystarczająco duże ilości tego proenzymu, aby powstała trombina mogła wykrzepić w ciągu 15 sekund 2,5 litra krwi (126). Istnieje jednak kilka systemów, które zabezpieczają przed taką ewentualnością. Działają one na różnych etapach procesu krzepnięcia krwi i powodują, np. ograniczenie aktywacji poszczególnych czynników, ich usuwanie z krwi czy też rozpuszczanie już powstałych skrzepów.

Wykazano, że zaktywowane cząsteczki większości czynników krzepnięcia krwi są nieporównanie szybciej metabolizowane niż ich formy prekursorowe (124). W ten sposób bardzo szybko usuwane są z krążenia między innymi czynniki: XIa, IXa, Xa jak również czynnik tkankowy (126, 127).

Ponadto krew zawiera duże ilości inhibitorów: α_2 -makroglobulina, α_2 -antyplazmina, α_1 -antytrombina III, inhibitor C₁ esterazy, które hamują aktywność czynników XIIa, XIa, IXa, VIIa i IIa (126). Inne czynniki, np. V i VIII, są inaktywowane przez trombinę i plazminę (128). Z wymienionych inhibitorów czołową rolę w regulacji poszczegól-

nych etapów krzepnięcia krwi odgrywa antytrombina III, która jest nie tylko podstawowym inhibitorem trombiny, ale również hamuje pozostałe proteazy serynowe tego systemu, np. czynniki Xa, IXa i XIa oraz plazminę (129). Stężenie antytrombiny III w osoczu krwi wynosi około 5 μ moli i przewyższa prawie dwukrotnie zawartość wszystkich prekursorowych form proteaz serynowych układu krzepnięcia krwi (130). Aktywność inhibitorowa antytrombiny III gwałtownie wzrasta w obecności heparyny (131). Antytrombina III, glikoproteina o masie cząsteczkowej 65 000 daltonów (132), tworzy kompleks stechiometryczny 1:1 z trombiną i w takim połączeniu enzym traci całkowicie swoją aktywność proteolityczną i esterażową (133). Rola heparyny polega na przyspieszeniu powstawania tego kompleksu. Cząsteczka heparyny o masie zbliżonej do 6000 daltonów, ułatwia inaktywację kilku cząsteczek trombiny (134). Ze względu na duże znaczenie heparyny w hamowaniu trombiny i innych czynników przez antytrombinę III, warto wspomnieć o antyheparynowym działaniu czynnika płytkowego 4, który uwalniany jest z pobudzonych płytek krwi. Czynniki płytkowy 4 jest polipeptydem zbudowanym z 70 aminokwasów i charakteryzuje się bardzo dużym powinowactwem do heparyny (135—138). Wiąże ją przez swoje reszty lizynowe, zgrupowane w C-końcowym regionie jego cząsteczki. Osłabia w ten sposób hamujące działanie antytrombiny III i przedłuża koagulujące działanie trombiny jak i innych proteaz serynowych.

W uzupełnieniu do hamującego działania wymienionych cząsteczek, szybki przepływ krwi powoduje dodatkowo rozcieńczenie czynników krzepnięcia krwi i ogranicza w ten sposób rozmiary powstających skrzepów.

System fibrynolityczny, poprzez rozpuszczanie powstających czopów hemostatycznych, również wpływa regulująco na przebieg krzepnięcia krwi. Te same reakcje, które zapoczątkowują aktywację czynników krzepnięcia krwi i pojawienie trombiny, katalizują przejście plazminogenu w plazminę (rycina 1). Plazminogen aktywowany jest przez wiele najróżnorodniejszych związków, ogólnie nazywanych aktywatorami plazminogenu (139). Występują one w osoczu, moczu i w komórkach większości tkanek. Osoczowy aktywator najprawdopodobniej występuje w formie nieczynnej. Aktywuje się pod wpływem czynnika XIIa. Głównym źródłem osoczowego aktywatora są komórki endotelialne ścian naczyń krwionośnych (140). Powstała plazmina inaktywuje czynnik — V, i VIII i hamuje w ten sposób kolejne etapy krzepnięcia krwi (141). Plazmina hydroлізуje cząsteczki fibrynogenu i włóknika, uwalniając szereg produktów pośrednich, które ponownie mogą ograniczać powstawanie włóknika, hamując kompetycyjnie działanie trombiny na fibrynogen, jak również polimeryzację monomerów włóknika (142—144).

PISMIENICTWO

1. Davie E. W., Fujikawa K., Kurachi K., Kisiel W., (1979), *Advances in Enzymology*, **48**, 277—318.
2. Lister J., (1863), *Proc. R. Soc. London*, **12**, 580—611.
3. Ratnoff C. D., Colopy J. E., (1955), *J. Clin. Invest.*, **34**, 602—613.
4. Kleniewski J., (1978), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **32**, 15—34.
5. Ratajczak T., Szewczyk Z., (1978), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **32**, 291—309.
6. Revak S. D., Cochrane C. G., Johnston A. R., Hugli T. E., (1974), *J. Clin. Invest.*, **54**, 619—627.
7. Clayes H., Collen D., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **87**, 69—74.
8. Fujikawa K., Walsh K. A., Davie F. W., (1977), *Biochemistry*, **16**, 2270—2278.
9. Ratnoff O. D., Saito H., (1955), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **148**, 177—182.
10. Hathaway W. E., Belhasen L. P., Hathaway H. S., (1965), *Blood*, **26**, 521—532.
11. Wuepper K. D., (1973), *J. Exp. Med.*, **138**, 1345—1355.
12. Saito H., Ratnoff O. D., Waldmann R., Abraham J. P., (1975), *J. Clin. Invest.*, **55**, 1082—1089.
13. Schiffman S. Lee P., (1974), *Brit. J. Haematol.*, **27**, 101—114.
14. Waldmann R., Abraham J. P., Rebuck J. W., Caldwell J., Saito H., Ratnoff O. D., (1975), *Lancet*, **1**, 949—951.
15. Wuepper K. D., Cochrane C. G., (1972), *J. Exp. Med.*, **135**, 1—20.
16. Kaplan A. P., Austen K. F., (1972), *J. Exp. Med.*, **136**, 1378—1393.
17. Verle E., Forele M. N., Maier L., (1955), *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **225**, 369—380.
18. Fogt W., (1964), *J. Physiol.*, **170**, 153—166.
19. Bagdasarian A., Talamo R. C., Colman R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3456—3463.
20. Jacobson S., (1966), *Nature*, **250**, 98—99.
21. Han Y. N., Kato H., Iwanaga S., (1978), *J. Biochem.*, **83**, 213—221.
22. Han Y. N., Kato H., Iwanaga S., (1978), *J. Biochem.*, **83**, 223—235.
23. Iwanaga S., Komiya H., Han Y. N., Suzuku T., Ohishi S., Katori H., (1975), *Life Sci.*, **16**, 792—793.
24. Nossel H. L., Wilner G. D., LeRoy E. C., (1969), *Nature*, **221**, 75—76.
25. Cochrane C. G., Revak S. D., Wuepper K. D., (1973), *J. Exp. Med.*, **138**, 1564—1563.
26. Griffin J. H., (1977), *Thrombos. Haemost.*, **38**, 117.
27. Griffin J. H., (1977), *Thromb. Haemost.*, **38**, 50.
28. Griffin J. H., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1998—2002.
29. Weiss A. S., Gallin J. I., Kaplan A. P., (1974), *J. Clin. Invest.*, **53**, 622—633.
30. Saito H., Ratnoff O. D., Donaldson V. H., (1974), *Circ. Res.*, **34**, 641—651.
31. Ratnoff O. D., Saito H., (1977), *Thromb. Haemost.*, **38**, 12.
32. Kaplan A. P., Austen K. F., (1971), *J. Exp. Med.*, **133**, 696—712.
33. Kaplan A. P., Mandle R., Yecies L. D., Meier H. L., (1977), *Thromb. Haemost.*, **38**, 60.
34. Colman R. W., Bagdasarian A., Talamo R. C., Scott C. F., Seavey M., Quimaraes J. A., Pierces J. V., Kaplan A. P., (1975), *J. Clin. Invest.*, **56**, 1650—1662.
35. Chan J. Y. C., Habal F. M., Burrowes C. E., Movat H. Z., (1976), *Thromb. Res.*, **9**, 423—433.

36. Matheson R. T., Miller D. R., Lacombe M. J., Han Y. N., Iwanaga S., Kato H., Wuepper K. D., (1976), *J. Clin. Invest.*, **58**, 1395—1406.
37. Thompson R. E., Mandle R. J., Kaplan A. P., (1977), *Thromb. Haemost.*, **38**, 13.
38. Ratnoff O. D., w Haemostasis: Biochemistry, Physiology and Pathology, red. Ogston D., Bennet B., str. 45—70, Wiler Chichester, N.Y.
39. Doladson V. H., Glueck H. I., Miller H. A., Movat F., (1976), *J. Lab. Clin. Med.*, **87**, 327—337.
40. Schiffman S., Pecci H., Lee P., (1977), *Thromb. Res.*, **10**, 319—323.
41. Griffin J. H., Cochrane C. G., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2554—2558.
42. Davie E. W., (1977), Abstract 11th FEBS Meeting, Kopenhaga.
43. Kato H., Fujikawa K., Legaz M. E., (1974), *Fed. Proc.*, **33**, 1505.
44. Katayama K., Ericsson L. H., Enfield D. L., Walsh N. H., Davie E. W., Titani K., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4990—4994.
45. Byrne R., Castellino F. J., (1978), *Arch. Biochem. Biophys* **190**, 687—692.
46. Kalousek F., Konigsberg W., Nemerson Y., (1975), *FEBS Lett.*, **50**, 382—385.
47. Marlar R. A., Seegers W. H., (1979), *Thromb. Res.*, **14**, 95—105.
48. Lindquist P., Fujikawa K., Davie E. W., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1902—1909.
49. Elodi S., Varadi K., (1979), *Thromb. Res.*, **15**, 617—629.
50. Chuang T. F., Sargeant R. B., Hougie C., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **273**, 287—291.
51. Hardisty R. M., Hutton R. A., (1966), *Brit. J. Haematol.*, **12**, 274—278.
52. Sandberg H., Andersson L. O., (1976), *Thromb. Haemost.*, **35**, 178—185.
53. Landell R. D., Wagner R. R., Brinkhous K. M., (1953), *Lab. Clin. Res.*, **41**, 637—648.
54. Gralnick H. R., Coller B. S., (1976), *Lancet*, **1**, 837—838.
55. Weiss H. J., Rogers J., Brand H., (1973), *P. Clin. Invest.*, **52**, 2697—2707.
56. Coller B. S., Gralnick H. R., (1977), *J. Clin. Invest.*, **60**, 302—312.
57. Ekert E., Chavin S., (1977), *Brit. J. Haematol.*, **36**, 271—280.
58. Hougie C., Sargeant R. B., Brown J. E., Baugh R. F., (1975), *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, **147**, 58—61.
59. Shapiro S. S., Hultin M., (1975), *Semin. Thromb. Haemost.*, **1**, 336—385.
60. Lazarchick J., Hoyer L. W., (1978), *J. Clin. Invest.*, **62**, 1048—1052.
61. Meyer D., McKee P. A., Hoyer T. S., Zimmerman T. S., Gralnick H., (1978), *Thromb. Haemost.*, **40**, 245—251.
62. Kisiel W., Davie E. W., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4929—4934.
63. Owen W. G., Wagner R. H., (1972), *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **27**, 502—521.
64. Bloom A. L., Peake L. H., Giddings J. C., (1973), *Thromb. Res.*, **3**, 389—391.
65. Cooper H. A., Wagner R., (1974), *J. Clin. Invest.*, **54**, 1093—1099.
66. Switzer M. A., McKee P. A., (1976), *J. Clin. Invest.*, **57**, 925—931.
67. Beck E. A., Bachman P., Barbier P., Furlan A., (1976), *Thromb. Haemost.*, **35**, 186—197.
68. Susman I. I., Weiss H. J., Rosner N., (1976), *Am. J. Physiol.*, **230**, 434—441.

69. Zimmermann T. S., Roberst J., Edgington T. S., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5121.
70. Beck E. A., Tranqui-Pouit L., Chapel A., Perest B. A., Furlan M., Hudry-Cleorgeon G., Suscillon M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 155—163.
71. Perest B. A., Furlan M., Beck E. A., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 164—174.
72. Gromon J. J., Ekert H., (1978), *Thromb. Res.*, **12**, 341—352.
73. Sultan Y., Naisonnouve P., Angels E., (1979), *Thromb. Res.*, **5**, 415—425.
74. Schapiro G. A., Anderson J. C., Pizzo W., McKee P. A., (1973), *J. Clin. Invest.*, **52**, 2198—2210.
75. Legaz N. Z., Weinstein K. J., Hildebrand C. H., Davie E. W., (1975), *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA*, **240**, 43—61.
76. Annanthakrishman R., D'Souza S., (1978), *Human Genet.*, **40**, 185—191.
77. Tuddenham E. G. D., Trabold N. C., Collins J. A., Hoyer L. W., (1979), *J. Lab. Clin. Med.*, **93**, 40—53.
78. Weiss H. J., Hoyer L. W., (1973), *Science*, **182**, 1149—1151.
79. Rode G. A., Palmer D. S., Tackeberry E. S., Gruickshank W. H., (1978), *Thromb. Res.*, **13**, 85—92.
80. Rock G. H., Tackeberry E. S., Palmer D. S., (1979), *Thromb. Res.*, **14**, 573—587.
81. Weiss H. J., Kochwa S., (1970), *Brit. J. Haematol.*, **18**, 89—97.
82. McKee P. A., Andersen J. C., Switzer M. E., (1975), *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA*, **240**, 8—21.
83. Vehar G. A., Davie F. W., (1977), *Nature*, **252**, 404—405.
84. Vukovitch Th., Koller E., Doleschal W., (1978), *Thromb. Haemost.*, **39**, 600—606.
85. Studer A., (1946), Contribution a l'étude de la thrombokinas, str. 229—237, (1st Jubilee Volume dedicated to Emile Christopher Bonnett), The Roche Company, Basel.
86. Davies J. A., McNicol G. P., (1978), *Brit. Med. Bull.*, **34**, 113—131.
87. Zeldis S. M., Nemerson Y., Pitlick P. A., Lentz T. I., (1972), *Science*, **175**, 766—768.
88. Radcliffe R., Nemerson Y., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 388—396.
89. Zur M., Nemerson Y., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2203—2209.
90. Wijngaards G., Immerzeel J., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 658—664.
91. Radcliffe R., Nemerson Y., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4797—4802.
92. Fujikawa K., Legaz M. E., Davie E. W., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4882—4891.
93. Lindhout M. J., Kop-Klassen B. H. M., Hemker H. C., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **533**, 327—341.
94. Radcliffe R. D., Barton P. G., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6788—6795.
95. Bajaj S. P., Mann K. G., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7729—7741.
96. Neal G. C., Powse C. V., Esnouf M. P., (1976), *FEBS lett.*, **66**, 257—260.
97. Titani K., Fujikawa K., Enfield D. L., Ericsson L. H., Walsh K. A., Neurath H., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3082—3086.
98. Enfield D. L., Ericsson L. B., Walsh K. A., Titani K., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 16—19.
99. Jesty J., Spencer A. K., Nemerson Y., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5614—5622.

100. Jesty J., Spencer A. K., Nakashima Y., Nemerson Y., Konigsberg W., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4497—4504.
101. Fujikawa K., Titani K., Davie E. W., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3359—3363.
102. Saraswathi S., Hawala R., Colman R. W., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1024—1029.
103. Barton P. G., Hanahan D. J., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 506—518.
104. Esnouf C. T., Jolein P., (1976), *Biochem. J.*, **102**, 660—665.
105. Day W. C., Barton P. G., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **261**, 457—468.
106. Kandall C. J., Rosenberg R., Colman R. W., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **58**, 203—211.
107. Bolhuis P. A., Halvoort T. B. N., Breederwelt K., Mochtar L. A., Tencate I. W., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 23—30.
108. Nesheim M. E., Myrmel K. H., Hibbard L., Mann K. G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 508—517.
109. Magnusson S., Peterson T. E., Sottrup-Jensen L., Clayes H., (1975), w: Proteases and biological control, red. Reich E., Rifkin D. B., Show E., t. 1, str. 123—149, Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
110. Esmon C. T., Jackson C. N., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7791—7797.
111. Cierniewski C., Krajewski T., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 193—211.
112. Krajewski T., Cierniewski C., (1976), *Acta Univer. Lodz.*, **19**, 333—364.
113. Cierniewski C., (1978), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **32**, 633—653.
114. Schwartz M. Z., Pizzo S. W., Hill R. L., McKee P. A., (1973), *J. Clin. Invest.*, **52**, 2198—2210.
115. Chunk S. I., Lewis M. S., Falk J. R., (1974), *J. Biol. Chem.*, **246**, 940—950.
116. McDonagh J., McDonagh R. P., (1975), *Brit. J. Haemastol.*, **30**, 465—477.
117. Credo R. B., Curtis C. G., Lorand L., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4234—4237.
118. Sadowski J. A., Esmon C. T., Suttie J. W., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2770—2776.
119. Houser R. H., Jones J. P., Fausto A., Gardner E. J., Lee F., Olson R. E., (1976), *Fed. Proc.*, **35**, 1353.
120. Olson R. E., Jones F. P., Gardner E. J., Houser R. M., Kobylka D., (1976), Proc of 10th International Congress on Biochemistry, Hamburg.
121. Houser R. M., Carey D. J., Duc K. M., Marshall G. R., Olson R. E., (1977), *FEBS Lett.*, **75**, 226—230.
122. Jones J. P., Gardner E. J., Cooper T. G., Olson R. E., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7738—7742.
123. Sperling R., Furie B. C., Blumensteins N., Keyt B., Furie B., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3898—3906.
124. Bucher D., Nebelin E., Thomsen J., Stenflo J., (1976), *FEBS Lett.*, **68**, 293—296.
125. Stenflo J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6325—6332.
126. Deykin D., (1973), w: Hematology, red. Beck. W.S., str. 385—403, The M.T. Press, Cambridge, MA.
127. Neksestuen G. L., Suttie J. W., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **45**, 198—203.
128. Davie E. W., Kirby E. P., (1973), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **7**, 51—86.
129. Borrowcliffe T. W., Johnson H. A., Thomas D., (1973), *Brit. Med. Bull.*, **34**, 143—150.

130. Jesty J., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**, 165—179.
131. Risenberg R. D., Damus P. S., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6490—6505.
132. Miller-Andersson M., Borg B., Andersson L. C., (1974), *Thromb. Res.*, **5**, 439—452.
133. Abilgaard U., (1969), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **24**, 23—28.
134. Machowich R., Aranyi P., (1978), *Biochem. J.*, **173**, 869—875.
135. Walz D. A., Wu V. Y., Delano R., Dene H., McCoy L. E., (1977), *Thromb. Res.*, **10**, 893—898.
136. Denel D. F., Keim P. S., Farmer H., Heinrikson R. L., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2256—2262.
137. Hermodsen M., Kurachi K., Schmur G., (1978), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6276—6279.
138. Morgan F. J., Begg F. S., Chosterman C. M., (1977), *Thromb. Haemost.*, **38**, 231—245.
139. Astrup T., (1966), *Fed. Proc.*, **25**, 42—51.
140. Loskutoff D. J., Edgington T. S., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3903—3907.
141. Ogston D., Bennett B., (1978), *Brit. Med. Bull.*, **34**, 107—112.
142. Niewiarowski S., Kowalski E., (1958), *Revue d'Hematologie*, **13**, 320—331.
143. Latałło Z. S., Budzyński A. Z., Lipiński B., (1964), *Nature*, **203**, 1184—1185.
144. Doolittle R. F., (1975), w: *The Plasma Proteins*, red. Putnam F. W., t. 2, str. 110—161, Academic Press, New York.

SPRAWOZDANIA

III Zjazd Europejskiego Towarzystwa Neurochemicznego,

Bled (Jugosławia) 31.08—5.09.1980.

W dniach 31 sierpnia — 5 września 1980 r. odbył się III Zjazd Europejskiego Towarzystwa Neurochemicznego. Do położonego u stóp Alp Julijskich, malowniczego Bled zjechało około 350 osób, głównie z Europy, w tym 8 osób z Polski.

Zjazd miał charakter interdyscyplinarny, a bogaty program obrad obejmował niemal wszystkie dziedziny neurochemii. Sesje sympozjalne, mające formę wykładów, pomyślano pod kątem umożliwienia szerokiemu gronu uczestników ogólnej orientacji w zagadnieniach będących przedmiotem badań współczesnej neurobiologii.

Dotyczyły one:

- 1) Molekularnych aspektów przechowywania i wydzielania neurotransmiterów
- 2) Struktur trans-synaptycznych i specyficznych białek
- 3) Chemicznych i morfologicznych aspektów plastyczności synaptycznej
- 4) Interakcji neurotransmiter-receptor w normie i w stanach chorobowych.

Oprócz sympozjów zorganizowano spotkania warsztatowe (ang. *workshop*), które obradowały w mniejszych zespołach i dotyczyły przede wszystkim metod i technik stosowanych do badań poszczególnych problemów.

Były to:

1. Współczesny stan pęcherzykowej teorii wydzielania acetylocholino.
2. Farmakologia receptorów.
3. Receptory peptydów.
4. Problemy występujące przy stosowaniu do oznaczeń technik immunologicznych.
5. Transmityery, ich metabolity i enzymy związane z metabolizmem transmiterów w płynie mózgowo rdzeniowym.
6. Neuroleptyki a działanie mózgu.

Szczególnie interesującą ze względu na walory poznawcze oraz ciekawą dyskusję było kolokwium poświęcone biochemicznemu i funkcjonalnemu aspektom cholinesteraz prowadzone przez J. Massoulié.

Większość doniesień zjazdowych prezentowano na sesjach plakatowych. Ze względu na heterogenność tematyczną tych doniesień nie powiodła się próba zorganizowania podsumowania oraz wspólna dyskusja przedstawianych zagadnień.

Dyskusje okrągłego stołu miały bardzo różny charakter. Na jednych, jak np. na dyskusji zatytułowanej „Interdyscyplinarne podejście w badaniach Ośrodkowego Układu Nerwowego” poszczególne osoby prezentowały swe wyniki w formie krótkich komunikatów. Inne były swobodną, bardzo spontaniczną wymianą poglądów jak np. dyskusja poświęcona plastyczności neuronalnej, którą umiejętnie modulował organizator S. P. R. Rose (W. Brytania).

Na wielkie uznanie zasługuje fakt, że w momencie rozpoczęcia Zjazdu uczestnicy dostali, wydrukowane w postaci książki, materiały zawierające pełne teksty referatów sympozjalnych oraz streszczenia doniesień zjazdowych. Tom pt. „*Synap-*

tic constituents in health and disease" zredagowali M. Brzin, D. Sket i H. Bachelard a wydała Mladinska Knjiga i Pergamon Press.

W trakcie Zjazdu odbyło się walne zebranie członków ESN, na którym złożono sprawozdanie z pracy Zarządu oraz dyskutowano formy działalności Towarzystwa. Utrzymano w mocy dotychczasową decyzję, że członkowie ESN nie ponoszą kosztów z tytułu swej przynależności do Towarzystwa. Jest to możliwe, ze względu na zredukowanie do minimum wydatków związanych z prowadzeniem sekretariatu oraz na zapobiegliwość dotychczasowego skarbnika ESN (Prof. Neuhoff). Należy przy tym zaznaczyć, że poprzedni Zjazd, który odbył się w Getyndze w 1978 r. — przyniósł niewielki dochód. W związku z tym, można było do programu obecnego Zjazdu wprowadzić tzw. wykłady gości honorowych, na których młodzi neurochemicy prezentowali swoje osiągnięcia.

Jolanta Skangiel-Kramska
Małgorzata Skup

I Zjazd International Society for Developmental Neuroscience,

Strasbourg (Francja) 30.06.—4.07.1980.

W maju 1978 roku odbyło się w Teheranie sympozjum poświęcone problemom rozwojowym w neurobiologii. Podczas sympozjum zostało utworzone nowe międzynarodowe towarzystwo naukowe — International Society for Developmental Neuroscience (ISDN). Członków założycieli, do których należy również autor niniejszej notatki, było 54 (obecnie ISDN liczy około 400 członków z 40 krajów). Członkowie towarzystwa spotkali się na kolejnym sympozjum w 1979 roku w Brindisi (Włochy) a w roku 1980 został zwołany I Zjazd ISDN w Strasbourgu.

Organizacją zjazdu zajęły się Centrum Neurochemii CNRS i Instytut Chemii Biologicznej Uniwersytetu Pasteura w Strasbourgu. Honorowym przewodniczącym obrad został profesor, Paul Mandel. W zjeździe brało udział około 300 osób. Najliczniej reprezentowane były Francja, USA, Anglia i Włochy. Przedstawicielami Polski były prof. M. Dąbska i dr A. Potempska.

Program zjazdu, na który składały się referaty sympozjalne (7 sesji), warsztaty (1), dyskusje okrągłego stołu (10) i sesje plakatowe, obejmował szeroki wachlarz zagadnień związanych z problemami rozwoju układu nerwowego — począwszy od prymitywnych układów nerwowych aż po mózg ludzki. Referaty sympozjalne dotyczyły następujących zagadnień:

- 1) Czynniki wzrostu i różnicowania
 - 2) Synaptogeneza w obwodowym układzie nerwowym
 - 3) Synaptogeneza w ośrodkowym układzie nerwowym
 - 4) Interakcje glej — neuron
 - 5) Kliniczne i behawioralne aspekty rozwoju układu nerwowego
 - 6) Wczesne etapy rozwoju układu nerwowego
 - 7) Genetyczne i środowiskowe czynniki wpływające na rozwój układu nerwowego.
- Głównymi dyskutowanymi podczas zjazdu tematami były: synaptogeneza w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym oraz czynniki wpływające na rozwój układu nerwowego. Dominowały prace o charakterze morfologicznym i biochemicznym, znacznie mniej było badań behawioralnych, elektrofizjologicznych, genetycznych czy immunologicznych. Zwracała uwagę olbrzymia ilość prac wykonanych na hodowlach tkankowych. Generalnie, badania przeprowadzano: 1) w rozwoju zwierząt normalnych, 2) w stanach patologicznych i 3) na zwierzętach hodowanych w ściśle kontrolowanych warunkach środowiska.

W dziedzinie neurochemii na pierwszy plan wysuwały się prace dotyczące układów neurotransmiterowych w ontogenezie. Badano zarówno ilość danego neurotransmitera jak i aktywności enzymów związanych z jego syntezą i metabolizmem oraz budowę i aktywność miejsc receptorowych. Dużo miejsca poświęcono białkom, specyficznym dla układu nerwowego; innym białkom, które występują w znacznych ilościach w układzie nerwowym (np. tubulina) oraz białkom błonowym a szczególnie glikoproteidom zakończeń nerwowych i ich roli rozpoznawczej w tworzeniu połączeń synaptycznych.

Do najciekawszych prezentacji zjazdowych należy zaliczyć referat Y. Dudai'a (Izrael) na temat genetycznych różnic w przebiegu procesu zapamiętywania u *Drosophila*, wykład M. Keatinga (Anglia) o zmianach połączeń nerwowych podczas rozwoju układu wzrokowego żaby oraz plakaty grupy badaczy z uniwersytetu w North Carolina, U.S.A. (J. Lauder, H. Krebs i A. Wallace) dotyczące działania amin biogenych jako substancji modulujących rozwój zarodkowy układu nerwowego ssaków.

Ze spraw organizacyjnych wartym odnotowania była bardzo dobra organizacja sesji plakatowych. Plakaty były eksponowane przez 2 dni a program zjazdu umożliwiał długie dyskusje nad przedstawionymi pracami.

Anna Potempska

II Konferencja Europejskiej Grupy Studiów nad Chorobami Lizosomalnymi

Male (Belgia) 7—10 maja 1980 r.

Lizosomami zajmuje się coraz więcej badaczy z różnych dziedzin — biochemii, fizjologii, cytologii, medycyny itp. Wykrywa się wciąż nowe choroby lizosomalne a badania nad nimi prócz znaczenia praktycznego przyczyniają się do lepszego poznania mechanizmów działania tych organelli. Wzrasta świadomość potrzeby kontaktów, wymiany doświadczeń a przede wszystkim ujednoczenia nomenklatury i metod oznaczania aktywności enzymatycznej itp. W tym właśnie celu w 1978 r. powstała Europejska Grupa Studiów nad Chorobami Lizosomalnymi (*European Study Group on Lysosomal Diseases, ESGLD*) nieformalne stowarzyszenie laboratoriów i zespołów zajmujących się tymi zagadnieniami. Przewodniczącym Grupy jest prof. D. Robinson z Londynu, sekretarzem dr J. Tager z Amsterdamu. Grupa wydaje biuletyn informacyjny — „Lysosomal Newsletters”, ułatwia wymianę materiału (m.in. substratów i linii komórkowych), metod a także organizuje spotkania robocze.

W dniach 7—10 maja 1980 r. odbyło się drugie spotkanie grupy. W pięknej scenarii starego i dobrze odbudowanego zamku-opactwa, nieopodal najbardziej malowniczego miasta Belgii-Brugii (*Brugge, Bruges*) pięćdziesięciu pięciu „lizosomologów” przez cztery dni „rozpracowywało” lizosomy i ich zaburzenia przedstawiając wyniki swych doświadczeń na plakatach, dyskutując podczas ośmiu sesji problemowych oraz niezliczonych nieformalnych rozmów między sesjami, przy plakatach, przy kawie, drinkach i, znakomitych!, posiłkach. Swobodna, przyjacielska atmosfera jak również otaczająca zamek fosa (z łabędziami!) oraz zimna i deszczowa pogoda skutecznie skupiały wszystkich uczestników.

Dyskusja na tematy ogólne dotyczyła głównie trzech zagadnień: 1) powstawania kwaśnych hydrolaz i ich umieszczania w lizosomie, 2) warunków oznaczania ich aktywności i 3) mechanizmów działania środków lizosomotropowych Ad. 1) na uwagę zasługują wnioski z prac U. Kleina z Monachium oraz Holendersko-Niemieckiej grupy (m.in. J. M. Tagera, R. Datema'y, A. Westervelda i P. M. Khana) a także B. Winchestera z Londynu: w aparacie Golgie'ego syntetyzowany jest wielko-

cząsteczkowy „preenzym” zawierający nie usuwaną przez alkaliczną fosfatazę grupę fosforanową. Prawdopodobnie jest to dwuester. Klein zaproponował wzór: białko-oligosacharyd-mannoza-O-P-P-O-X; po przyłączeniu preenzymu do receptora rozpoznającego ugrupowanie man-6-P fragment X zostaje odcięty (hipotetyczny enzym prof. Robinson nazwał „sygnalizacją”) i enzym umieszcza się wewnątrz lizosomu. Wyniki badań zespołu H. Galjaarda z Rotterdamu nad cybrydami rozmaitych komórek z komórkami pochodzącymi od chorych na tzw. *I-cell disease* sugerują, że modyfikacja cząsteczki umożliwiająca rozpoznanie jej przez receptor i internalizację zachodzi pod wpływem czynnika cytoplazmatycznego. Ad. 2) S. Gatt przedstawił propozycję nowej rodziny substratów. Są to lipidy, w których kwas tłuszczowy został zastąpiony analogiem zawierającym przyłączoną do lipofilnego końca cząsteczki grupę barwną np. trójnifenyloaminę lub fluorescencyjną np. antracen, pyren lub DANSYL. Enzymy rozkładają te związki na równi z substratami naturalnymi. Metoda jest prosta i wielokrotnie czulsza od metody izotopowej. Niektóre z tych substratów zaczęły produkować Sigma i któraś z firm izraelskich. W dyskusji podkreślano ujemne strony stosowania detergentów do solubilizacji substratów, powodują one denaturację białek a stopień wrażliwości enzymu zależy od jego stężenia, ogólnego stężenia białka, rodzaju tkanki itp. *In vivo* reakcja zachodzi w obecności białkowego aktywatora tworzącego z lipidem rozpuszczalny kompleks będący właściwym substratem. K. Sandhoff wyizolował białko o m.c.z około 25 000 i pI 4,8 stymulujące swoiście rozkład G_{M2} -gangliozydu przez beta-heksozoaminidazę A. Ad. 3) Czynniki lizosomotropowe, jak np. chlorchina oraz niektóre aminoglikozydy, są szczególnie wychwytywane przez lizosomy (np. chlorchina jest usuwana ze środowiska 100× szybciej niż sacharoza) a ich akumulacja powoduje szereg zmian m.in. obniżenie aktywności większości enzymów lizosomalnych. Badanie różnorakiego wpływu tych czynników pozwoliło na wyjaśnienie mechanizmów internalizacji substancji gromadzonych w lizosomach — zarówno substratów jak i enzymów lizosomalnych (tzw. „reuptake”). Z prac R. Stahla z Oxfordu a także P. Tulkensa oraz Y. J. Schneidera i A. Trouet z Brukseli wynika, że część błony plazmatycznej, która utworzyła fagosom (pęcherzyk endocytarny) po fuzji i „wyładowaniu” zawartości do wnętrza lizosomu w jakiś sposób wraca na powierzchnię komórki; w ten sposób regenerują się receptory powierzchniowe. Jest to jedyne wytłumaczenie faktu, że ilość cząsteczek internalizowanych wielokrotnie przewyższa ilość receptorów a przeciwciała przeciw antygenom powierzchniowym po związaniu z błoną dostają się wraz z antygenem do wnętrza lizosomu poczym wracają na powierzchnię komórki. Chlorchina zaburza ten proces hamując skutek tego endocytozę.

Prócz dyskusji na tematy ogólne przedstawiono szereg prac dotyczących konkretnych chorób. Szczególne zainteresowanie wzbudziły zaburzenia, w których z nieznanymi przyczynami, akumuluje się wewnątrz lizosomu związek niskocząsteczkowy: cystyna (choroba zwana cystynozą) lub kwas sialowy (choroba Salla); dalszy rozkład tych związków wymagały obecności odpowiednio reduktazy cystyny lub liazy kwasu sialowego. Obecności żadnego z tych enzymów w lizosomach nigdy nie stwierdzono. U podłoża obu tych chorób mogły leżeć błędy błony lizosomalnej nie pozwalający na aktywny transport tych związków przez błonę. Przedmiotem żywej dyskusji był też problem sialidoz, grupy chorób, których przyczyną jest nieprawidłowa aktywność sialidazy. Przedstawiono różne propozycje ich klasyfikacji (J. G. Leroy z Antwerpii i P. Durand z Genewy) oraz różne metody oznaczania enzymu. Zawikłana sytuacja w rodzinie enzymów odszczepiających kwas sialowy od różnych substratów, ich różnorodne rozmieszczenie subkomórkowe, różnoraka rozpuszczalność i wynikające stąd trudności w oznaczeniu ich aktywności rzutują na trudności diagnostyczne i interpretacyjne. M. Strecker z Lille uważa, że kwas sialowy przyłączony do galaktozy wiązaniem 2→3 jest odszczepiany przez inny enzym

niż kwas przyłączony wiązaniem 2→6. Jego argumenty oparte głównie na różnicy zależności obu reakcji od temperatury nie przekonały jednak większości zebranych a wyniki prac M. Cantza świadczą raczej za jednym enzymem. Wciąż nie wiadomo na czym polegają enzymatyczne różnice w różnych klinicznie typach sialidoz. Mało zresztą jest również wyczerpujących opisów klinicznych. G. Bach i M. Ziegler z Jerolimy przedstawili przykład tzw. mukolipidozy IV. W komórkach chorych stwierdzili brak sialidazy gangliozydów rozpuszczalnej w tritonie X-100 przy niezmięnionej aktywności nierozpuszczalnej w tych warunkach formy enzymu oraz sialidazy fetuiny.

Spotkanie zakończył „Business Meeting”, na którym omówiono dalsze plany grupy.

Z żalem opuszczaliśmy gościnne Male, gdzie przez cztery dni wypełnione intensywną pracą zrekapitulowaliśmy sobie to co wiemy i czego nie wiemy o lizosomach, w jakim kierunku winny iść dalsze badania, zapoznaliśmy się z tym co i jak robią inni. Nawiązały się nowe kontakty, zarysowały możliwości współpracy, poznaliśmy się wzajemnie.

B. Czartoryska

Konferencja nt. „Regulacyjne funkcje procesów fosforylacji białek”,

6–7 maj 1980, Lublin

W maju 1980 r. odbyła się w Lublinie konferencja Polskiego Towarzystwa Biochemicznego poświęcona sprawom fosforylacji białek. W konferencji udział wzięło ponad 40 osób z następujących ośrodków naukowych: Białystok, Kraków, Lublin, Poznań, Warszawa oraz Halle (NRD). Większość uczestników przedstawiła referaty bądź doniesienia. Program konferencji był szeroki i obejmował bardzo różnorodny wachlarz zagadnień wiążących się z funkcją kinaz białkowych oraz fosfataz fosfobiałkowych w modyfikacji różnych substratów, w tym białek chromatyny, białek mięśni, błon komórkowych, komponentów układu translacyjnego itd. Zwrócono szczególną uwagę na aspekt regulacyjny procesów fosforylacji białek w odniesieniu do poszczególnych reakcji lub też procesów jak np. różnicowanie się komórkowe.

Warta szczególnego podkreślenia jest towarzysząca obradom bardzo ożywiona i rzeczowa dyskusja, która nadała konferencji zamierzony roboczy charakter. Spotkanie stanowiło względnie szeroki przegląd aktualnej problematyki wiążącej się z fosforylacją białek w tym także przegląd tematyki badań ośrodków krajowych i stopnia jej zaawansowania. Konferencja umożliwiła zetknięcie się różnych grup badawczych ze sobą, bliższe poznanie się, co może ułatwić w przyszłości nawiązanie współpracy naukowej.

A oto szczegółowa tematyka referatów plenarnych:

1. Reakcje fosforylacji — defosforylacji białek chromatyny (Włodzimierz Ostrowski, Kraków).
2. Fosforylacja białek chromatyny roślin wyższych w powiązaniu z hormonalną regulacją transkrypcji (Kazimierz Kleczkowski, Warszawa).
3. Fosforylacja białek błon biologicznych (Lech Wojtczak, Warszawa).
4. Kalmodulina — aktywator kinaz białkowych zależnych od jonów wapnia (Witold Drabikowski, Warszawa).
5. Fosforylacja białek aparatu kurczliwego mięśni (Renata Dąbrowska, Warszawa).
6. Fosforylacja białek mózgowych (Tomasz Borkowski, Lublin).

7. Kinazy białkowe niezależne od cyklicznych nukleotydów specyficzne wobec białek zasadowych (Józef Zając, Lublin).
8. Fosforylacja enzymów glikogenolizy (Jacek Kuźnicki, Warszawa).
9. Wpływ fosforylacji czynników inicjujących na ekspresję genetyczną eukariontów (Włodzimierz Zagórski, Warszawa).
10. Czynniki kontrolujące biosyntezę białka w retikulocytach króliczych (Nikodem Grankowski, Lublin).
11. Fosforylacja białek rybosomowych (Eugeniusz Gąsior, Lublin).

Eugeniusz Gąsior

RECENZJE

Purine metabolism in man — III; Biochemical, immunological and cancer research

Red. A. Rapado, R. W. E. Watts, Ch. H. M. M. De Bruyn
Plenum Press, New York i London, 1979, str. 459, \$ 45.-

Recenzowany tom, ukazujący się w serii *Advances in Experimental Medicine and Biology*, obejmuje materiały III Międzynarodowego Sympozjum na temat metabolizmu puryn u człowieka, które odbyło się w 1979 roku w Madrycie (Hiszpania). Opublikowane prace oryginalne dotyczą różnorodnych aspektów przemian związków purynowych i pirymidynowych w różnych komórkach prawidłowych i nowotworowych a także u osób z wrodzonymi wadami metabolicznymi lub u osób obarczonych nowotworami.

Na tom składa się siedem rozdziałów:

- szlaki metaboliczne puryn i regulacje
- enzymologia i metabolizm puryn
- metabolizm pirymidyn
- metabolizm puryn w limfocytach
- układ opornościowy a metabolizm puryn
- badania nowotworów
- metodologia

Oto niektóre z poruszonych zagadnień:

- Przemiany puryn w różnych hodowanych *in vitro* komórkach ssaków, a zwłaszcza w prawidłowych ludzkich fibroblastach i fibroblastach pobranych od pacjentów z zaburzeniami syntezy puryn.
- Metabolizm puryn w mięśniach szkieletowych.
- Oczyszczanie, właściwości i regulacja enzymów uczestniczących w różnych etapach biosyntezy puryn *de novo*.
- Biochemiczne konsekwencje traktowania komórek nowotworowych deoksykoformycyną, specyficznym inhibitorem deaminazy adenozykowej oraz ametoptyeryną, specyficznym inhibitorem reduktazy dihydrofolianowej.
- Przemiany pirymidyn w elementach morfotycznych krwi.

Ostatni rozdział monografii poświęcony jest omówieniu metod stosowanych do oczyszczania niektórych enzymów uczestniczących w przemianach puryn i pirymidyn (np. syntetazy fosforybozylpirofosforanu i kinazy adenozykowej) oraz szybkich i czułych metod (np. izotachforezy czy różnego typu chromatografii) oznaczania poziomu puryn i pirymidyn w surowicy i limfocytach, co ma szczególnie duże znaczenie w badaniach wrodzonych wad metabolicznych.

Monografia opatrzona jest indeksem autorów oraz wyczerpującym indeksem rzeczowym. Różnorodność poruszanych w tomie zagadnień sprawia, że stanowi on cenną pozycję dla interesujących się rozwojem badań w dziedzinie przemian związków purynowych zarówno z teoretycznego jak i praktycznego punktu widzenia

Barbara Grzelakowska-Sztabert

Abkürzungen in der Medizin und ihren Randgebieten.

U. Spranger, VEB Verlag Volk und Gesundheit,
Berlin 1980 ss. 240, 17,50 M.

Stale rosnąca ilość skrótów stosowanych w tekstach prac naukowych, niekiedy w istotny sposób utrudnia szybkie ich przeczytanie. Dlatego też, informatory zbierające skróty stosowane w różnych dziedzinach wiedzy i podające ich rozwiązania są wydawnictwami coraz cenniejszymi i zawsze poszukiwanymi. Praca U. Spranger należy więc już z tej racji do książek bardzo pożytecznych. Autorka zebrała i ułożyła w porządku alfabetycznym około 6 tysięcy skrótów stosowanych nie tylko w medycynie i technice medycznej, ale również w biochemii i farmacji. Wykaz ten obejmuje także terminy fizyczne i techniczne odnoszące się lub stosowane w medycynie oraz jednostki miar w układzie SI. Nie pominięto także wyjaśnienia skrótów terminów ogólniejszych, stosowanych w wielu dziedzinach wiedzy, podano także rozwiązania dla skrótów nazw organizacji i towarzystw medycznych.

Aczkolwiek praca ta przeznaczona jest głównie dla odbiorcy z obszaru języka niemieckiego, to skróty obejmują nie tylko terminologię tego języka. Autorka bowiem bardzo szeroko uwzględniła fakt przyswojenia sobie przez naukowców i stosowania w tekstach skrótów wywodzących się z języka angielskiego. Skróty te posiadają swe rozwiązania w języku angielskim, przy których podano ich znaczenie w języku niemieckim. Dlatego też, informator ten może być z różnym pożytkiem wykorzystywany przez czytelnika polskiego, lub też przy korzystaniu z medycznej literatury publikowanej w języku angielskim.

Dodatkowo, poza układem alfabetycznym znalazł się wybór symboli i znaków wraz z ich rozwiązaniami. Obejmuje on symbole i znaki określone jako ogólne, a ponadto z zakresu matematyki, fizyki i chemii oraz biologii.

Zebranie tak dużej liczby skrótów, obejmującej szeroki zakres ich występowania w literaturze medycznej i pokrewnej jest pracą bardzo żmudną i wymagającą dużej znajomości tekstów. Jest ona przy tym wydawniczo bardzo skondensowana. Jej duża przydatność, nie tylko dla bibliotek, ale dla wszystkich zainteresowanych tą literaturą nie ulega więc wątpliwości.

Henryk Adler

Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 125 Structure and Function of Gangliosides.

Red. L. Svennerholm, P. Mandel, H. Dreyfus i P. F. Urbano
Plenum Press, 1980, New York, London, stron 571, cena £ 49,50.

Coraz większą popularność uzyskują sobie kameralne sympozja na wąski temat omawiany w sposób wszechstronny i powiązany z ogólnymi problemami danej dziedziny wiedzy.

Badacze zajmujący się gangliozydami po raz pierwszy spotkali się we własnym gronie w 1973 r. i spotkania te ponawiają. Ostatnią konferencję w kwietniu 1979 r. zorganizowali w Strasburgu Lars Sennerholm i Paul Mandel. Przedstawiano tam najnowsze wyniki badań nt.: 1) struktury chemicznej, 2) rozmieszczenia w tkankach, frakcjach subkomórkowych, komórkach i płynach, 3) metabolizmu, 4) immunologicznych metod identyfikacji oraz 6) funkcji gangliozydów, a także nt. 5) sialidoz i sialidaz. Plenum Press udostępnił nam ostatnio treść tej konferencji publikując w 125 t. serii *Advances in Experimental Medicine and Biology* 46 referatów uzupełnionych bibliografią tematu (do 1979 r.).

Czytelnik znajdzie tam wiele szczegółów metodycznych dotyczących rozmaitych technik badawczych (metody izolowania i rozdziału, analiza przy użyciu spektrometrii masowej i rezonansu jądrowo magnetycznego NMR i $^1\text{H-NMR}$, zastosowanie trójfluoroacetylizy, znakowania przez acetylację i degradację enzymatyczną oraz wykorzystanie micelli i liposomów wraz z ich preparatyką (jak również wiele faktów, teorii, hipotez i spekulacji dotyczących metabolizmu i funkcji biologicznej gangliozydów). W tym ostatnim jednak zakresie czytelnik nie znajdzie wiele nowego; większość koncepcji dotyczących szlaku metabolicznego i roli tych związków opiera się wprawdzie na szerszym materiale doświadczalnym, ale w głównych zarysach powstała kilka lat temu.

Siedemnaście lat temu Svennerholm publikując swą propozycję nomenklatury gangliozydów wyliczył ich 10. Dziś znamy ich co najmniej 20 (a każdy z nich może zawierać jeden z dwu rodzajów kwasu siałowego lub różne ich kombinacje). Wiemy, że zawierać mogą prócz galaktozy, glukozy, galaktozoaminy i kwasu siałowego także glukozoaminę i fukozę; łańcuch oligosacharydowy zawierać może nawet 10 cząsteczek cukru. W tkance nerwowej człowieka zidentyfikowano 12 rodzajów, w tkance nerwowej ryby — 15 (Yu i Ando). Żmudne prace analityczne prowadzące do dokładnego określenia rozkładu gangliozydów w tej samej tkance różnych gatunków (Urban i wsp., Avrova, Ledeen), w różnych tkankach tego samego gatunku (Rauvala i Finne), czy w różnych rodzajach komórek w obrębie jednej tkanki np. nerwowej (Urban i wsp.) są, wydawałoby się, drobnymi przyczynkami — ale na nich opierają się wszelkie hipotezy i spekulacje.

Różnicowaniu się morfologicznemu komórek hodowanych towarzyszy zmiana jakościowa i ilościowa gangliozydów, przy czym wzrost ich ilości naogół — choć nie zawsze — skorelowany jest ze zmianami morfologii komórek (Rebel i wsp.). Obecność gangliozydów wpływa na właściwości fizykochemiczne sztucznych błon lipidowych. Odwrotnie niż cholesterol zmniejszają one sztywność błony; prócz tego modulują jej wrażliwość na czynniki zewnętrzne — przede wszystkim na obecność jonów wapnia — a stopień tej modulacji zależy od stopnia sialilacji gangliozydu (Berenholz i wsp.). Zjawisko to ma kapitalne znaczenie w procesie przekazywania bodźców w komórce nerwowej. Gangliozydy w obrębie tej samej błony rozmieszczone są nieregularnie tworząc skupiska (Tettamanti i wsp.). W błonie plazmatycznej synaptosomów stwierdza się nagromadzenie gangliozydów wielosiałowych, które tworzą strefy nagromadzenia ładunków ujemnych mogących wiązać jony wapnia; gangliozydy G_{M1} i G_{D1B} mieszczą się przede wszystkim po cytoplazmatycznej stronie błony presynaptycznej. W obecności jonów wapnia zmienia się struktura błony — grupy siałowe stają się niedostępne (np. dla nadjodanu), podczas gdy fosfolipidy są eksponowane (Lesliva i Rosenberg). Fakty te stanowią punkt wyjścia dla różnych hipotez na temat udziału gangliozydów w przekazywaniu bodźców nerwowych. Lesliva i Rosenberg przypuszczają, że modulacja błony przez jony wapnia powoduje zmianę w dostępności substratu sialidazy synaptosomalnej; enzym ten działać może jedynie w nieobecności jonów wapnia. Odszczepienie kwasu siałowego obniża ujemny ładunek błony, zmienia więc jej polarność, a tym samym przepuszczalność — może to być jeden z etapów przekazywania bodźca. Obecna w synaptosomach sialotransferaza (Tettamanti i wsp.) resialując odpowiednie fragmenty błony mogłaby regenerować system. Svennerholm z kolei uważa, że głównym zadaniem gangliozydów jest wiązanie wapnia. Impuls nerwowy (np. elektryczny) powoduje odłączenie jonów wapnia, które zostają odtransportowane przez specyficzne kanalki do wnętrza części presynaptycznej gdzie wzrost ich stężenia powoduje skurcz mikrofilamentów i „wystrzelenie” neurotransmitera, który z kolei zostaje przyłączony do receptorów na błonie postsynaptycznej. W dalszym etapie gangliozydy mogłyby uczestniczyć w reabsorbcji dodatnio naładowanych cząsteczek neurotransmitera przez błonę presynaptyczną.

Fakt, że gangliozydy nie tkwią w błonie sztywno, lecz zmieniają położenie i ułożenie w zależności od środowiska warunkuje ich właściwości receptorowe. Uczestniczą one — w sposób swoisty lub pomocniczy — w wiązaniu i internalizacji różnych toksyn (bakterii cholery i tężca, wirusa Sendai), a także tyotropiny i interferonu. Holmgren i wsp. przedstawiają bardzo sugestywnie atrakcyjny schemat internalizacji cholera genu przy pomocy „obrotowych” gangliozydów; brak przedstawienia dla równowagi koncepcji enzymatycznej (patrz T. Pacuszką, *Postępy Biochemii* 4/80). We wszystkich tych przypadkach udział gangliozydów jest chwilowy i uczestnictwo w internalizacji wydaje się nie wpływać na inne ich funkcje. Inaczej jest w przypadku wiązania przeciwciał, które wiążąc się trwale z antygenem usztywniają zapewne błonę. Bardzo interesujące są wyniki prac Rapporta i wsp., którzy zauważyli, że podawanie zwierzętom swoistych przeciwciał przeciw określonym gangliozydom wywoływało szereg zaburzeń centralnego systemu nerwowego np. obniża zdolność uczenia się, stymulację cholinergiczną pragnienia itp. Badania behavioralne sugerują, że nie wszystkie potencjalne miejsca wiążące przeciwciało są blokowane. Doświadczenia te otwierają nowe perspektywy badawcze.

Przedstawiony przez Yu i Ando, a także przez Basu i wsp. schemat szlaku metabolicznego biosyntezy gangliozydów różni się od schematu przedstawionego przez Kaufmana, Basu i Rosemana w 1968 r. głównie tym, że linie przerywane zostały zastąpione liniami ciągłymi — tj. reakcje hipotetyczne zostały potwierdzone doświadczalnie; no i doszedł szereg nowych glikolipidów, a szlak został powiązany ze szlakiem fukolipidów. Ogromny postęp dotyczy natomiast wiedzy o właściwościach poszczególnych transferaz, różnic tkankowych, lokalizacji, zmian związanych z wiekiem itp. Najciekawsze są wyniki prac and aktywnością i lokalizacją sialotransferaz i sialidaz w błonie komórki nerwowej, a to dla wyżej przedstawionych skutków działania tych enzymów tj. modyfikacji plastyczności, polarności i przepuszczalności błony. Z informacji na temat katabolizmu glikolipidów najbardziej chyba interesującą jest wykrycie i charakteryzacja białkowego aktywatora beta-heksozoaminidazy (Conzelman i Sandhoff) i wiążący się z tym model mechanizmu degradacji enzymatycznej substratów lipidowych.

Reasumując wydaje mi się, że głównym atutem omawianego tomu jest systematyczne i wszechstronne przedstawienie aktualnego stanu badań nad gangliozydami z szerokim uwzględnieniem najnowszej metodyki i koncepcji na temat ich funkcji. Książka będzie napewno pomocna dla osób tkwiących w temacie lub rozpoczynających pracę na tym polu, a także dla tych, którzy „platonicznie” interesują się zagadnieniem błon biologicznych i ich składnikami heteropolisacharydowymi.

B. Czartoryska

Lehrbuch der Pflanzenphysiologie

E. Libbert

VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1979, 485 str., cena 39,00 M

Narodziny biochemii w pierwszych dziesiątkach lat bieżącego stulecia były wynikiem rozwoju chemii organicznej na przełomie XIX i XX wieku oraz prób rozwiązania problemów i odpowiedzi na pytania, które gromadziły przez lata nauki fizjologiczne. Większość problemów fizjologicznych, które inspirowały narodziny i rozwój biochemii zrodziła się wśród fizjologów zwierząt i człowieka, tworząc dział chemii zwany wówczas chemią fizjologiczną. Niemniej, również zagadnienia fizjologii roślin odegrały pewną rolę w tym etapie rozwoju stymulując badania np. nad fotosyntezą, strukturą i przemianami szeregu metabolitów wtórnych itp.

W drugiej połowie naszego stulecia, gdy rozwój biochemii, genetyki i nauki o komórce doprowadził do powstania nowej dziedziny wiedzy — biologii molekularnej, można obserwować odwrotnie zwrócony kierunek oddziaływania. Odkrycia biochemii i biologii molekularnej działają inspirująco na badania fizjologiczne, prowadząc do podejmowania prób odpowiedzi na pytania, których dziewiętnastowieczna fizjologia wogóle nie stawiała.

Nowe, trzecie wydanie podręcznika fizjologii roślin Eike Libberta, profesora Uniwersytetu w Rostocku, jest bardzo dobrym przykładem takiego oddziaływania najnowszych trendów badawczych współczesnej biologii zarówno na treść jak i na sposób wykładu fizjologii roślin. Libbert czyni z opisu zjawisk fizjologicznych niemal margines, a w każdym razie drugi plan, tło fizjologii roślin, dając pierwszeństwo omówieniu zależności przyczynowych i mechanizmów regulacyjnych odpowiedzialnych za przebieg poszczególnych procesów kształtujących funkcjonowanie komórki i organizmu roślinnego.

Książka Libberta podzielona została na 6 rozdziałów, z których tylko trzy ostatnie poświęcone są zagadnieniom, którymi zajmowała się klasyczna fizjologia roślin: rozdział 4 poświęcony jest przemianie materii w roślinach obejmując takie zagadnienia jak żywienie mineralne, gospodarkę wodną i jonową, transport, przemiany szeregu grup metabolitów i wydzielanie. Rozdział 5 — poświęcony różnym aspektom wzrostu i rozwoju roślin zawiera kilkunastostronicową część omawiającą podstawowe mechanizmy regulujące procesy rozwojowe i wzrost, jak np. zróżnicowanie ekspresji informacji genetycznej i aktywacji genów, koordynację aktywności genów i rolę izoenzymów. Rozdział 6 opisuje różne rodzaje ruchów roślin.

Natomiast pierwsze trzy rozdziały omawianego podręcznika mają tylko pośredni, lub fragmentaryczny związek z tradycyjną fizjologią roślin. W rozdziale 1 autor przedstawia na kilku stronach własne koncepcje dotyczące biologicznych, a zwłaszcza filozoficznych aspektów fizjologii roślin. Recenzentowi nie wydaje się w pełni uzasadnione poświęcanie tych stron na przekonywanie czytelnika do materialistycznego traktowania procesów fizjologicznych. Rozdział 2 omawia podstawy przemiany materii przypominając czytelnikowi zasadnicze elementy termodynamiki, omawiając stosunki energetyczne w żywej komórce oraz podstawy katalizy enzymatycznej. Stanowi to tło do omawiania utleniania tkankowego i fotosyntezy, którym poświęcona jest większa część tego rozdziału. Rozdział kończy się kilkustronicowymi rozważaniami zatytułowanymi „filogeneza przemiany materii” gdzie autor omawia poglądy na powstanie życia przedstawiając kolejność formowania się poszczególnych systemów metabolicznych.

Rozdział 3 „Podstawy regulacji biologicznej” w największym stopniu odbiega charakterem od tego, co czytelnik z pewnym doświadczeniem spodziewa się znaleźć w podręczniku fizjologii roślin. Z resztą w poprzednim wydaniu podręcznika Libberta z roku 1974 nie ma jeszcze tego rozdziału. Autor omawia kolejno regulacje na poziomie metabolitów, regulacje aktywności enzymów i regulacje ekspresji genów. Liczne przykłady omawianych rodzajów regulacji dotyczą procesów zachodzących w roślinie, i tylko to sprawia, że rozdział ten nie mógłby się znaleźć w podręczniku biochemii, biologii komórki lub biologii rozwoju.

Przykłady i uogólnienia dotyczące mechanizmów regulacji omawiane przez Libberta dotyczą procesów zachodzących na terenie komórki, co pozwala autorowi operować kategoriami molekularnymi. Nie pozwalają one na wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg wszystkich procesów i zjawisk w żywej roślinie. Jest to w znacznym stopniu wynikiem braku wiadomości na temat oddziaływań międzykomórkowych i czynników koordynujących w skali całego organizmu. Niemniej, sposób wykładu uwypuklający zasadniczą rolę mechanizmów kontrolnych w całokształcie procesów fizjologicznych stanowi *novum* w konstrukcji

podręczników akademickich i fizjologii roślin i jest logiczną konsekwencją rozwoju wiedzy.

Uważam trzecie wydanie podręcznika Libberta za bardzo dobrze napisane i bardzo pożyteczne. Zmusza ono czytelnika do myślenia i ułatwia skojarzenia, co nie zawsze było osiągnięte przez dotychczasowe podręczniki „klasycznej” fizjologii roślin. Skłania ono również do refleksji na temat losów interdyscyplinarnych dziedzin nauki, do których w tej chwili należy fizjologia. Granice między fizjologią i biochemią roślin zacierają się w tak znacznym stopniu, że nie tylko twórczy wkład w jedną z tych dziedzin, ale i jej nauczanie stają się niemożliwe bez czynnego zaangażowania w drugiej.

Podobnie jak poprzednie wydanie, podręcznik Libberta jest bardzo starannie wydany, obfituje w przejrzyste ilustracje i pomysłowe schematy. Polskim czytelnikom, przyzwyczajonym do skrótów opartych na nomenklaturze anglosaskiej, utrudnia korzystanie z książki stosowanie przez autora skrótów nazw niemieckich, nie zawsze wyjaśnionych. Ta drobna niedogodność jest z nawiązką rekompensowana przez nowoczesny, logiczny sposób wykładu i rzetelną informację o osiągnięciach fizjologii roślin do późnych lat 70 naszego stulecia. Sądzę, że recenzowany podręcznik zainteresuje nie tylko studentów fizjologii roślin i biochemii, lecz również pracowników naukowych tych dyscyplin.

W tym miejscu recenzent pragnie wyrazić żal, że Państwowe Wydawnictwo Naukowe przystępuje do wydania polskiego tłumaczenia poprzedniego wydania (z 1974 roku) podręcznika Libberta. Różni się ono w znacznym stopniu od omawianego w tej recenzji zarówno sposobem wykładu jak i zasobem i doбором wiadomości.

Stanisław Lewak

SPIS TREŚCI

N. Grankowski — Problemy regulacji syntezy białka u <i>Eukariota</i>	3
K. Nowak — Prebiątka	29
A. Krówczyńska — Charakterystyczne sekwencje nukleotydowe w heterogennym jądrowym RNA	41
A. Grzełińska — Poinfekcyjne zmiany w procesie regulacji genetycznej u roślin	67
Cz. Cierniewski, T. Krajewski — Interakcje osoczowych czynników krzepnięcia krwi	81
Sprawozdania:	
III Zjazd ESN Bled, Jugosławia (<i>J. Skangiel-Kramska, M. Skup</i>)	107
I Zjazd International Society for Developmental Neuroscience, Strasbourg, Francja (<i>A. Potempska</i>)	108
II Konferencja Europejskiej Grupy Studiów nad Chorobami Lizosomalnymi, Male, Belgia (<i>B. Czartoryska</i>)	109
Konferencja nt. „Regulacyjne funkcje procesów fosforylacji białek” Lublin (<i>E. Gąsior</i>)	111
Recenzje książek:	
Purine metabolism in man — III; Biochemical, immunological and cancer research	113
Abkürzungen in der Medizin und ihren Randgebieten	114
Structure and Function of Gangliosides	114
Lehrbuch der Pflanzenphysiologie	116

POSTĘPY BIOCHEMII

March 1981

ARTICLES IN POLISH

Volume 27

Number 1

N. Grankowski — The Regulation Problems of Protein Synthesis in Eukaryotes (Dept. Mol. Biol., Institute of Microbiology University of M. Curie-Skłodowska, Lublin)	3
K. Nowak — Preproteins (Dept. Biochem., Institute of Physiology and Biochemistry, Medical School, Wrocław)	29
A. Krówczyńska — Specific Nucleotide Sequences in Heterogeneous Nuclear RNA (Institute of Biochemistry and Biophysics, Pol. Acad. Sci, Warszawa)	41
A. Grzelińska — Postinfectious Changes of Genetic Regulation Process in Plants (Institute of Plant Biology, Warsaw Agriculture University, Warszawa)	67
Cz. Cierniewski, T. Krajewski — Interactions of Blood Coagulation Factors (Dept. Biochem., Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Łódź, Łódź)	81
Meetings Report	107
Book Reviews	113

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SPIS TREŚCI

N. Grankowski — Problemy regulacji syntezy białka u <i>Eukariota</i> . . .	3
K. Nowak — Prebiłka	29
A. Krówczyńska — Charakterystyczne sekwencje nukleotydowe w heterogennym jądrowym RNA	41
A. Grzelińska — Poinfekcyjne zmiany w procesie regulacji genetycznej u roślin	67
Cz. Cierniewski, T. Krajewski — Interakcje osoczowych czynników krzepnięcia krwi	81
Sprawozdania:	
III Zjazd ESN Bled, Jugosławia (<i>J. Skangiel-Kramska, M. Skup</i>)	107
I Zjazd International Society for Developmental Neuroscience, Strasbourg, Francja (<i>A. Potempska</i>)	108
II Konferencja Europejskiej Grupy Studiów nad Chorobami Lizosomalnymi, Male, Belgia (<i>B. Czartoryska</i>)	109
Konferencja nt. „Regulacyjne funkcje procesów fosforylacji białek” Lublin (<i>E. Gqsior</i>)	111
Recenzje książek:	
Purine metabolism in man — III; Biochemical, immunological and cancer research	113
Abkürzungen in der Medizin und ihren Randgebieten	114
Structure and Function of Gangliosides	114
Lehrbuch der Pflanzenphysiologie	116